



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

Dottorato di Ricerca in Scienze Mediche  
Ciclo 29°

## **MONITORAGGIO AMBULATORIALE DEL CXCL9 URINARIO NEL RICEVENTE DI TRAPIANTO DI RENE PER L'IDENTIFICAZIONE DELLO STATUS DI QUIESCENZA IMMUNOLOGICA**

Coordinatore:  
Prof. RICCARDO BONADONNA

Tutore:  
Dott. UMBERTO MAGGIORE

Dottorando:  
Dr.ssa ELENA CREMASCHI

## **INDICE**

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>2. MONITORAGGIO IMMUNOLOGICO</b>	<b>9</b>
2.1 Biomarcatori	9
2.2 Monitoraggio Immunologico mediante l'utilizzo dei biomarcatori	10
<b>3. CXCL9 COME BIOMARCATORE DI RIGETTO ACUTO</b>	<b>14</b>
<b>4. IL NOSTRO STUDIO</b>	<b>18</b>
4.1 Premessa allo studio	18
4.2 Obiettivi	19
4.3 Popolazione di studio	19
4.4 Terapia immunosoppressiva	20
4.5 Monitoraggio delle infezioni	20
4.6 Valutazione del Luminex® single bead antigen	21
4.7 Stima della funzione renale	23
4.8 Diagnosi bioptica e trattamento del rigetto	23
4.9 Protocollo di misurazione dei CXCL9 mediante Quantikine ELISA	25
4.10 Raccolta dati	28
<b>5. RISULTATI</b>	<b>29</b>
5.1 Caratteristiche basali dell'intera popolazione di studio	29
5.2 Rigetto acuto e cronico	29
5.3 Infezioni	30
5.4 Elaborazione dati	30
<b>6. DISCUSSIONE</b>	<b>34</b>
<b>7. APPENDICE A: Tabelle</b>	<b>36</b>

<b>8. APPENDICE B: Figure</b>	<b>38</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUZIONE

Il trapianto è il trattamento di scelta per i pazienti affetti da insufficienza renale cronica terminale.

Il trapianto renale non è comunque una procedura universalmente coronata da successo ed il principale ostacolo è innanzitutto rappresentato dal rigetto. La prevenzione del rigetto richiede un trattamento immunosoppressivo che deve essere protratto per tutta la durata di vita del trapianto. Purtroppo tale trattamento si associa allo sviluppo di complicanze serie, anche letali, quali le infezioni e le neoplasie e può contribuire al danno cronico dell'organo stesso. Dall'altro lato, il trattamento immunosoppressivo non è sempre sufficientemente efficace a prevenire lo sviluppo del rigetto.

Nel corso degli ultimi decenni, l'incidenza di rigetti acuti si è significativamente ridotta con un miglioramento dell'outcome a breve termine<sup>1</sup>, ma la sopravvivenza del graft a 5 e 10 anni rimane subottimale<sup>2</sup>. Il ritorno alla terapia dialitica dopo la perdita del trapianto è associato a un'elevatissima mortalità e morbidità oltre una peggiore qualità di vita ed un incremento dei costi sanitari. In questo caso la terapia immunosoppressiva viene gradualmente scalata conducendo a un aumentato rischio di sensibilizzazione immunologica, con conseguente drastica riduzione della chance di trovare un donatore compatibile per un futuro trapianto<sup>1</sup>. Migliorare la sopravvivenza a lungo termine è quindi l'obiettivo principale della comunità trapiantologica internazionale.

I farmaci immunosoppressivi oggi disponibili sono estremamente efficaci nel bloccare la risposta alloreattiva, ma non esistono strumenti efficaci per poterne definire la dose terapeutica corretta per ogni singolo paziente. Le dosi di farmaci vengono generalmente definite sulla base dei livelli ematici o su considerazioni di tipo clinico, ma spesso risultano essere di fatto insufficienti (aumentato rischio di rigetto) o eccessive (aumentato rischio di infezioni e neoplasie) malgrado i farmaci vengano mantenuti nei target desiderati. La dose deve essere sufficiente a ridurre il rischio di rigetto, ma allo stesso tempo non deve essere eccessiva, perché esporrebbe inutilmente il paziente a un elevato rischio di nefrotossicità, di infezioni e di neoplasie. Purtroppo la dose ideale differisce profondamente, e in maniera non facilmente prevedibile, da paziente a paziente, a causa di una miriade di fattori. Tra di essi ricordiamo innanzi tutto la reattività immunologica del ricevente verso gli alloantigeni (“rischio immunologico”). La reattività immunologica individuale è legata a pregressi contatti con alloantigeni HLA (human Leukocyte Antigen), che avvengono in occasione di eventi quali gravidanze, trasfusioni, o precedenti trapianti, e di altri eventi poco conosciuti. Un secondo fattore rilevante è la diversità del patrimonio genetico HLA, chiamato mismatch, che si correla a un aumentato rischio di rigetto e disfunzione cronica del graft.

Altri fattori rilevanti che rendono necessaria l'individualizzazione della terapia sono la qualità dell'organo trapiantato e la suscettibilità di questo all'azione nefrotossica dei farmaci<sup>3</sup>, la suscettibilità del ricevente allo sviluppo di complicazione infettive e neoplastiche, e il tempo trascorso dal trapianto. Quest'ultimo fattore, in particolare, è di estrema rilevanza. Infatti, il rischio di rigetto si modifica enormemente nel corso del tempo. Tale modifica riguarda sia aspetti quantitativi (il rischio di rigetto acuto è massimo nei primi mesi dal trapianto) che qualitativi (il rischio di rigetto cronico anticorpo-mediato aumenta lentamente col trascorrere degli anni sino a costituire il

tipo pressoché esclusivo di rigetto)<sup>4</sup>. Anche il rischio di sviluppare infezioni si modifica enormemente nel tempo, sia per quel che riguarda la frequenza che il tipo di infezioni<sup>5</sup>.

Gli strumenti tradizionalmente impiegati dagli anni '80 sino ad oggi per guidare la terapia immunosoppressiva sono stati tre: gli indicatori di funzionalità renale (creatininemia, e proteinuria), i livelli ematici dei farmaci immunosoppressori e la biopsia renale.

Gli indici di funzionalità renale (creatininemia e proteinuria) sono marcatori tardivi e aspecifici.

Questi marcatori aumentano tardivamente quando il processo flogistico interessa ormai gran parte del parenchima renale e le prospettive terapeutiche sono limitate. D'altro canto sia la creatininemia che la proteinuria possono elevarsi in diverse condizioni cliniche diverse dal rigetto, ad esempio in corso di tossicità da inibitori della calcineurina<sup>6-8</sup> e di infezioni<sup>9-10</sup>, situazioni cliniche con approccio terapeutico opposto.

I livelli ematici dei farmaci immunosoppressori sono un parametro utile ma certamente insufficiente per stabilirne la posologia. Tali livelli sono infatti stabiliti da studi condotti nel paziente "medio", in condizioni "standard" e nei primi mesi dal trapianto. Le conoscenze su quali siano i livelli ematici ottimali dei farmaci sono inadeguate per definire il target nel singolo paziente, le cui esigenze immunosoppressive dipendono dalle varietà individuali citate precedentemente. Oltre ad esse, vorremmo ricordare che i livelli ottimali dei farmaci dipendono dal tipo e dalla posologia della terapia immunosoppressiva concomitante, che può differire enormemente da paziente a paziente<sup>11</sup>. Infine è ben noto che i farmaci immunosoppressori agiscano a livello intracellulare (cioè all'interno dei linfociti) e

che purtroppo i livelli ematici spesso non riflettano quelli misurati a livello intracellulare<sup>12-13</sup>.

La biopsia del rene trapiantato rappresenta tradizionalmente il “gold standard” per stabilire se l’immunosoppressione è adeguata nel singolo paziente. Purtroppo anche la biopsia ha dei grossi limiti. In primo luogo, non fornisce alcuna informazione riguardo all’ “eccesso” di immunosoppressione. Infatti, un risultato bioptico che indichi l’assenza di lesioni da rigetto non implica necessariamente che la dose immunosoppressiva somministrata sia in realtà in eccesso rispetto alle necessità del paziente. In secondo luogo, la reattività immunologica e il rischio di rigetto sono un processo fluido, in continuo divenire, che può modificarsi anche giornalmente, a seguito di vari fattori imprevedibili, quali le condizioni cliniche generali, le varie modifiche terapeutiche, ed eventi intercorrenti come le infezioni. La biopsia renale, essendo una procedura invasiva, non scevra da rischi, non può essere ripetuta quanto sarebbe necessario per catturare le continue modificazioni dello stato immunitario del paziente. In terzo luogo, la biopsia renale è uno strumento di diagnosi tardiva, diagnosticando lesioni infiammatorie acute o croniche ormai instaurate e non fornisce invece alcuna informazione precoce sul processo immunologico che porterà al futuro danno infiammatorio nel graft.

Negli ultimi anni la ricerca in ambito trapiantologico si è, infatti, focalizzata sulla ricerca di biomarcatori affidabili, riproducibili, non invasivi e poco costosi<sup>14</sup> in grado di evidenziare la reattività immunitaria globale, ma anche specifica nei confronti dell’allograft, di microrganismi e neoplasie, in grado di guidare la terapia immunosoppressiva adattandola alle caratteristiche del singolo paziente, impedendo un’eccessiva o una carente immunosoppressione, con l’obiettivo di migliorare gli outcomes a lungo termine del paziente e del graft.

E' ragionevole pensare che una migliore personalizzazione della terapia immunosoppressiva possa migliorare gli outcome dei trapianti attraverso un impiego più mirato dei farmaci attualmente disponibili.

Lo sviluppo di trattamenti individualizzati richiede l'utilizzo di biomarcatori per stratificare il grado di rischio di danno renale che siano affidabili, riproducibili, non invasivi e poco costosi<sup>14</sup>. Infatti, negli ultimi anni, la ricerca in ambito trapiantologico è focalizzata sulla ricerca di biomarcatori di alloreattività che possano identificare pazienti ad alto rischio di sviluppare rigetto acuto, ma anche infezioni e/o tumori a causa del sovradosaggio dell'immunosoppressione e che possano indirizzare il clinico verso il miglior approccio diagnostico e terapeutico.

La quantificazione della risposta immune consente di individualizzare la terapia immunosoppressiva e l'identificazione dei pazienti con alto grado di alloreattività permette di intensificare il trattamento immunosoppressivo impedendo lo sviluppo di rigetto. Al contrario l'identificazione di pazienti con basso grado di alloreattività o con eccessiva immunosoppressione consente di minimizzare la terapia immunosoppressiva prevenendo l'incidenza di infezioni



## **2. MONITORAGGIO IMMUNOLOGICO**

In questa sezione saranno descritti i test al momento utilizzati per il monitoraggio immunologico in ambito di trapianto di rene.

Per monitoraggio immunologico s'intende la quantificazione e la caratterizzazione della risposta immunologica alloimmune attraverso controlli seriatî non invasivi<sup>15</sup>.

La quantificazione della risposta immune consente di individualizzare la terapia immunosoppressiva. La caratterizzazione della risposta immunologica alloimmune permetterebbe invece la scelta del tipo di farmaci immunosoppressori.

Sono stati studiati diversi metodi di monitoraggio immunologico e alcuni di questi sono diventati strumenti indispensabili nella pratica clinica.

### **2.1 Biomarcatori**

I biomarcatori possono essere definiti come parametri biochimici, anatomici o molecolari che indicano o sono associati ad alterazioni cliniche significative<sup>14</sup>.

L'utilità di un dato biomarcatore è contesto-dipendente.

Infatti, in ambito trapiantologico, i biomarcatori sono utilizzati per: 1) stabilire la qualità dell'organo prima del trapianto; 2) predire/diagnosticare la possibilità di ritardata ripresa funzionale; 3) predire/diagnosticare un rigetto acuto; 4) definire il grado d'immunosoppressione; 5) predire/diagnosticare un danno cronico; 6) individuare uno stato di tolleranza<sup>3</sup>. Il biomarcatore ideale dovrebbe essere altamente sensibile e specifico, identificare uno stato infiammatorio prima della perdita della funzione renale, correlare con la risposta alla terapia e con l'outcome a lungo termine, essere riproducibile e non costoso<sup>1</sup>. Idealmente questi biomarcatori

dovrebbero guidare la riduzione della terapia immunosoppressiva nei pazienti a basso rischio e indirizzare verso strategie terapeutiche specifiche i pazienti ad alto rischio di rigetto.

Affinchè un biomarcatore possa essere d'utilizzo clinico tuttavia deve essere validato in una coorte di pazienti multicentrica e il test deve essere standardizzato in modo che ogni laboratorio qualificato possa riprodurre i risultati.

## **2.2 Monitoraggio immunologico mediante l'utilizzo dei biomarcatori**

I biomarcatori attualmente in utilizzo in ambito trapiantologico sono: 1. anticorpi anti-HLA (Human Leukocyte Antibodies), 2. Anticorpi anti antigeni non HLA, 3. Misura dell'alloreattività delle cellule T mediante ELISPOT, 4. dosaggio di mRNA urinario come biomarcatore di rigetto, 5. Dosaggio delle citochine urinarie CXCL 9 e 10, 6. Dosaggio di proteine sieriche, 7. Analisi genomica e proteomica. 8. Produzione di ATP da parte di linfociti T CD4+ mediante il test ImmunoKnow come indice del grado di immunosoppressione.

1. Anticorpi anti HLA: pazienti con anticorpi anti- HLA e in modo particolare quelli con anticorpi anti-HLA del donatore hanno un outcome significativamente peggiore<sup>16</sup>. Per questo motivo i sieri dei pazienti in lista d'attesa vengono routinariamente testati per verificarne la presenza e caratterizzarne le specificità. I pazienti che presentano al momento dell'offerta di un organo anticorpi anti HLA del donatore vengono automaticamente eliminati mediante quello che si definisce "virtual cross-match". Anche gli anticorpi anti HLA formati de novo post trapianto sono associati ad un danno d'organo in atto oppure incipiente<sup>17</sup>. In ogni caso, senza

terapie in grado di eliminare selettivamente gli alloanticorpi e/o in grado di trattare il danno renale da essi mediato, l'impatto clinico dell'identificazione dei pazienti immunizzati può essere marginale<sup>14</sup>.

2. Anticorpi diretti verso antigeni non HLA: anticorpi diretti verso antigeni polimorfici non HLA come ad esempio la catena A del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MICA) sono stati identificati come biomarcatori di outcome del graft<sup>18</sup>. La comparsa post trapianto di anticorpi anti-endotelio è stata associata a rigetto ricorrente con progressione del danno renale<sup>19</sup>. Questa classe di anticorpi ha un ruolo nel danno d'organo anche in trapianti diversi dal rene, ad esempio anticorpi diretti contro il collagene tipo V sono associati e precedono la comparsa di bronchiolite obliterante nel trapianto di polmone<sup>20</sup>.

3. Misura dell'alloreattività delle cellule T mediante ELISPOT: l'utilità di misurare la reattività delle cellule T memoria del ricevente nei confronti del donatore risiede nel fatto che questa correla con l'incidenza di rigetto acuto e disfunzione renale ed è quindi considerato un promettente biomarcatore di outcome<sup>21</sup> anche se con il limite della complessità e dell'elevato costo del test che rappresentano una barriera alla commercializzazione.

4. mRNA urinario: l'utilizzo di profili di espressione genica mediante PCR quantitativa su cellule urinarie può essere, sulla base della letteratura attuale, un test non invasivo in grado di diagnosticare e talvolta predire un rigetto acuto. Tra tutti, i livelli di mRNA di granzyma B<sup>22</sup> e A<sup>23</sup> correlano maggiormente con un rigetto acuto incipiente.

5. Dosaggio di chemochine urinarie: le chemochine sono importanti modulatori del danno renale. Diversi studi hanno mostrato che i livelli urinari delle citochine CXCL 9-10-11 sono aumentati in pazienti con rigetto acuto, danno tubulare,

nefropatia da poliomavirus BK rispetto che in condizioni di rigetto cronico o stabilità<sup>24-25-26</sup>.

6. Proteine sieriche: sono state riportate associazioni tra livelli di mieloperossidasi e livelli di proteine carbonilate con un aumentato rischio di rigetto nel trapianto di cuore<sup>27</sup>, mentre elevati livelli di KL-6 sierica si associano con bronchiolite obliterante nel trapianto di polmone<sup>28</sup>. Il vantaggio di avere biomarcatori sierici risiede nel fatto che il prelievo ematico è considerato un test non invasivo e di facile acquisizione.

7. Analisi genomica e proteomica: importanti dati si sono ottenuti dall'identificazione di uno score di rischio molecolare che predice in modo accurato il rischio di perdita del graft ottenuto da tessuto renale bioptico dal gruppo di Einecke<sup>29</sup>. I dati al momento disponibili indicano che l'analisi genomica di mRNA ottenuti da cellule di sangue periferico oppure da tessuto e la rapida evoluzione delle tecniche di proteomica possono potenzialmente fornire utili informazioni prognostiche ma necessita dello sviluppo di test validati, a basso costo e semplificati per guidare le decisioni nella pratica clinica<sup>14</sup>.

8. Test ImmuKnow: è un test approvato dalla FDA per misurare la produzione di ATP da parte delle cellule T CD4+ in risposta ad uno stimolo ed è considerato una misura funzionale del grado di immunodepressione e in grado di identificare pazienti a rischio di rigetto (se troppo poco immunodepressi) oppure al contrario a rischio di infezioni e neoplasie in caso di eccessiva immunodepressione<sup>30</sup>.

Attualmente, il monitoraggio seriale della presenza degli anticorpi anti-HLA del donatore e il dosaggio delle citochine urinarie costituiscono i due biomarcatori più promettenti. Il riscontro di anticorpi anti-HLA è associato a una riduzione della sopravvivenza del graft nel breve e lungo termine, ma ad oggi non esistono chiare

indicazioni su come trattare i pazienti con questi anticorpi per prevenire un'accelerata perdita di funzione del rene. Recentemente, sono state identificate citochine il cui incremento a livello urinario è stato associato a episodi di rigetto acuto. Queste potrebbero costituire dei biomarker per eseguire una diagnosi non invasiva di rigetto acuto, instaurare una terapia precoce e monitorare l'efficacia del trattamento<sup>22-31</sup>.

### 3. CXCL9 COME BIOMARCATORE DI RIGETTO ACUTO

CXCL9 è una chemochina interferon-gamma-dipendente rilasciata dalle cellule infiammatorie, tubulari e mesangiali in corso di rigetto<sup>1</sup>. Seguendo il gradiente di concentrazione di questa chemochina, i linfociti attivati CXCR3+ fuoriescono dai capillari ed entrano nell'interstizio renale invadendo i tubuli e glomeruli, richiamando a loro volta altri linfociti alloreattivi tramite un meccanismo autocrino e paracrino mediato dal CXCL9.

Questa molecola è stata, infatti, identificata in alte concentrazioni negli infiltrati linfocitari, nei tubuli e a livello glomerulare.

L'utilizzo nella pratica clinica del dosaggio di CXCL9 come biomarcatore è stato validato nello studio prospettico e multicentrico Clinical Trials in Organ Transplantation-01 (CTOT-01)<sup>31</sup> che è stato disegnato con lo scopo di validare l'utilità diagnostica e predittiva di un panel di biomarcatori di rigetto e disfunzione del graft. Sono stati arruolati 280 riceventi di graft renale sia da donatore cadavere (31.4%) che deceduto (68.6%) di cui 240 adulti (85.7%) e 40 pediatriche (14.3%). Tutti i candidati avevano un crossmatch negativo al trapianto e il picco pre-trapianto di PRA (Panel Reactive Antibody) era basso ( $12.9 \pm 25\%$ ). L'obiettivo era di determinare nei primi sei mesi post trapianto la relazione tra alcuni possibili biomarcatori, singolarmente oppure in associazione e alcuni endpoint clinici (rigetto acuto T cellulare clinico o subclinico almeno di grado IA secondo la classificazione Banff<sup>32</sup>, score di lesioni croniche secondo Banff  $\geq 2$ , incremento della fibrosi interstiziale  $> 15\%$ , perdita del graft o morte del paziente), mentre dai 6 ai 24 mesi post trapianto l'endpoint era la stabilità o meno (riduzione velocità di filtrazione

glomerulare, eGFR di almeno il 30% ) della funzionalità renale. Il regime d'immunosoppressione non era standardizzato ma lasciato alla pratica di ogni singolo centro arruolatore, sono state eseguite delle biopsie "per protocollo" al momento del trapianto e dopo sei mesi; L'indicazione all'esecuzione di biopsie non protocollari, ma all'insorgenza di problematiche cliniche, è stata lasciata a discrezione dei clinici. Sono stati raccolti dei campioni di sangue e urine pre-trapianto, al giorno 3, dopo 1 settimana e al primo, secondo sesto mese ed infine al primo e secondo anno post trapianto. Ogni paziente ha eseguito un follow-up per possibile comparsa di infezioni virali quelli citomegalovirus e poliomavirus BK. Sui campioni urinari raccolti in corso di rigetto, è stata analizzata sia l'espressione di cDNA per alcuni geni di cui era già stata riportata un'associazione con rigetto acuto (CCR1, CCR5, CXCR3, CCL5, CXCL 9, CXCL 10, IL-8, perforine e granzima B) sia la presenza di chemochine quali CXCL9 e 10.

E' stato dimostrato che i livelli urinari di CXCL9 sono significativamente più elevati nei pazienti con un rigetto acuto ( $\geq$ Banff IA) istologicamente dimostrato e precedono di circa 30 giorni la disfunzione renale clinicamente evidente<sup>22</sup>. Inoltre, l'assenza di CXCL9 in corso di un peggioramento acuto della funzione renale esclude un quadro di rigetto acuto con un valore predittivo negativo maggiore del 92%. I bassi livelli di CXCL9 nei pazienti stabili a sei mesi da trapianto identificano un sottogruppo di pazienti con basso rischio di sviluppo di rigetto acuto nei successivi 18 mesi. Al contrario la presenza di CXCL9 nei pazienti stabili e senza alterazioni della funzione renale a sei mesi dal trapianto, correla con l'evidenza istologica di tubulite alle biopsie eseguite per protocollo (non su indicazione clinica). Le infezioni, soprattutto quelle a genesi urinaria (batteriche ma anche da poliomavirus BK), comportano un aumento del CXCL9 nelle urine ma comunque

inferiore rispetto al rigetto acuto. Peraltro, queste infezioni possono essere, nella routine clinica, facilmente identificate dalle indagini diagnostiche specifiche.

I livelli di CXCL10 invece sono simili nei pazienti affetti da rigetto acuto o infezione e quindi di minor utilità clinica.

In conclusione lo studio CTOT-01 indica che il dosaggio dei livelli urinari di CXCL9 è da considerarsi un eccellente biomarcatore per stratificare il rischio di rigetto acuto incipiente e che bassi livelli di CXCL9 indicano un rischio immunologico basso che correla con una stabilità a lungo termine della funzione del graft<sup>31</sup>.

L'elevato valore predittivo negativo del CXCL9 nei pazienti clinicamente e immunologicamente stabili è stato confermato anche dallo studio del gruppo di Rabant<sup>33</sup>.

La misurazione della proteina urinaria CXCL9 è un test facile, rapido ed economico, che può essere agevolmente realizzato nei laboratori di ogni ospedale, tramite l'uso di un semplice kit ELISA disponibile in commercio.

Uno dei potenziali svantaggi della ricerca urinaria del CXCL9 è che, è allo stato attuale delle conoscenze, non è noto quale sia il risultato del test nei pazienti con rigetto mediato da anticorpi, sia nella sua forma acuta di rigetto, che in quella cronica o subclinica.

Infatti, il CXCL9 è un biomarcatore urinario che si è dimostrato utile nell'identificare i pazienti a basso rischio in riferimento al solo rigetto acuto mediato da cellule T. Il rigetto acuto mediato da cellule T è però un fenomeno che si sviluppa prevalentemente nei primi 3-6 mesi dal trapianto, ma è piuttosto nel follow-up di lungo termine che si incontrano le maggiori difficoltà nel distinguere i pazienti a



rischio di deterioramento della funzione del graft da quelli con prognosi favorevole.

In queste fasi dal trapianto il deterioramento del graft è prevalentemente legato al rigetto cronico mediato da anticorpi che rappresenta infatti di gran lunga la più importante causa di perdita dell'organo nel lungo termine<sup>4</sup>.

Se si dovesse dimostrare che l'alto valore predittivo negativo del CXCL9 è valido anche rispetto al rigetto cronico mediato da anticorpi oltre che a quello acuto mediato da cellule T, allora l'uso del monitoraggio tramite CXCL9 delle urine potrebbe assumere enorme utilità clinica anche nel follow-up di lungo termine.

## 4. IL NOSTRO STUDIO

### 4.1 Premessa allo studio

Uno dei principali obiettivi della medicina del trapianto è di quello di personalizzare la terapia immunodepressiva per evitare da un lato l'insorgenza di rigetto dall'altro d'infezioni e/o tumori. A tale scopo è fondamentale stratificare i riceventi di trapianto sulla base del loro rischio immunologico e per questo numerosi sono stati gli studi volti ad identificare e validare biomarcatori non invasivi e ripetibili utili per ottenere un monitoraggio immunologico.

Tra tutti il dosaggio urinario della chemochina CXCL9 si è dimostrato lo strumento più adeguato, non solo per individuare i pazienti con un rigetto acuto T cellulare in atto o in fase d'insorgenza<sup>14,33</sup> ma anche per individuare quel sottogruppo di pazienti immunologicamente stabili che si possono definire in quiescenza immunologica<sup>33</sup> grazie al suo elevato valore predittivo negativo.

Per ridurre l'incidenza di infezioni gravi e/o tumori molti sono i tentativi di minimizzazione della terapia immunodepressiva (sospensione terapia steroidea e degli inibitori della calcineurina, switch a mTOR inibitori) ma gli studi che riportano queste strategie mettono in evidenza un aumento dell'incidenza di rigetti acuti anche quando queste modifiche sono effettuate dopo biopsie protocollari negative per rigetto<sup>34-35</sup>.

L'elevato valore predittivo negativo del CXCL9 consente di stratificare il rischio immunologico dei pazienti prima di eventuali modifiche terapeutiche.

Nel nostro studio abbiamo analizzato i livelli di CXCL9 in pazienti clinicamente stabili, sottoposti a biopsia renale protocollare (III mese post trapianto) e in pazienti sottoposti a biopsia renale su indicazione clinica (peggioramento funzione renale,

comparsa di proteinuria). Negli stessi pazienti abbiamo valutato la presenza di anticorpi donatore-specifici (DSA), i livelli ematici di tacrolimus, la presenza di infezioni delle vie urinarie di infezione da CMV o BK virus più o meno associato a nefropatia da poliomavirus BK.

## **4.2 Obiettivi**

Obiettivo primario dello studio è di confermare l'elevato valore predittivo negativo di bassi livelli di CXCL9 nei pazienti clinicamente stabili che si possono definire in quiescenza immunologica.

Obiettivo secondario è stato quello di esaminare i livelli urinari di CXCL9 nei pazienti con lesioni da danno mediato da cellule T, che abbia causato una disfunzione acuta o cronica del graft.

A tale scopo abbiamo confrontato i livelli urinari di CXCL9 dei pazienti con lesioni da danno mediato da anticorpi, rispetto ai pazienti con rigetto mediato da cellule T, e dei pazienti con ottima e stabile funzione del graft.

## **4.3 Popolazione di studio**

Abbiamo arruolato tutti i riceventi di trapianto renale che da gennaio 2015 siano stati sottoposti a biopsia protocollare del graft tre mesi dal trapianto, come per routine clinica, o che siano stati sottoposti a biopsia del graft per indicazione clinica. Per essere arruolabili nello studio i pazienti dovevano avere un campione urinario disponibile per l'analisi del CXCL9. Nei pazienti che hanno ricevuto diagnosi

biptica di rigetto acuto, e nei quali era logisticamente possibile, è stato effettuare un monitoraggio urinario nei giorni successivi al trattamento per rigetto acuto.

#### **4.4 Terapia immunosoppressiva**

Tutti i pazienti a rischio immunologico standard seguiti presso il centro Trapianti di Parma ricevono una terapia immunosoppressiva che include un'induzione con basiliximab (20 mg il giorno 0 e il giorno 4) o Thymoglobuline (1.25-1.50 mg/Kg ripetuta per 4-5 giorni) secondo le linee guida KDIGO<sup>36</sup> e una terapia di mantenimento con tacrolimus, steroide e mofetil micofenolato. Il target dei livelli ematici di tacrolimus è compreso tra 6-12 ng/ml per i primi trenta giorni post trapianto e in seguito 5-10 ng/ml. Il mofetil micofenolato è somministrato con una posologia di 2g in due somministrazioni al giorno per il primo mese post trapianto e successivamente 1g/die. Una minoranza di pazienti è stata trattata con ciclosporina microemulsione con livelli ematici valle target tra 100-150 ng/ml. Alcuni pazienti sono in terapia con mTOR inibitori (everolimus).

#### **4.5 Monitoraggio delle infezioni**

Tutti i pazienti hanno ricevuto una profilassi antimicrobica standard con trimetoprim-sulfametossazolo per la prevenzione dell'infezione da *Pneumocystis jirovecii* per 12 mesi post trapianto. La riattivazione dell'infezione sostenuta da Citomegalovirus è stata monitorata mediante la ricerca dell'antigene pp65 nei leucociti e mediante la quantificazione dell'acido nucleico nel plasma secondo il protocollo del centro.

Tutti i pazienti sono inoltre stati sottoposti routinariamente a screening per infezione da poliomavirus BK mensilmente per i primi sei mesi e successivamente ogni sei mesi per tutta la durata del trapianto. Il test per la carica virale sierica di BK virus è stata condotta come per routine clinica al Laboratorio di Virologia dell'Ospedale Maggiore di Parma tramite LabPlus™. Il laboratorio conduce indagini sulla ricerca degli acidi nucleici sierici solo qualora risulti positiva la ricerca di acidi nucleici del BK virus allo screening urinario. Lo screening urinario è stata condotto come per routine clinica a 1, 3 mesi e ad un anno dal trapianto e in caso di indicazione clinica o di biopsia renale. La diagnosi di nefropatia associata a BK virus (BKVAN, BK virus associated nephropathy) è stata basata sul riscontro delle tipiche alterazioni citopatiche virali alla biopsia, confermate dalla positività dell'indagine immunohistochimica per SV40. Tuttavia, il riscontro di oltre 10,000 copie virali sul siero confermato in almeno due occasioni a distanza di almeno un mese veniva comunque considerato fortemente sospetto di BKVAN, anche in assenza di chiare alterazioni citopatiche virali all'indagine istologica del graft.

Il monitoraggio delle infezioni secondo il nostro protocollo prevede inoltre l'esecuzione di un'urocoltura settimanale per i primi tre mesi post trapianto e successivamente mensile per il primo anno o in caso di comparsa di sintomatologia urinaria.

#### **4.6 Valutazione del Luminex® Single Bead Antigen**

La tecnica Luminex® costituisce una metodica di citofluorimetria a flusso e permette sia la ricerca di anticorpi e quindi la determinazione del PRA, sia di determinarne la specificità. Il principio del test si basa sull'incubazione del siero del

ricevente con microbiglie la cui superficie è ricoperta da un singolo antigene HLA. Viene poi aggiunto un anticorpo anti-IgG fluorescente che ha la funzione di legare l'eventuale anticorpo anti-HLA. La presenza è poi svelata dal Luminex ®. Nonostante si tratti di una metodica qualitativa esiste la tendenza a servirsi di questa tecnica come di un metodo quantitativo attribuendo all'intensità del segnale emesso, *mean fluorescence intensity* (MFI), il significato di titolo anticorpale. Il rischio di sviluppare un rigetto anticorpale aumenta all'aumentare dell'intensità della fluorescenza dei DSA svelati al Luminex prima del trapianto.

Lo screening di anticorpi donatore-specifici (DSA, donor-specific antibodies) è stata condotta tramite FlowPRATM beads rappresentanti gli antigeni HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ and -DP (One Lambda, Canoga Park, CA). Se positiva, la determinazione delle specificità anticorpali è stata condotta usando LABScreenTM single antigen beads usando una soglia di intensità di MFI di 500 (One Lambda).

La determinazione del Luminex è stata eseguita, come da protocollo, una volta al mese per i primi tre mesi e poi semestralmente oppure su indicazione clinica. L'analisi è stata svolta utilizzando il kit Luminex Assay (LIFECODES; Gen-Probe, Stamford, CT) nel laboratorio di Immunogenetica dell'Ospedale di Parma. I campioni sono stati analizzati con Luminex IS100 (Luminex, Austin, TX) e i dati con Quick Type software (Gen-Probe, Stamford, CT).

La raccolta di campioni per la ricerca di alloanticorpi HLA circolanti è stata fatta per routine clinica.

#### **4.7 Stima della funzione renale**

La funzione renale è stata stimata sulla base della formula CKD-EPI<sup>37</sup>. La proteinuria e l'albuminuria sono stati misurati rispettivamente come rapporto tra proteinuria e creatininuria (gr/gr) e albuminuria e creatininuria (mg/gr). I dati clinici sono stati estratti dalle cartelle cliniche dove erano raccolti come per routine clinica. L'ipertensione arteriosa è stata classificata come la necessità dell'uso di farmaci anti-ipertensivi. La raccolta dei dati riguardanti funzione renale è stata realizzata ai tempi post trapianto di 15 giorni, 1, 3, 6 e 12 mesi, e poi ogni anno.

#### **4.8 Diagnosi bioptica e trattamento del rigetto**

La biopsia del rene trapiantato è stata eseguita su indicazione clinica in caso di peggioramento della funzione renale (incremento della creatininemia > del 15%) e/o comparsa di proteinuria maggiore a 1 g/die oppure "per protocollo" al terzo mese post trapianto. L'analisi istologica in microscopia ottica e le indagini di immunohistochimica è stata eseguita presso il Dipartimento di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero-universitaria di Parma, mentre l'immunofluorescenza è stata eseguita presso il laboratorio di Immunopatologia renale del nostro Dipartimento.

La diagnosi di rigetto acuto documentato da biopsia (BPAR, biopsy-proven acute rejection) è stata fondata sui criteri Banff per la diagnosi di rigetto acuto mediato da cellule T<sup>32,38-39-40-41</sup> definito come di tipo IA o più severo sulla base della presenza di tubulite con foci di almeno 5 cellule per sezione trasversa (score  $t \geq 2$ ) in associazione a infiltrato interstiziale in oltre un quarto del frustolo (score  $i \geq 2$ ). La

diagnosi di infiammazione microvascolare “almeno moderata” ( “at least moderate microvascular inflammation” ) è stata fondata sui criteri Banff 2014<sup>42</sup> che definiscono la flogosi microvascolare come “moderata” quando la somma degli score ptc e g è  $\geq 2$ . Lo score ptc definisce la presenza di capillarite peritubulare ed è pari ad 1 quando oltre il 10% dei capillari peritubulari corticali contengono almeno tre cellule infiammatorie (monociti e neutrofili), ed è pari a 2 o 3 quando le cellule infiammatorie sono rispettivamente oltre 5 od oltre 10; lo score g definisce la completa o parziale occlusione di almeno un capillare glomerulare da parte di infiltrati leucocitari e rigonfiamento endoteliale, ed è pari a 1, quando sono affetti meno del 25% dei glomeruli, mentre è pari a 2 o 3 quando sono affetti rispettivamente oltre il 25% ed il 75% dei glomeruli. La soglia di 2 della somma dello score ptc e g, è stata scelta da Banff perché ne è stata provata l’associazione con il successivo sviluppo di glomerulopatia da trapianto.

La terapia del rigetto acuto mediato da cellule T è stabilita secondo il risultato della biopsia renale:

- 1) T-cellulare tipo I sec BANFF (tubulite): boli di metilprednisolone 3-7 mg/kg in tre somministrazioni
- 2) T-cellulare tipo II sec BANFF (arterite intimale) e rigetto steroideo-resistente: in aggiunta ai boli di metilprednisolone thymoglobuline 1.5 mg/kg/die per una dose cumulativa minima di 4.5 mg/kg e massima di 12 mg/kg.
- 3) I casi clinicamente resistenti di rigetto T-cellulare di tipo I si trattano con thymoglobuline come sopra. Per rigetto steroideo-resistente si intende una mancata discesa della creatinina entro il 33% dei valori basali, dopo 7 giorni dall’inizio dei boli endovenosi di metilprednisolone, oppure un ulteriore progressivo aumento dopo 48ore dall’inizio dei boli.



La terapia del rigetto acuto anticorpo-mediato dipende dal grado di deterioramento della funzione renale e prevede boli di metilprednisolone (10 mg/kg) per almeno tre giorni, plasmferesi (circa 7 sedute) con rimpiazzo di Immunoglobuline ev (100 mg/kg). Se il quadro della microscopia ottica mostra anche arterite intinale si aggiunge alla terapia la somministrazione di thymoglobuline 1.5 mg/kg con dose minima complessiva di 4.5 mg/kg. Al termine delle plasmferesi può essere presa in considerazione la somministrazione di rituximab 375mg/m<sup>2</sup>.

#### **4.9 Protocollo di misurazione di CXCL9 mediante Quantikine ELISA (R&D systems®)**

Per la quantificazione del CXCL9 il materiale biologico utilizzato è dato da campioni di urina raccolti il mattino prima dell'esecuzione dell'agobiopsia del rene trapiantato, per poi essere processati entro quattro ore dalla raccolta.

Le urine sono state centrifugate a 2000 gpm, per 30 minuti alla temperatura di 4°C, per consentire la precipitazione degli elementi cellulari in essi contenuti. Il surnatante è stato quindi stoccato e congelato a -80°C, assegnandovi un codice alfanumerico che garantisca la privacy del paziente.

Il CXCL9 urinario è stato dosato utilizzando il Quantikine ELISA kit (R&D systems®).

I kit sono stati conservati a temperature tra 4-8°C fino al momento dell'utilizzo, essi sono costituiti da:

- Una piastra in polietilene con 96 pozzetti sul cui fondo sono fissate immunoglobuline monoclonali specifiche per MIG umane.

- 2 vials di CXCL9 umane ricombinanti in soluzione tampone a base di proteine (human CXCL9 standard).
- 21mL di anticorpi monoclonali specifici per CXCL9 umane coniugate con perossidasi di armoracia come conservante (human CXCL9 conjugate).
- 11 mL di soluzione tampone proteica con conservante (diluente RD1W).
- 21 mL di soluzione proteica tampone concentrata, da usare in diluizione 1:5 per campioni costituiti da sospensioni cellulari, 1:2 per campioni costituiti da siero e plasma (RD5P)
- 21 mL di soluzione tensioattiva tamponata, concentrata 25 volte, con conservanti (diluente RDSP concentrato)
- 12 mL di perossido di idrogeno stabilizzato (color reagent A).
- 12 mL di cromogeno tetrametilbenzidina (color reagent B)
- 6 mL di acido diaminosolforico (stop solution)

Soluzione tampone: sono stati aggiunti 20 mL di soluzione tampone concentrata ad acqua deionizzata/distillata fino ad ottenere 500 mL di soluzione di lavaggio tamponata.

Soluzione substrato: i reagenti A e B, portati a temperatura ambiente, sono stati mescolati in eguali volumi e tenuti al riparo da fonti luminose. 200  $\mu$ L di tale soluzione è stata inserita in ogni pozzetto.

Diluente calibrante: a 10 mL di RD5P concentrato sono stati aggiunti 40 mL di acqua deionizzata/distillata per ottenere 50 mL di RDSP diluito 1:5.

Human MIG standard: la soluzione human CXCL9 standard è stata ricostituita con acqua distillata per ottenere una soluzione a concentrazione 20000 pg/mL che viene successivamente diluita scalarmente 1:2 (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 pg/mL). La concentrazione 2000 pg/ml è utilizzata come limite massimo mentre il diluente calibrante è il controllo negativo. Sono stati utilizzati controlli positivi e negativi interni. Come controllo positivo interno sono state prese urine da un volontario sano, processate come in precedenza e aggiunto CXCL9 ricombinante umano alla concentrazione di 2000 pg/mL. Il controllo negativo interno è rappresentato dall'urina dello stesso volontario sano non centrifugata.

Il protocollo per l'esecuzione del saggio prevede:

1. la rimozione delle file della micropiastra in eccesso dal supporto, rimesse nel contenitore in alluminio essiccante, poi richiuso.
2. L'aggiunta di 100  $\mu$ L di RD1W in ogni pozzetto,
3. Il trasferimento di 100  $\mu$ L di soluzione standard, campione o soluzione controllo per pozzetto e copertura con le strisce adesive in dotazione, lasciando incubare per 2 ore a temperatura ambiente.
4. Aspirazione e lavaggio di ciascun pozzetto per tre volte, fino ad un totale di quattro lavaggi, utilizzando la soluzione di lavaggio ed uno spruzzatore.
5. Rimozione per aspirazione di ogni rimanenza e il ribaltamento della piastra tamponata con carta assorbente.
6. L'aggiunta di 200  $\mu$ L di human CXCL9 conjugate in ogni pozzetto, coperti con altre strisce adesive e lasciati incubare per due ore a temperatura ambiente.
7. Ripetizione della sequenza lavaggi/aspirazioni descritta al punto 4.
8. L'aggiunta di 200  $\mu$ L di soluzione substrato in ogni pozzetto, l'incubazione per trenta minuti a temperatura ambiente, lontano da fonti luminose.

9. L'aggiunta di 50  $\mu$ L di soluzione stop in ogni pozzetto, ciò ha comportato un cambiamento di colore dal blu al giallo.

10. La valutazione della densità ottica di ciascun pozzetto, con lettura a 450 nm e 550 nm, successiva sottrazione delle due letture, rimozione del fondo e formulazione della curva standard usata per il calcolo della concentrazione.

#### **4.10 Raccolta dati**

La raccolta dei dati è stata eseguita mediante un archivio informatico creato ad hoc. Ad ogni paziente è stato attribuito un codice, che preserva l'anonimato dei soggetti inclusi.

##### **Analisi statistiche**

Abbiamo calcolato il valore diagnostico del CXCL9 urinario separatamente per la diagnosi di BPAR e di infiammazione microvascolare. Abbiamo calcolato i limiti di confidenza della sensibilità, specificità, valore predittivo negativo e positivo del test con un estimatore robusto della varianza per tenere conto della presenza di osservazioni multiple per singolo paziente. Le differenze tra due campioni indipendenti nelle variabili continue le abbiamo testate con il t-test o con il test di Mann-Whitney, quando appropriato, quelle nelle variabili categoriche, tramite il test esatto di Fisher. L'andamento della funzione renale è stata valutata con modelli misti (via REML) di regressione multipla per misure ripetute. I modelli di regressione sono stati aggiustati per valori di confondimento stabiliti a priori. Abbiamo considerato statisticamente significativo un valore della P su due code inferiore a 0.05. Le analisi statistiche sono tutte state condotte con il pacchetto di statistica Stata release 14.0 (2016, StataCorp, College Station, Tx, USA).

## **5. RISULTATI**

### **5.1 Caratteristiche basali dell'intera popolazione di studio**

La popolazione dei pazienti arruolati nello studio consiste di 59 pazienti, di età adulta, di origine caucasica, riceventi di trapianto di rene (n=57) o di trapianto simultaneo di rene-pancreas(n=2), la maggior parte dei quali proveniente da donatore cadavere (n=43). Sei di questi pazienti hanno ricevuto un trapianto ABO incompatibile (Tabella 1). La durata del trapianto varia da mesi a mesi.

18 pazienti hanno ricevuto una terapia di induzione con Thymoglobuline, 41 pazienti con basiliximab, di cui 6 pazienti trattati con rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>) 28 giorni prima dell'intervento chirurgico come da protocollo di desensibilizzazione per trapianto ABO incompatibile. (Tabella 1).

La maggior parte dei pazienti ha ricevuto una terapia immunosoppressiva di mantenimento con steroidi, tacrolimus e micofenolato mofetile (Tabella 1).

### **5.2 Rigetto acuto e cronico.**

Ventisette dei 59 pazienti dello studio (45,7%) hanno una diagnosi di rigetto durante il follow up: 17(28,8%) un rigetto acuto tipo IA/IB sec Banff (Tabella 2); 3 (5,1%) un rigetto IIA, IIB sec Banff; 4 (6,7%) un rigetto anticorpo-mediato oppure misto e 1 (1,7%) un rigetto "borderline". Due (3,4%) pazienti hanno avuto una diagnosi istologica di rigetto cronico con glomerulopatia cronica post trapianto (Tabella 2).

### **5.3 Infezioni**

17 pazienti su 59 (28.8%) hanno avuto infezioni virali da CMV o BKV .

In 5 pazienti (8.4%) è stata riscontrata replicazione plasmatica di BK virus e 2 di questi (3,3%) hanno sviluppato nefropatia da BK virus.

L'infezione da CMV si è verificata in 12 pazienti (20%).

19 pazienti su 59 (32,2%) hanno avuto infezione delle vie urinarie ad eziologia batterica. (Tabella2)

### **5.4 Elaborazione dati**

Le caratteristiche della popolazione di studio sono riportate nella Tabella 1. Sono stati arruolati 59 pazienti, solo 19 dei quali sottoposti a biopsie protocollari a tre mesi dal trapianto, i rimanenti sono stati sottoposti ad almeno una biopsia per indicazione clinica.

Come mostrato in Tabella 1, il follow-up mediano è stato di 5 valutazioni della funzione renale per paziente (un anno dal trapianto) con un minimo di tre (tre mesi dal trapianto) e un massimo di 22 (18 anni dal trapianto). Nei 59 pazienti sono state eseguite complessivamente 75 biopsie (massimo 4 biopsie per paziente), ma solo in 65 casi (massimo 3 per paziente) è stato possibile determinare il CXCL9 urinario in concomitanza con la biopsia. Altre cinque misurazione erano state eseguite in corrispondenza di episodi clinici non diagnosticati tramite biopsia. La Figura 1 mostra la distribuzione delle misurazioni dell'eGFR nella popolazione di studio:

evidenziate in rosso, sono le occasioni in cui è stato possibile determinare il CXCL9 urinario (Figura 1).

La Figura 2 mostra invece evidenziati in rosso i casi di BPAR, o infiammazione microvascolare (“microvascular inflammation”) che il CXCL9 urinario si propone di identificare (Figura 2).

Complessivamente 14 (23.7%) pazienti hanno avuto almeno una diagnosi di BPAR e 10 pazienti (16.9%) una diagnosi di infiammazione microvascolare. In 19 dei 59 pazienti (32.2%) la biopsia mostrava BPAR e/o infiammazione microvascolare. L'infiammazione microvascolare in assenza di BPAR era presente in 5 dei 19 pazienti (26.3%), mentre il BPAR in assenza di infiammazione microvascolare era presente in 9 dei 19 pazienti (47.4%). I rimanenti cinque dei 19 pazienti (26.3%) avevano sia BPAR che infiammazione microvascolare. Siccome cinque dei 14 pazienti con BPAR (35.7%) avevano anche infiammazione microvascolare contro solo 5 dei 45 pazienti senza BPAR (11.1%) ( $P=0.047$ ), l'infiammazione microvascolare si dimostrava essere una lesione spesso associata alla presenza di BPAR.

Nella maggioranza dei casi (52/70, 74.2%) il CXCL9 urinario è risultato assente. Il 75° e 95° percentile del CXCL9 urinario erano rispettivamente di 14 e 428 pg/mL, col massimo valore pari a 6408 pg/mL. Solo in 7 delle 70 misurazioni (10%) il CXCL9 è risultato superiore ai valori di normalità di 200 pg/mL. In 65 dei 70 casi il CXCL9 urinario è stato misurato in concomitanza con la biopsia del graft. I sette casi di CXCL9 urinario positivo ( $\geq 200$  pg/mL) sono compresi nei 65 di cui è disponibile il dato bioptico.

La performance diagnostica del CXCL9 urinario nei confronti del BPAR e della infiammazione microvascolare è riportata in Tabella 2. Per entrambi, il CXCL9 mostrava scarsa sensibilità ma elevata specificità, rispettivamente di 90.7%

(95%CI: 72.7 – 97.3) per il BPAR e 93.3% (95%CI: 83.5-97.5), indicando che difficilmente pazienti senza BPAR e/o infiammazione microvascolare presentavano CXCL9 urinario positivo. Ciò si rifletteva in un elevato valore predittivo negativo pari a 84.5% (95%CI:71.0-92.4) per il BPAR e addirittura 96.6% (95%CI: 87.0-99.1) per l'infiammazione microvascolare, suggerendo che il CXCL9 possa essere un valido ausilio diagnostico per identificare uno stato di quiescenza immunologica.

Non solo il CXCL9 urinario sembra identificare i casi di quiescenza immunologica, esso sembra anche identificare la condizione di recupero della quiescenza immunologica, che si può raggiungere a seguito di un efficace trattamento per rigetto acuto (BPAR o infiammazione microvascolare). Dei sette casi con CXCL9 positivo, ben tre sono stati identificati in un singolo paziente, il cui andamento della funzione renale e del CXCL9 sono stati monitorati in maniera serrata e riportati in Figura 3 a titolo esemplificativo. Tale figura mostra che per tale paziente il recupero della funzione renale e la sua successiva stabilizzazione, attorno ad un eGFR di 30mL/min, si sono associati alla negativizzazione dei CXCL9 urinario (i valori negativi sono quelli che appaiono sotto la linea tratteggiata rossa di 200 pg/mL). Non mostrato nella figura, la negativizzazione del CXCL9 urinario si è anche associata alla scomparsa di lesioni infiammatorie alla biopsia (quarta ed ultima delle biopsie eseguite), supportando l'idea che il raggiungimento dello stato di quiescenza immunologica dopo il rigetto si associ alla negativizzazione del CXCL9 urinario (Figura 3).

Un altro paziente esemplificativo è riportato in Figura 4. Anche in tale caso la negativizzazione dei valori del CXCL9 urinario (valori al di sotto di 200 pg/mL) dopo il rigetto acuto (BPAR e infiammazione microvascolare) si sono associati ad una stabilizzazione dell'eGFR (Figura 4).



Ad ulteriore supporto del fatto che la negativizzazione del CXCL9 urinario si associ al raggiungimento di uno stato di quiescenza immunologica dopo rigetto acuto/attivo, abbiamo confrontato l'ultimo valore di eGFR dei pazienti arruolati nello studio, suddividendoli secondo la diagnosi istologica di rigetto acuto/attivo (BPAR, infiammazione microvascolare, o almeno una delle due diagnosi) e secondo l'aver mai presentato o no valori positivi di CXCL9 urinario. I cinque pazienti che hanno presentato i sette valori positivi di CXCL9 urinario (in tutti i casi ciò si è verificato in associazione a diagnosi di rigetto acuto/attivo) hanno successivamente visto il CXCL9 urinario negativizzarsi come conseguenza della risoluzione del rigetto acuto/attivo. Nei pazienti senza e con BPAR, senza e con infiammazione microvascolare, e senza e con almeno una delle due diagnosi, l'eGFR era rispettivamente in media di 51.0 (SD 3.2) e 42.1 (4.7) mL/min/1.73m<sup>2</sup> (P=0.16), 52.6 (SD 2.7) e 30.9 (6.1) mL/min/1.73m<sup>2</sup> (P=0.002), e 54.1 (3.1) e 37.2 (4.3) mL/min/1.73m<sup>2</sup> (P=0.003). Al contrario nei pazienti senza e con storia di CXCL9 positivo l'eGFR era 47.7 (SD 2.5) e 61.9 (16.2) mL/min/1.73m<sup>2</sup> (P=0.14), cioè addirittura numericamente più alto nei soggetti con storia di CXCL9 urinario positivo (per tutti, infatti, il CXCL9 si era successivamente negativizzato). Ciò si è osservato malgrado che il CXCL9 si sia associato ad un peggioramento della funzione renale durante la fase acuta del rigetto. Infatti, i valori di eGFR medi predetti tramite modelli di regressione multipla in pazienti senza e con CXCL9 urinario positivo a trenta giorni dal trapianto erano rispettivamente di 50.2 mL/min/1.73m<sup>2</sup> (95%CI: 45.1-57.3) e 32.3 mL/min/1.73m<sup>2</sup> (95%CI: 14.5-49.6) (P=0.071).

## 6. DISCUSSIONE

I riceventi di trapianto renale sono sottoposti a una terapia immunosoppressiva per tutta la durata del trapianto, questo li espone a un aumentato rischio di infezioni e neoplasie. D'altro canto la riduzione dell'immunosoppressione espone i pazienti a rischio di sviluppare episodi di rigetto acuto e cronico con conseguente aumentato rischio di perdita dell'organo, morbidità e mortalità del paziente.

È quindi di cruciale importanza identificare lo stato immunologico specifico di ciascun paziente in ogni determinato momento al fine di personalizzare la terapia immunosoppressiva per minimizzarne gli effetti collaterali e massimizzarne l'efficacia nel prevenire il rigetto.

La chemochina CXCL9 è stata dimostrata essere un biomarcatore urinario di rigetto acuto cellulare, non invasivo, ripetibile, poco costoso e veloce da dosare, ma nessuno studio finora aveva analizzato il suo ruolo di biomarcatore di quiescenza immunologica.

Per essere tale infatti la molecola deve essere non rilevabile, se non in bassissime concentrazioni, in assenza di infiltrato infiammatorio del parenchima renale.

Nel nostro studio abbiamo analizzato le urine di pazienti con funzione renale stabile, assenza di proteinuria patologica, assenza di alloanticorpi donatore-specifici evidenziati tramite la metodica Luminex, sottoposti ad agobiopsia renale protocollare al terzo mese post trapianto. Tutti i pazienti con assenza di rigetto istologicamente dimostrabile presentavano valori di CXCL9 inferiori al cut-off di positività di 200 pg/mL, come da studi precedenti.

Abbiamo inoltre analizzato la concentrazione urinaria di CXCL9 in pazienti sottoposti a biopsia per peggioramento della funzione renale e/o comparsa di

proteinuria patologica. Tra questi tutti i pazienti con elevazione di CXCL9 urinario oltre i 200 pg/mL presentavano diagnosi istologica di rigetto acuto.

Monitorando l'andamento delle concentrazioni urinarie di CXCL9 per i primi due mesi dall'inizio del trattamento antirigetto, possiamo distinguere pazienti con risposta alla terapia, in cui i valori di CXCL9 si normalizzavano entro una settimana dall'inizio della terapia in associazione a un miglioramento della funzione renale.

Al contrario, i pazienti con persistenti valori urinari di CXCL9 >200 pg/mL dopo una settimana dall'inizio della terapia, presentavano una disfunzione renale, talvolta documentata istologicamente, che richiedeva terapia di secondo livello.

Infine la normalizzazione dei valori di CXCL9 urinario nonostante la persistente disfunzione del graft, metteva in evidenza altre cause di danno renale, quali ad esempio un'infezione da virus BK, documentata tramite indagini microbiologiche specifiche.

La chemochina CXCL9 sembra quindi essere un biomarcatore di quiescenza alloimmunitaria, non invasivo, ripetibile e affidabile nel selezionare i pazienti con assenza di segni di rigetto primitiva o secondaria a un'efficace terapia immunosoppressiva anti-rigetto. Il monitoraggio dell'andamento delle concentrazioni seriate di CXCL9 urinario in corso di terapia per rigetto acuto ci permette inoltre di monitorarne precocemente la risposta: la mancata normalizzazione entro la prima settimana depone per un rigetto resistente con necessità di terapie di secondo livello.

## 7. APPENDICE A: Tabelle

**Tabella 1:** Caratteristiche basali della popolazione

Number of subjects		59
<b>Observations per pt</b>	<i>Number</i>	5 (3-22)
<b>Biopsy/CXCL9 assessments per pt</b>	<i>Number</i>	1 (1-3)
<b>Donor's Age</b>	<i>Yrs</i>	55.2 (18.0)
<b>Recipient's Age</b>	<i>Yrs</i>	50.3 ( $\pm$ 12.5)
<b>Male Gender</b>	%	35 (59.3)
<b>Caucasian Race</b>	%	54 (91.5)
<b>Dialysis vintage</b>	<i>Months</i>	49.0 (1-384)
<b>Primary Renal disease</b>		
<i>Glomerular</i>	%	12 (20.3)
<i>Vascular</i>	%	3 (5.0)
<i>Tubulo-interstitial</i>	%	5 (8.4)
<i>Diabetes</i>	%	6 (10.1)
<i>ADPKD</i>	%	11 (18.6)
<i>Others and unkown</i>	%	22 (37.2)
<b>Living Donor</b>	%	16 (27.1)
<b>Cold ischemia Time (deceased donor)</b>	<i>Hours</i>	12.9 (4.6)
<b>HLA-A/B mismatch</b>	<i>Number</i>	2 (2-3)
<b>HLA-DR mismatch</b>	<i>Number</i>	1 (1-1)
<b>Re-transplantation</b>	%	1 (1.6)
<b>pre-transplant HLA antibodies</b>	%	19 (32.2)
<b>CDC PRA&gt;5%</b>	%	12 (20.3)
<b>pre-transplant DSA HLA antibodies</b>	%	0 (0.0)
<b>Thymoglobulin</b>	%	18 (30.5)
<b>Basiliximab</b>	%	41 (69.4)
<b>Cyclosporine</b>	%	5 (8.4)
<b>Steroid withdrawal</b>	%	0 (0.0)
<b>Pts undergoing protocol biopsy</b>	%	11 (18.6)

Continuous variables are reported as mean (standard deviation) or median (interquartile range), categorical variables as number (percentage) HLA antibodies, HLA antibodies detected by Luminex platform. cPRA, Calculated Panel Reactive Antibody; DSA, Donor-specific antibodies

**Tabella 2:** Rigetti ed infezioni

**RIGETTO ACUTO E CRONICO E INFEZIONI**

---

<b>Rigetto acuto (diagnosi istologica)</b>	
Tutti	27 (45,7%)
Banff tipo IA/IB cellulo mediato	17 (28%)
Banff tipo IIA/IIB cellulo mediato	3 (5,8%)
Anticorpo mediato o misto	4 (6,7%)
Borderline	1 (1,7%)
<b>Rigetto cronico</b>	
Tutti	2 (3,3%)
Con glomerulopatia post-trapianto C4d positivo	2 (3,3%)
<b>Complicazioni infettive</b>	
BKV plasma	5 (8,4%)
Nefropatia BKV associata	2 (3,3%)
Infezione da CMV	12 (20,3%)
Infezioni del tratto urinario	19 (32,2%)

---

I dati sono riportati in forma numerica (percentuale).

BKV (Poliomavirus BK), CMV (Citomegalovirus).

## 8. APPENDICE B: Figure

Figura 1

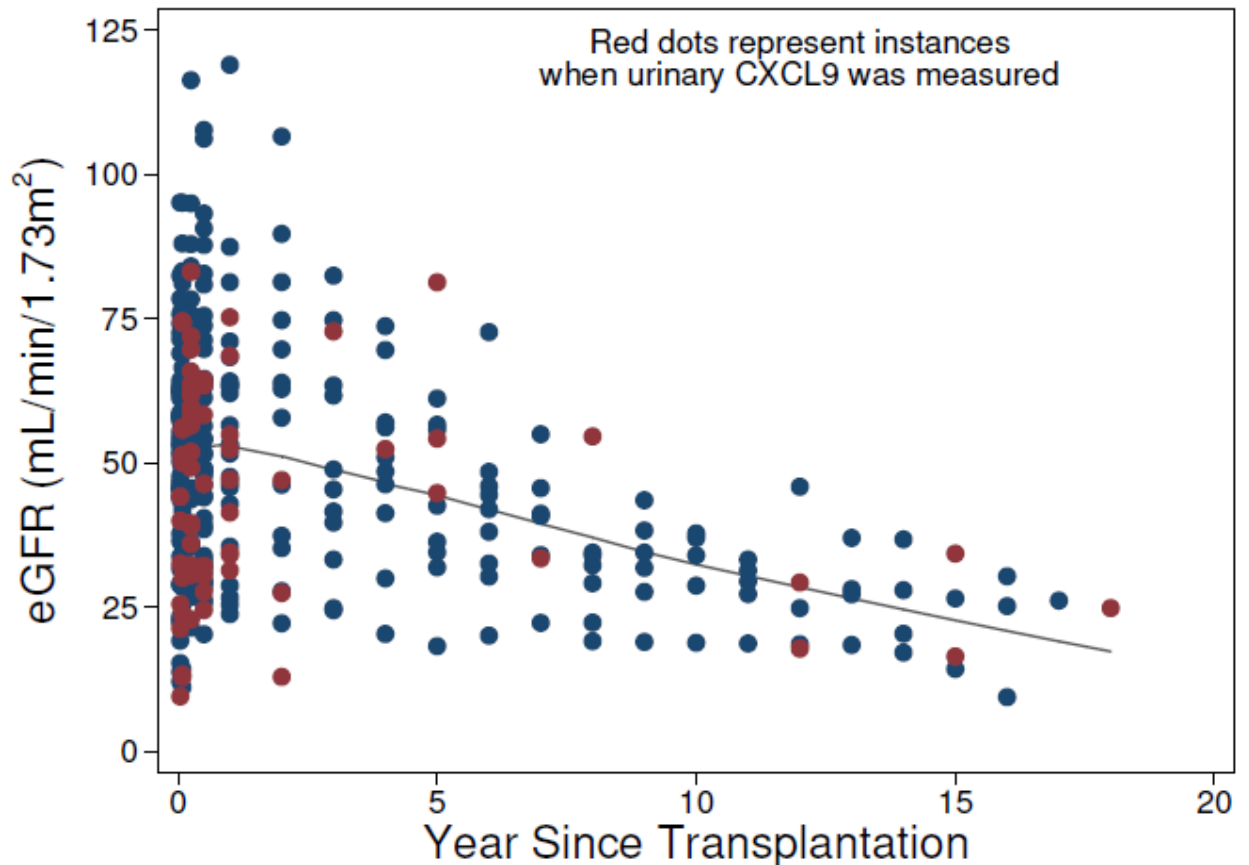


Figura 1. Misurazione dell'eGFR nella popolazione dei pazienti in studio. I cerchi evidenziati in rosso rappresentano i momenti in cui è stato possibile determinare il CXCL9. In 65 occasioni (59 pazienti) vi è stata la concomitante determinazione di CXCL9 urinario e biopsia del graft. La linea grigia rappresenta l'andamento della funzione renale stimata tramite lowess (locally weighted least sum of squares). Il declino dell'eGFR potrebbe nell'arco del tempo potrebbe essere sovrastimato dalla selezione di pazienti con trapianto di lunga data ed indicazione alla biopsia per peggioramento della funzione renale.

Figura 2

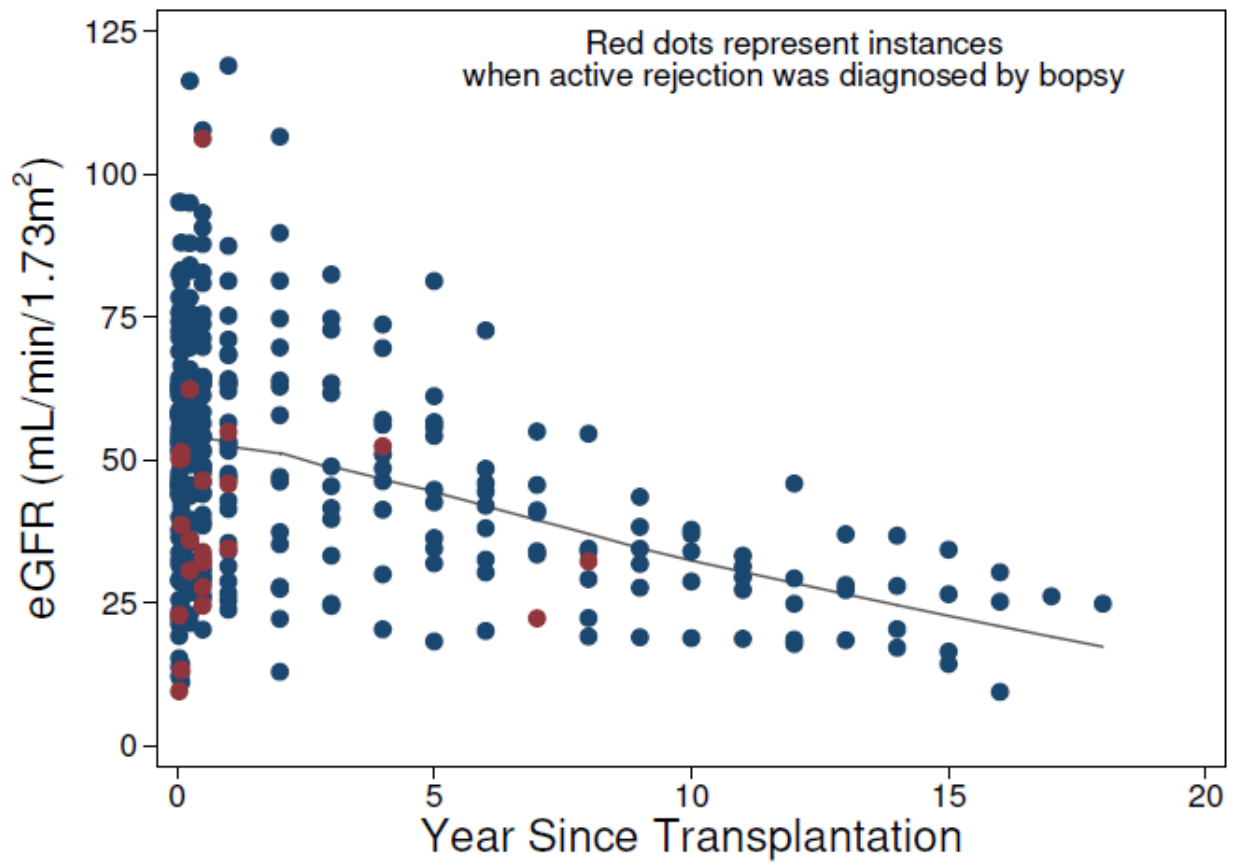


Figura 2. Misurazione dell'eGFR nella popolazione dei pazienti in studio. I cerchi evidenziati in rosso rappresentano i momenti in cui è stato diagnosticato BPAR (Biopsy-proven acute rejection) o microvascular inflammation. La linea grigia rappresenta l'andamento della funzione renale stimata tramite lowess (locally weighted least sum of squares). Il declino dell'eGFR potrebbe nell'arco del tempo potrebbe essere sovrastimato dalla selezione di pazienti con trapianto di lunga data ed indicazione alla biopsia per peggioramento della funzione renale.

Figura 3

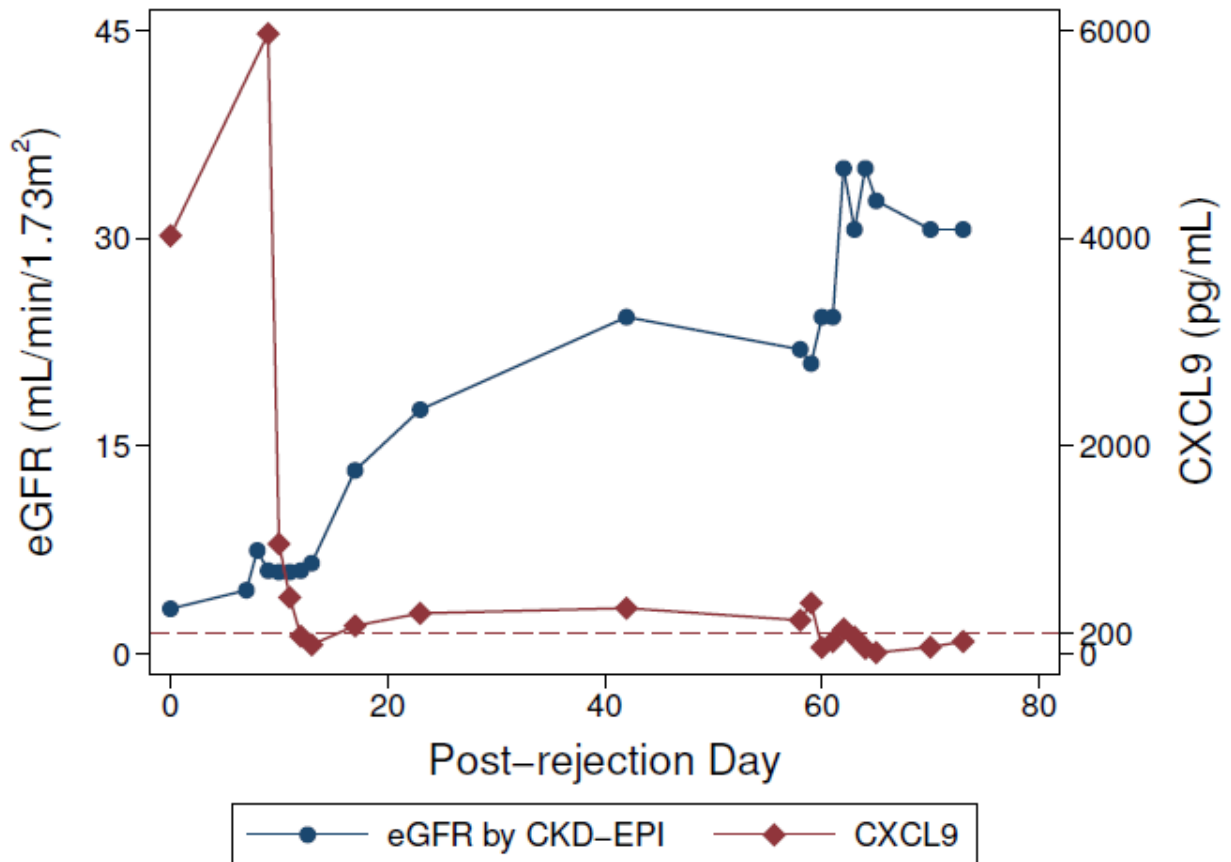


Figura 3. Andamento dell'eGFR (linea e cerchi blu) e del CXCL9 urinario (linea e rombi rossi) in un paziente con sottoposto a quattro biopsie, tre delle quali con diagnosi di BPAR /o infiammazione microvascolare (tutte associate a CXCL9 positivo) e l'ultima delle quali mostrante risoluzione delle lesioni infiammatorie (in associazione a CXCL9 negativo). I valori soglia per definire positivo il risultato del CXCL9 (200pg/mL) sono indicati dalla linea rossa orizzontale tratteggiata. Il recupero fino alla stabilizzazione della funzione renale (attorno a 30mL/min) appare associato alla normalizzazione dei valori del CXCL9 urinario.



Figura 4

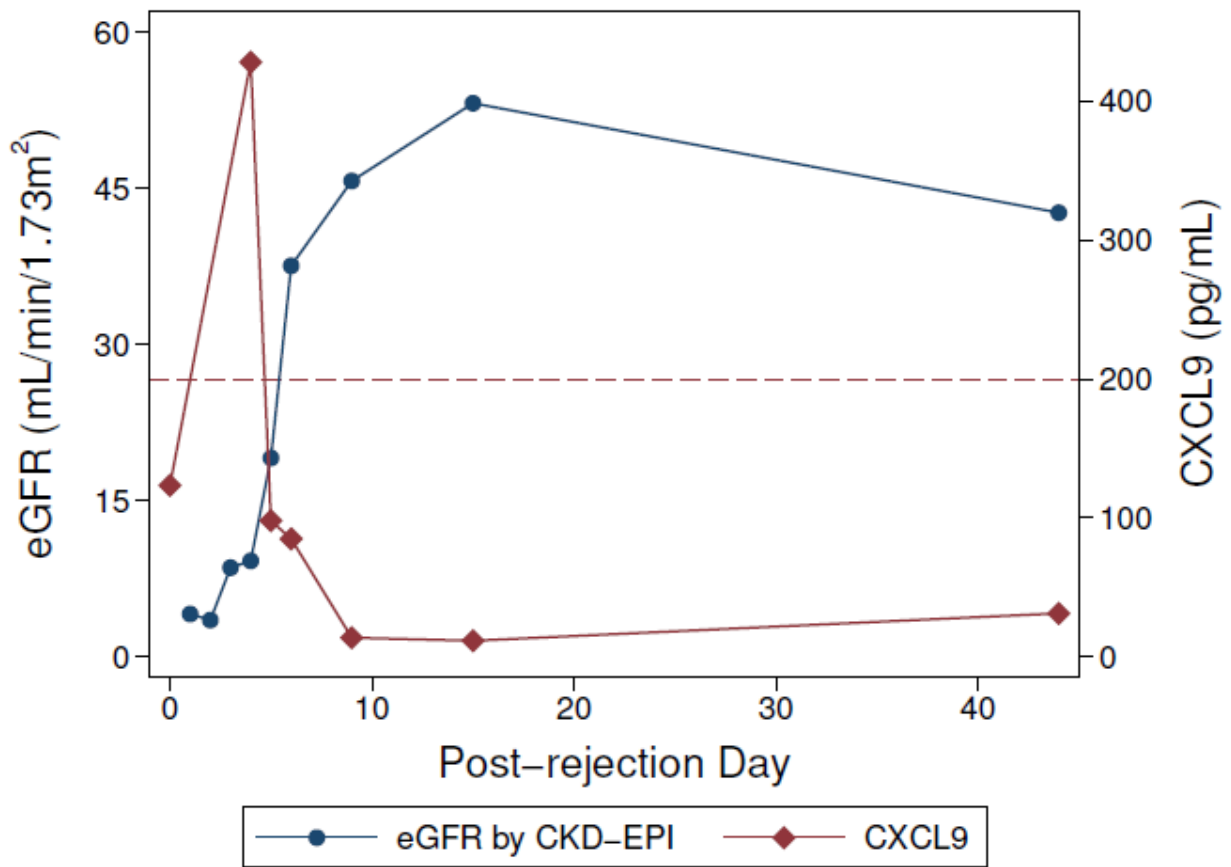


Figura 4. Andamento dell'eGFR (linea e cerchi blu) e del CXCL9 urinario (linea e rombi rossi) in un paziente trattato per rigetto acuto (BPAR e infiammazione microvascolare). I valori soglia per definire positivo il risultato del CXCL9 (200pg/mL) sono indicati dalla linea rossa orizzontale tratteggiata. Il recupero fino alla stabilizzazione della funzione renale (attorno a 45mL/min) appare associato alla normalizzazione dei valori del CXCL9 urinario.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Ho J, Wiebe C, Gibson IW et al. Immune monitoring of kidney allografts. *AJKD* 2012; 60(4):629-640
2. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Schold JD et al. Lack of improvement in renal allograft serviva despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant.* 2004;4(3):378-383
3. Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S et al. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2005 May;16:1501-11.
4. Sellarés 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 Feb;12:388-99.
5. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med.* 2007 Dec 20;357:2601-14.
6. Nankivell BJ1, Borrows RJ, Fung CL et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003 Dec 11;349:2326-33.
7. Ojo AO, Held PJ, Port FK et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med.* 2003 Sep 4;349:931-40.
8. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Feb;4:481-508.
9. Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol.* 1999 May;10:1080-9.
10. Wiseman AC. Polyomavirus nephropathy: a current perspective and clinical considerations. *Am J Kidney Dis.* 2009 Jul;54:131-42.

11. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation*. 2006 Sep 15;82:663-8.
12. Sommerer C, Konstandin M, Dengler T et al. Pharmacodynamic monitoring of cyclosporine a in renal allograft recipients shows a quantitative relationship between immunosuppression and the occurrence of recurrent infections and malignancies. *Transplantation*. 2006 Nov 27;82:1280-5.
13. Falck P, Asberg A, Guldseth H et al. Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine A precedes acute rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2008 Jan 27;85:179-84.
14. Cravedi P and Heeger PS. Immunologic monitoring in transplantation revisited. *Curr Opin Organ Transplant* 2012, 17(1):26-32
15. Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. *Immunol Rev* 2003,196:247-264.
16. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant*. 2007 Feb;7(2):408-15.
17. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation*. 2009 May 27;87(10):1505-13.
18. Zou Y, Stastny P, Süsal C, et al. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med*. 2007 Sep 27;357(13):1293-300.
19. Sun Q, Cheng Z, Cheng D, et al. De novo development of circulating anti-endothelial cell antibodies rather than pre-existing antibodies is associated with post-transplant allograft rejection. *Kidney Int*. 2011 Mar;79(6):655-62

20. Haque MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, et al. Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation: role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol.* 2002 Aug 1;169(3):1542-9.
21. Dinavahi R, George A, Tretin A, et al. Antibodies reactive to non-HLA antigens in transplant glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Jun;22(6):1168-78.
22. Suthanthiran M, Muthukumar T. Urinary-cell mRNA and acute kidney-transplant rejection. *N Engl J Med.* 2013 Nov 7;369(19):1860-1.
23. van Ham SM, Heutinck KM, Jorritsma T, et al. Urinary granzyme A mRNA is a biomarker to diagnose subclinical and acute cellular rejection in kidney transplant recipients. *Kidney Int.* 2010 Nov;78(10):1033-40.
24. Fischereder M, Schroppe B. The role of chemokines in acute renal allograft rejection and chronic allograft injury. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009 Jan 1;14:1807-14.
25. Hu H, Aizenstein BD, Puchalski A, et al. Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction. *Am J Transplant.* 2004 Mar;4(3):432-7.
26. Jackson JA, Kim EJ, Begley B, et al. Urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection. *Am J Transplant.* 2011 Oct;11(10):2228-34.
27. Koestenbauer S1, Stiegler P, Stadlbauer V et al. Myeloperoxidase and carbonyl proteins: promising markers for non-invasive monitoring of graft rejection after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2010 Dec;29(12):1352-7.
28. Haberman B1, Doan ML, Smith EO et al. Serum KL-6 level and the development of bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients. *Pediatr Transplant.* 2010 Nov;14(7):903-8.

29. Einecke G1, Reeve J, Sis B, et al. A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. *J Clin Invest*. 2010 Jun;120(6):1862-72.
30. Kowalski RJ1, Post DR, Mannon RB, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation*. 2006 Sep 15;82(5):663-8.
31. Hricik DE, Nickerson P, Formica RN et al. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant*. 2013; 13: 2634-2644
32. Solez K, Colvin RB, Racusen LC et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008 Apr;8(4):753-60.
33. Rabant M, Amrouche L, Morin L et al. Early Low Urinary CXCL9 and CXCL10 might predict immunological quiescence in clinically and histologically stable kidney recipients. *Am J Transplant* 2016(16) 1868-1881.
34. Budde K, Becker T, Arns W et al. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de novo kidney transplants: an open-label, randomized, controlled trial. *Lancet* 2011; 377: 837-847.
35. Lebranchu Y, Thierry A, Toupance O et al. Efficacy on renal function of early conversion from cyclosporine to sirolimus 3 months after renal transplantation: concept study. *Am J Transplant* 2009; 9: 1115-1123
36. Heemann U, Abramowicz D, Spasovski G et al. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines on kidney transplantation: a European Renal Best Practice (ERBP) position statement. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jul;26(7):2099-106.
37. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009 May 5;150(9):604-12.

38. Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999 Feb;55(2):713-23.
39. Racusen LC, Colvin RB, Solez K et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2003 Jun;3(6):708-14.
40. 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 Mar;7(3):518-26.
41. Sis B, Mengel M, Haas M et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant.* 2010 Mar;10(3):464-71.
42. Haas M, Sis B, Racusen LC et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014 Feb;14(2):272-83.