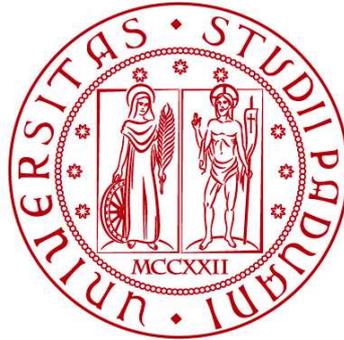


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria**



**TESI DI LAUREA**

**RUOLO DEGLI ANTICORPI ANTI-AT1R E ANTI-ETAR NEL  
RIGETTO DEL TRAPIANTO DI RENE PEDIATRICO**

**Relatore: Prof.ssa Marina De Bernard  
Dipartimento di Biologia**

**Correlatrice: Dott.ssa Elisa Benetti  
Didas Salute della Donna e del bambino**

**Correlatrice: Dott.ssa Susanna Negrisola  
Dipartimento di Salute della Donna e del bambino**

**Laureanda: Benedetta Antoniello**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	6
1.1 IL RENE .....	6
1.2 TRAPIANTO RENALE PEDIATRICO.....	9
1.2.1 <i>Aspetti chirurgici</i> .....	9
1.2.2 <i>Organizzazione rete trapianti in Italia</i> .....	10
1.2.3 <i>Epidemiologia e lista d’attesa</i> .....	10
1.2.4 <i>Donatore-ricevente</i> .....	12
1.2.5 <i>Terapia</i> .....	14
1.2.6 <i>Sopravvivenza dell’organo trapiantato</i> .....	14
1.3 BIOPSIA DI PROTOCOLLO .....	15
1.4 CLASSIFICAZIONE DI BANFF .....	17
1.5 RIGETTO .....	20
1.5.1 <i>Rigetto mediato dalle cellule T (TCMR)</i> .....	20
1.5.2 <i>Rigetto anticorpo-mediato (AMR)</i> .....	20
1.5 AT1R E ANGIOTENSINA II .....	22
1.6 ETAR ED ENDOTELINA-1.....	24
1.7 ICAM-1 o CD54.....	25
1.8 VCAM-1 o CD106 .....	26
1.9 ANTICORPI NON HLA.....	27
1.10 ANTICORPI ANTI-AT1R .....	28
1.11 ANTICORPI ANTI-ETAR .....	30
<b>2. MATERIALI E METODI</b> .....	33
2.1 POPOLAZIONE .....	33
2.2 SAGGIO ELISA .....	33
2.3 RIVALUTAZIONE DELL’ ISTOLOGIA SECONDO BANFF 2018.....	35
2.4 IMMUNOISTOCHEMICA – IHC AT1R, ETAR, VCAM-1, ICAM-1 .....	35
2.5 TECNICHE DI VALUTAZIONE IHC .....	38
2.6 MESSA A PUNTO IBRIDAZIONE IN SITU AT1R, ETAR, ICAM1, VCAM1.....	39
2.7 STATISTICA .....	40
<b>3. RISULTATI</b> .....	42

3.1 POPOLAZIONE.....	42
3.2 PREVALENZA DEGLI ANTICORPI CIRCOLANTI ANTI-AT1R e ANTI-ETAR NELLA POPOLAZIONE PEDIATRICA.....	42
3.3 RIVALUTAZIONE CON CLASSIFICAZIONE BANFF 2018.....	45
3.4 LOCALIZZAZIONE TISSUTALE E ANALISI SEMIQUANTITATIVA DELLE PROTEINE STUDIATE .....	46
3.4.1 <i>Valutazione di possibili cross reazioni con il cromogeno DAB nel tessuto renale .....</i>	46
3.4.2 <i>Localizzazione tissutale dei recettori AT1R ed ETAR .....</i>	47
3.4.3 <i>Analisi statistica dell'espressione tissutale dei recettori AT1R ed ETAR .....</i>	51
3.4.4 <i>Localizzazione tissutale delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-152</i>	
3.4.5 <i>Analisi statistica dell'espressione tissutale delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 .....</i>	56
3.4.6 <i>Localizzazione tissutale dei recettori AT1R ed ETAR e delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 sulle biopsie al tempo zero.....</i>	59
3.4.7 <i>Analisi statistica dell'espressione tissutale dei recettori AT1R ed ETAR e delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 al tempo .....</i>	61
<b>4. DISCUSSIONE .....</b>	<b>68</b>
<b>5. CONCLUSIONI .....</b>	<b>74</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>76</b>



## ABSTRACT

Il trapianto renale rappresenta il trattamento d'elezione dell'insufficienza renale terminale pediatrica. Tuttavia, l'emivita d'organo è di 15-20 anni e una delle principali cause di perdita prematura è il rigetto anticorpo-mediato, causato dagli anticorpi anti-HLA del donatore. Altri anticorpi, non-HLA correlati, sembrano avere un ruolo nel rigetto: tra i più noti gli anti-recettore 1 dell'angiotensina II (AT1R) e anti-recettore A dell'endotelina-1 (ETAR). La presenza di elevate quantità di questi autoanticorpi sembra essere associata a un peggiore andamento del trapianto. Gli anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR sembrano legare i recettori AT1R ed ETAR in modo agonista e permanente, provocando ipertensione e infiammazione aumentando l'espressione delle molecole di adesione intercellulare-1 (iCAM-1) e vascolare (VCAM-1).

È stato condotto uno studio retrospettivo su 12 pazienti pediatriche trapiantate di rene monitorate con biopsia di follow up a 6 e 24 mesi. Sono stati dosati gli autoanticorpi circolanti. È stata valutata la localizzazione tissutale e l'analisi semiquantitativa dei recettori AT1R e ETAR e delle molecole di adesione iCAM-1 e VCAM-1 tramite immunistochimica su biopsia renale. Lo scopo della tesi è quello di valutare una correlazione tra la presenza di elevate quantità di anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR e variazioni di espressione proteica dei recettori e delle molecole di adesione.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 IL RENE

*Anatomia macroscopica:* I reni sono due organi parenchimatosi situati nella parete postero superiore della cavità addominale. Sono organi pari (rene destro e rene sinistro) e sono disposti nelle fosse lombari in posizione retroperitoneale in maniera simmetrica rispetto alla colonna vertebrale (Figura 1a). I reni hanno un colorito rosso-bruno e presentano una forma di fagiolo appiattito in senso antero posteriore. Le dimensioni medie sono: 10 cm in lunghezza, 5,5 cm in larghezza e 3 cm di spessore. Il peso medio è di 150-170 grammi. Rispetto al rachide, si estendono dalla dodicesima vertebra toracica al margine superiore della terza vertebra lombare. Di norma, il polo superiore del rene destro è posizionato più in basso rispetto al polo superiore del rene sinistro a causa delle dimensioni del fegato.<sup>1</sup>

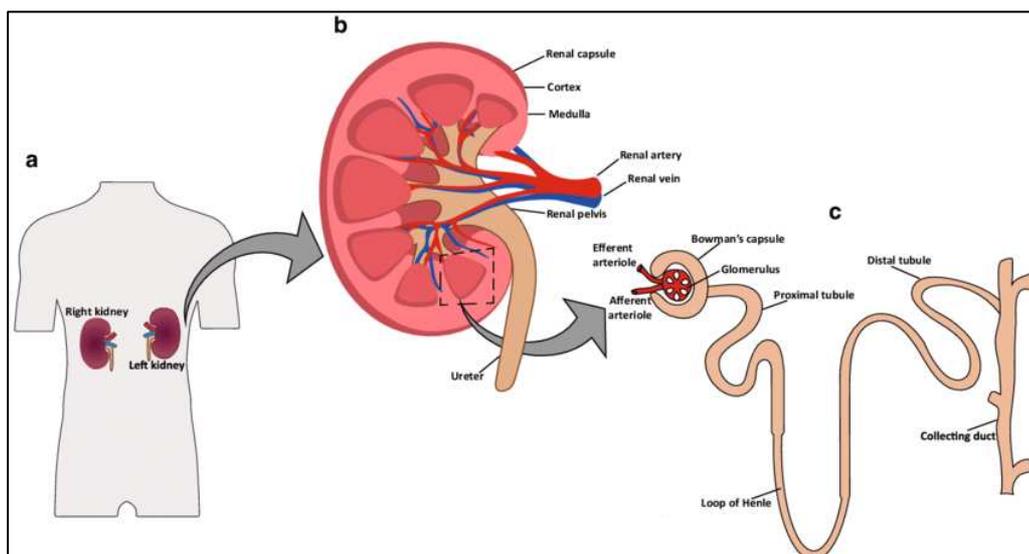


Figura 1: (a) Anatomia macroscopica dei reni, (b) Architettura del rene, (c) Anatomia microscopica del rene.  
Tratto da: <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02598-0> (2019).

*Architettura:* Il rene è rivestito da una capsula esterna chiamata capsula fibrosa. Internamente presenta una zona corticale e una zona midollare. La zona corticale ha un aspetto granulare e rappresenta la porzione più esterna del rene a contatto con la capsula fibrosa. La zona midollare si trova internamente e presenta un colore più scuro rispetto alla zona corticale (Figura 1b). Ha un aspetto striato e consiste in 6-18 formazioni triangolari chiamate piramidi midollari o piramidi di Malpighi. La base di ogni piramide è rivolta verso la zona corticale. Le piramidi sono separate da fasce di tessuto corticale che formano le colonne renali di Bertin.

La disposizione della zona midollare e della corticale consentono di stabilire l'architettura del parenchima in lobi. Un lobo renale comprende una piramide renale, l'area corticale adiacente.

*Anatomia microscopica:* L'unità funzionale del rene è il nefrone (Figura 1c). Sono presenti due diversi tipi di nefrone: il nefrone corticale (localizzato nella zona corticale) e il nefrone iuxtamidollare (localizzato vicino alla zona midollare). Ogni rene contiene circa 1,25 milioni di nefroni.<sup>1</sup> Il nefrone è composto da un corpuscolo renale e da un tubulo renale. I tratti principali del tubulo renale sono il tubulo contorto prossimale, l'ansa di Henle (composta da un segmento discendente e uno ascendente) e il tubulo contorto distale. Nel tubulo contorto prossimale avviene il riassorbimento di acqua, ioni e nutrienti organici; nell'ansa di Henle avviene un ulteriore riassorbimento di acqua nel tratto discendente e un riassorbimento di ioni sodio e cloruro nel tratto ascendente; nel tubulo contorto distale avviene il riassorbimento di acqua, sodio e calcio. Il corpuscolo renale è responsabile della formazione del filtrato ed è formato da una capsula glomerulare (capsula di Bowman) e dal glomerulo renale.<sup>1</sup>

*Vascularizzazione e innervazione:* il principale vaso sanguigno che trasporta al rene il sangue da filtrare è un ramo dell'aorta, l'arteria renale. Una volta filtrato, il sangue esce dal rene attraverso la vena renale che confluisce nella vena cava. L'innervazione del rene è caratterizzata principalmente dalla presenza di rami simpatici del plesso celiaco, a formare il plesso renale.

*Funzionalità:* il rene ha la funzione di filtrare il sangue e mantenere l'equilibrio idrosalino del corpo. Attraverso i processi di filtrazione glomerulare, riassorbimento tubulare e secrezione tubulare i reni producono urina, principale sostanza attraverso cui vengono eliminate sostanze di scarto o sostanze dannose per il corpo come l'urea. Pertanto, il rene regola il volume e la composizione dei liquidi per mantenere il bilancio idrico e salino. La membrana di filtrazione glomerulare consente il passaggio di acqua, ioni e piccoli soluti; viene escluso il passaggio della maggior parte delle proteine (con PM>25kDa). In un soggetto sano la presenza fisiologica di proteine risulta essere inferiore a 0,15 g/die. La presenza di proteine nelle urine in misura maggiore rispetto a 0,15 g/die viene definita proteinuria. Una proteinuria superiore a 3 g/die è indicativa di sindrome nefrosica, data da un insieme di sintomi derivanti da malattie che danneggiano il sistema di filtrazione dei reni.

Indicatori della funzionalità renale sono la misurazione della creatinina sierica e il calcolo della velocità di filtrazione glomerulare (eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate). Infatti, la concentrazione di creatinina nel sangue è data dal

metabolismo muscolare sia scheletrico che cardiaco. La peculiarità di questa piccola proteina sta nel fatto che viene completamente filtrata dai glomeruli renali e interamente eliminata con le urine, senza essere riassorbita a livello tubulare dai reni. Le formule di calcolo della eGFR utilizzano la creatininemia, ma comprendono anche parametri quali età, sesso del paziente ed etnia, così come altezza e peso in kg, in relazione all'equazione utilizzata, restituendo una appropriata stima della funzione renale.

In ambito pediatrico la formula più utilizzata è quella di formula di Schwartz, che tiene conto, oltre che della creatinina sierica, dell'altezza e del peso del bambino.  $eGFR (ml/min/1.73 m^2) = k \times h / Cr$ , dove h è l'altezza in cm, Cr è la creatinina plasmatica in mg/dl (o micromol/l) e k una costante che varia a seconda dell'età e del sesso (e dell'unità di misura della creatinina).

Se la funzionalità renale dell'individuo decresce in relazione a un danno o a una patologia, la velocità di filtrazione decresce e i prodotti di scarto iniziano ad accumularsi nel torrente circolatorio. Esistono diversi stadi di insufficienza renale (Tabella 1).

Stadio	Descrizione	GFR (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )
1	Danno renale con GFR normale o aumentato	>90
2	Danno renale con lieve riduzione del GFR	60-89
3	Moderata riduzione del GFR	30 - 59
4	Severa riduzione del GFR	15 - 29
5	Insufficienza renale terminale	<15

Tabella 1: Stadi dell'insufficienza renale secondo KDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative)

Si parla di insufficienza renale terminale nel caso in cui i reni siano incapaci di svolgere in modo sufficiente la loro normale funzione omeostatica. L'insufficienza renale terminale viene definita da una riduzione della funzionalità renale terminale (<10%) e da una diminuzione della eGFR al di sotto di 15 ml/min/1.73mq.

Le cause di ESRD in ambito pediatrico variano in base all'età e all'etnia. In Europa le cause più comuni sono rappresentate dalle anomalie congenite del rene e delle vie urinarie CAKUT– *Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract* (58-59%) e le nefropatie ereditarie (15-19%). La glomerulonefrite rappresenta il 5-7% dei casi.<sup>2</sup> Nei bambini di età inferiore a 5 anni predominano le CAKUT, che comprendono la displasia renale, le uropatie ostruttive e la nefropatia da reflusso. Nei bambini di età superiore ai 12 anni prevalgono le malattie glomerulari acquisite, come la glomerulosclerosi segmentale focale. Un altro dato costante è la predominanza del genere maschile (rapporto maschi/femmine  $1.3 < x < 2$ ), in particolar modo nelle CAKUT.<sup>2</sup>

Esistono due tipologie di trattamento per l'insufficienza renale terminale: il trattamento dialitico e il trapianto di rene.

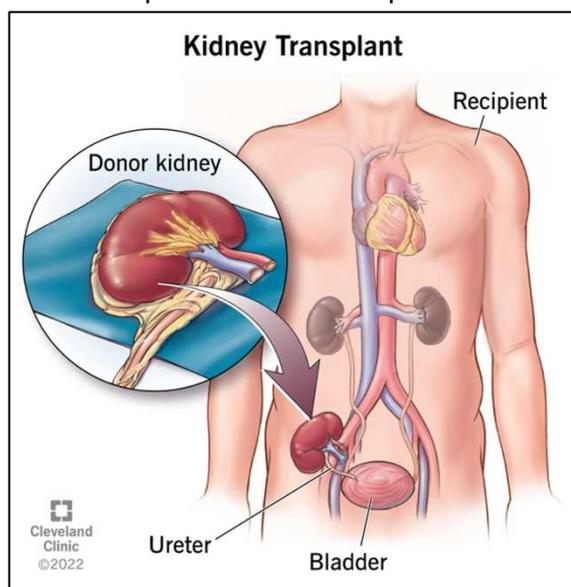
## 1.2 TRAPIANTO RENALE PEDIATRICO

Il trapianto renale rappresenta il trattamento ideale nel caso di insufficienza renale terminale (ESRD) sia per pazienti adulti sia in ambito pediatrico.

Il trapianto permette una qualità di vita superiore rispetto a qualunque trattamento dialitico a lungo termine in quanto aumenta la sopravvivenza del paziente, comporta un aumento della crescita staturale (in particolare nel bambino di età inferiore a 5 anni) e un migliore controllo della pressione arteriosa.

### 1.2.1 Aspetti chirurgici

Il trapianto consiste in un complesso intervento chirurgico in cui viene inserito nell'addome del bambino un rene proveniente da un donatore compatibile. Il rene viene solitamente posizionato in una sede anatomica diversa da quella nativa. In genere, viene posizionato nella fossa iliaca destra ad eccezione dei casi in cui particolarità anatomiche lo impediscano.<sup>3</sup> I reni nativi non vengono rimossi a meno che questi non causino problemi.



Di norma, l'intervento segue le stesse modalità del trapianto di rene nell'adulto con anastomosi con i vasi iliaci in sede extraperitoneale. Viene inoltre ripristinata la via urinaria mediante tecniche di reimpianto dell'uretere del donatore nella vescica del ricevente o dell'uretere del ricevente se quest'ultimo risulta idoneo.

Figura 2: Posizionamento dell'organo trapiantato. Tratto da: <https://my.clevelandclinic.org>

### 1.2.2 Organizzazione rete trapianti in Italia

Il NITp (Nord Italia Transplant Program) è la prima Organizzazione di coordinamento del prelievo e trapianto di organi e tessuti nel territorio nazionale. Comprende le regioni Veneto, Lombardia, Liguria, Marche, Friuli-Venezia Giulia e la provincia autonoma di Bolzano. Il NITp individua le coppie donatore-ricevente. Al di sopra di questa si estende l'attività di coordinamento su tre livelli: CNT Centro Nazionale Trapianti, CRT Centri Regionali per i Trapianti e Coordinamenti ospedalieri.

I pazienti che necessitano di un trapianto vengono immessi in una lista d'attesa, poiché la domanda è maggiore rispetto agli organi a disposizione. I pazienti pediatrici, essendo in numero inferiore, vengono inseriti in un'unica lista d'attesa gestita a livello del CNT. Gli organi vengono assegnati in base ad un algoritmo che riflette diversi parametri: lo stato di gravità della patologia, la compatibilità HLA, il gruppo sanguigno, l'età del donatore e del ricevente ed il tempo in attesa di lista.

### 1.2.3 Epidemiologia e lista d'attesa

Nel periodo 2002-2019 sono state registrate 95.498 iscrizioni in lista d'attesa per il trapianto d'organo relative a 73.517 pazienti. <sup>4</sup>

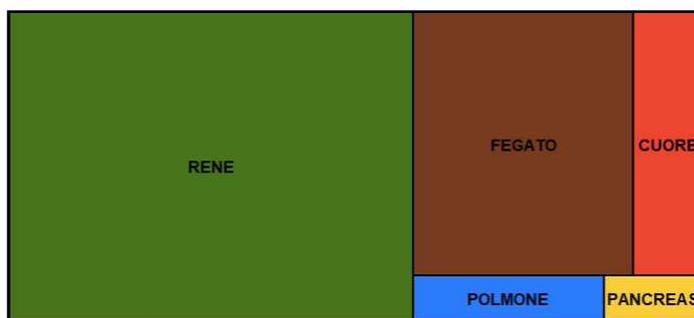


Figura 3: Iscrizione in lista per tutti gli organi. Periodo 2002-2019.  
Dati estratti dal Sistema Informativo Trapianti (SIT)  
del Centro Nazionale Trapianti (CNT).

Le iscrizioni in lista d'attesa per il trapianto di rene sono state il 52,6% della lista totale, 38.701 pazienti. Di questi pazienti, il 3% (1.291) sono pazienti pediatrici. Per questi dati è stata considerata l'età della prima iscrizione in lista del paziente. Nel periodo 2002-2019 sono 787 i pazienti pediatrici maschi iscritti in lista e 507 i pazienti pediatrici femmine.<sup>4</sup> Possono accedere alla lista soggetti di età inferiore a 18 anni, oppure soggetti che abbiano iniziato il trattamento dialitico prima dei 18 anni e la malattia renale sia stata diagnosticata prima dei 15 anni. Di seguito, i dati richiesti per l'inserimento in lista per trapianto pediatrico (Tabella 2).

<b>RENE</b>	Percentuale di anticorpi
	Data di inizio della dialisi e indicazione del centro dialisi
	Patologia primitiva
	Statura, peso e data dell'ultimo controllo
	Numero, data e durata funzionale di eventuali precedenti trapianti
	Tipizzazione HLA-A/B/DR

Tabella 2: Criteri per l'ammissione in lista d'attesa per trapianto di rene pediatrico

Al 31 dicembre 2021, il tempo medio in lista d'attesa dall'immissione in lista al trapianto di rene per i pazienti pediatrici è di 1,7 anni.<sup>5</sup>

I trapianti da donatore deceduto in età pediatrica (<18 anni) nel 2021 sono stati 56 e rappresentano il 3,3% dei trapianti di rene totali eseguiti in Italia nel 2021.<sup>5</sup>

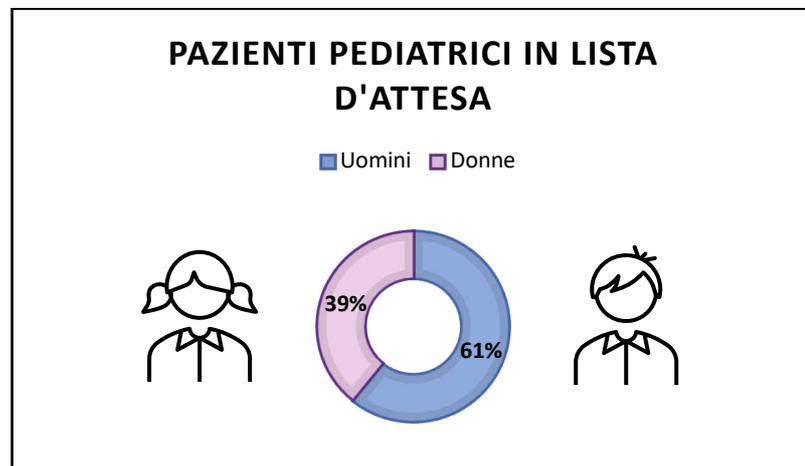


Figura 4: Iscrizione in lista per trapianto di rene pediatrico per sesso. Periodo 2002-2019. Dati SIT 20/11/2020

Si riporta di seguito il grafico rappresentante i trapianti di rene in età pediatrica nel 2021 divisi per centri (Figura 5).

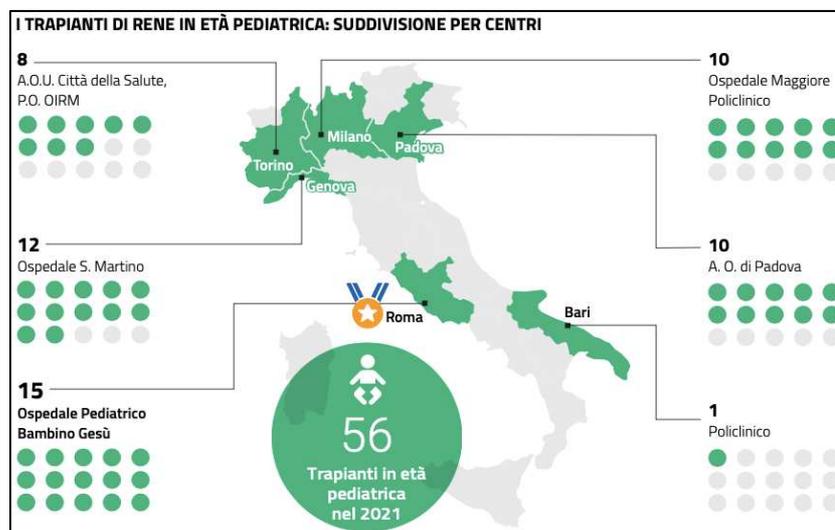


Figura 5: Report annuale 2021/ Il trapianto di organi

La probabilità di sopravvivenza a 5 anni dal trapianto renale in età pediatrica è del 91,7%<sup>6</sup>; la sopravvivenza ad 1 anno è in costante aumento negli ultimi anni grazie alle tecniche innovative e al perfezionamento dell'intervento chirurgico, al miglioramento dell'approccio immunologico e ad una dieta controllata e mirata.<sup>7</sup>

#### *1.2.4 Donatore-ricevente*

Il rene trapiantato può provenire da un donatore vivente o da un donatore deceduto. In Italia i reni da donatore deceduto vengono assegnati su scala nazionale per mezzo di un sistema computerizzato gestito dal CNT (Centro Nazionale Trapianti), in modo tale da permettere la migliore combinazione donatore-ricevente possibile.

L'età del donatore cadavere è critica per il giudizio di idoneità del rene. In Italia il limite in genere corrisponde ai 2 anni di età anche se non si escludono a priori donatori anche più piccoli, per cui è possibile trapiantare entrambi i reni in un unico ricevente. Il rene trapiantato derivante da un donatore molto piccolo porta un elevato rischio di trombosi dei vasi<sup>8</sup>.

Il donatore vivente deve essere maggiorenne e sano, può essere un familiare consanguineo o non consanguineo, per lo più si tratta dei genitori del bambino.<sup>3</sup>

La scelta di trapiantare un rene da donatore cadavere o vivente è insita nel fatto secondo cui un rene trapiantato ha un'emivita stimata attorno ai 15-20 anni. Un paziente in età pediatrica avrà facilmente bisogno di un secondo trapianto nel corso della sua vita, pertanto, nella maggior parte dei casi, si predilige un donatore cadavere per il primo trapianto in modo tale da tenere integra la possibilità di avere una donazione da parente nel caso in cui fosse necessario un secondo trapianto.

In genere, il trapianto pediatrico coinvolge bambini di età superiore ai 2 anni e con un peso corporeo superiore ai 10kg. Tuttavia, in alcuni casi estremamente eccezionali, è possibile trapiantare bambini più piccoli. Ad ogni modo è meno pericoloso sottoporre il paziente a dialisi peritoneale per alcuni mesi in attesa del compimento dei 2 anni piuttosto che proporre un trapianto di rene<sup>9</sup>. Il trapianto in bambini di età inferiore ai 2 anni comporta infatti un elevato rischio per il rene ricevuto a causa dei possibili fenomeni trombotici e per il paziente stesso.

È auspicabile ricercare la massima compatibilità ricevente-donatore per ottenere un buon esito del trapianto. La compatibilità è relativa al gruppo sanguigno ABO e alla corrispondenza HLA.

L'eventuale incompatibilità del gruppo sanguigno sembra essere un ostacolo superabile con nuovi protocolli che prevedono l'utilizzo di farmaci specifici e questo aumenta di molto la probabilità di trovare donatori compatibili. La compatibilità HLA è invece ancora molto importante (anche se non obbligatoria)

per la buona riuscita del trapianto e rimane un utile indicatore del rischio immunologico e un fattore predittivo a lungo termine per l'esito del trapianto. Poiché esistono migliaia di combinazioni HLA possibili, l'impossibilità di avere una compatibilità al 100% ha portato alla costruzione di classi di mismatch HLA su cui si basa il criterio di allocazione in lista (Tabella 3).

<b>CLASSE A (0-1MM)</b>	Livello A1: AB0 identici, donatore 0 su ricevente B, donatore A su ricevente AB Livello A2: altre combinazioni di trapianto AB0 compatibile
<b>CLASSE B (2 MM)</b>	Livello B1: AB0 identici, donatore 0 su ricevente B, donatore A su ricevente AB Livello B2: altre combinazioni di trapianto AB0 compatibile
<b>CLASSE C (3-4 MM)</b>	Livello C1: AB0 identici Livello C2: altre combinazioni di trapianto AB0 compatibile
<b>CLASSE D (5-6 MM)</b>	Livello D1: AB0 identici Livello D2: altre combinazioni di trapianto AB0 compatibile

Tabella 3: classi di mismatch HLA e compatibilità gruppo sanguigno ABO

Tuttavia, al giorno d'oggi, anche la corrispondenza HLA può essere superata dall'utilizzo di potenti farmaci immunosoppressori e stringenti controlli post-trapianto.<sup>10</sup>

Ai pazienti in lista d'attesa viene eseguito di routine il PRA test, un test immunologico che restituisce uno score espresso in percentuale tra 0 e 100. Lo score rappresenta la percentuale della popolazione verso cui la persona testata presenta anticorpi diretti contro antigeni umani, soprattutto antigeni appartenenti al sistema HLA. Maggiore è lo score e maggiore è la possibilità che il ricevente reagisca contro il donatore e aumenti il rischio di rigetto del trapianto. All'interno di ogni classe di mismatch HLA i pazienti sono ordinati secondo uno score che deriva dalla somma di diversi punteggi (Tabella 4).

<b>PARAMETRO</b>	<b>DESCRIZIONE</b>	<b>PUNTEGGIO</b>
<b>RISCHIO IMMUNOLOGICO</b>	PRA>30% oppure iscrizione per ritrapianto	20 pt
<b>TEMPO DI ATTESA IN LISTA</b>	Per ogni anno di attesa	3 pt
<b>RAPPORTO PESO DONATORE/RICEVENTE</b>	0.8<x<3	10 pt
	>3	5 pt
	<0.8	0 pt
<b>PESO RICEVENTE</b>	<12 kg	10 pt

Tabella 4: Score di ordinamento all'interno delle classi di mismatch HLA

Per ogni paziente che si sottopone a ritrapianto, se il trapianto non ha mai funzionato o è durato meno di un mese, non si deve azzerare il tempo di attesa in lista. Gli score che compongono la tabella vengono aggiornati almeno ogni sei mesi e i sieri dei pazienti vengono studiati con metodiche ad alta sensibilità.

### *1.2.5 Terapia*

La terapia post trapianto prevede l'assunzione di farmaci immunosoppressori, fondamentali per permettere al paziente di non attivarsi contro l'organo trapiantato riconosciuto come non-self ed evitare quindi il rigetto dell'organo. L'assunzione di tali farmaci inizia immediatamente prima dell'intervento e prosegue per tutta la vita.

I pazienti pediatrici che assumono farmaci immunosoppressori hanno un sistema immunitario depresso e quindi una minor capacità di difesa nei confronti di patogeni responsabili delle infezioni e dello sviluppo delle neoplasie.

### *1.2.6 Sopravvivenza dell'organo trapiantato*

Negli ultimi anni la sopravvivenza del rene trapiantato è aumentata grazie ad interventi chirurgici sempre più precisi, grazie ad un'accurata preparazione preoperatoria del ricevente e dell'organo stesso, ad una corrispondenza maggiore donatore-ricevente per quanto riguarda le caratteristiche chirurgiche e immunologiche, e grazie all'utilizzo di farmaci immunosoppressivi sempre più mirati. Tuttavia, la vita stimata per un rene trapiantato in età pediatrica è di 15-20 anni. Per questo motivo un paziente pediatrico nel corso della sua vita dovrà andare incontro ad un secondo trapianto nella maggior parte dei casi.

Le cause che portano al fallimento del trapianto possono essere precoci o tardive. In fase precoce possono nascere per lo più complicanze chirurgiche o di rigetto acuto, in fase tardiva può presentarsi una ricaduta della patologia di base o rigetto cronico. Inoltre, tra le cause di fallimento del trapianto sono presenti anche la nefrotossicità da farmaci e le infezioni.

### 1.3 BIOPSIA DI PROTOCOLLO

La biopsia renale è una procedura che prevede il prelievo di piccole porzioni di tessuto renale a tempi ben precisi e prestabiliti per monitorare lo stato dell'organo trapiantato in assenza di segni clinici di rigetto; nell'UOC di Nefrologia Pediatrica di Padova i pazienti pediatrici vengono sottoposti a biopsie di controllo 6, 12 e 24 mesi post trapianto.

Questa procedura si rende necessaria dal momento in cui non sono presenti attualmente biomarcatori precoci di danno renale.

Attualmente la creatinina sierica e la velocità di filtrazione glomerulare (GFR) vengono utilizzati come marcatori di funzionalità renale. L'aumento della creatinina sierica o una diminuzione della GFR compaiono però solitamente quando il danno renale è diffuso; altri parametri come l'ipertensione arteriosa e la proteinuria compaiono in fase tardiva. Pertanto, gli episodi di rigetto su base subclinica non possono essere riconosciuti tempestivamente senza la biopsia renale.

Evidenze dimostrano che i pazienti pediatrici abbiano un maggiore rischio di sviluppare rigetto subclinico per via della dimensione maggiore del rene ricevuto e per via del sistema immunitario particolarmente reattivo.

Nonostante l'importanza di questo esame, l'esecuzione della biopsia di follow up è stata molto dibattuta negli anni. Si tratta infatti di un esame invasivo che richiede, nel caso del paziente pediatrico, la sedazione e l'anestesia locale. Non è un esame privo di eventuali complicanze anche se, nella maggioranza dei casi, si tratta di macroematuria o di piccoli ematomi, in rarissimi casi può causare complicanze maggiori. La procedura viene quindi eseguita solo nei centri che dispongano di un team con adeguata preparazione sia nella procedura, che nella guida ecografica nonché nella sedazione.<sup>11</sup>

La biopsia si esegue con guida ecografica e vengono utilizzati degli aghi Tru-Cut

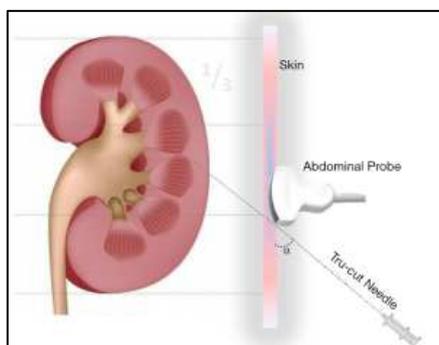


Figura 6: Schema biopsia renale ecoguidata.  
From: <https://www.myesr.org>

con meccanismo a scatto (Figura 4). Esistono diversi aghi di diametro diverso (da 14 a 18 gauge). Nell'ambito del monitoraggio del rene pediatrico vengono utilizzati il 16 gauge. La tecnica richiede, possibilmente, il prelievo di due frustoli di tessuto renale corticale che verranno fissati in formalina e successivamente inclusi in paraffina e preparati per essere infine colorati.

Le principali colorazioni istologiche sono:

- Ematossilina e Eosina: chiamata anche colorazione bicromica, permette di studiare la composizione tissutale, la presenza di infiltrato, edemi o globuli rossi. L'Ematossilina è un colorante basico che ha affinità per i nuclei cellulari e li colora di viola. L'Eosina è un colorante acido che ha affinità per il citoplasma e lo colora di rosa;
- PAS (acido periodico – reattivo di Schiff): l'acido periodico ossida le componenti glucidiche della membrana basale e il reattivo di Schiff le colora di rosso-fucsia. Permette di vedere dettagliatamente le membrane basali glomerulari e riesce ad evidenziare anche alterazioni ai vasi sanguigni;
- Silver PAS: colorazione specifica per il rene che permette di evidenziare le membrane basali glomerulari e tubulari che risultano nere grazie alla precipitazione dell'argento metallico.
- Tricromica Masson: vengono usati tre coloranti diversi. Ematossilina che colora i nuclei di viola scuro, fucsina (acida, basofila) che colora il citoplasma di rosso e blu di anilina (basica, acidofila) che colora le fibre di collagene di verde-azzurro. È una colorazione specifica per i collagene e il tessuto fibrotico.

Le colorazioni immunoistochimiche prevedono l'utilizzo di anticorpi e identificano nel tessuto le cellule a cui si legano in modo specifico gli anticorpi. Si utilizza un anticorpo primario diretto contro la molecola di interesse. Successivamente, si aggiunge un anticorpo secondario (che riconosce il primario) legato all'enzima perossidasi di rafano. Infine, si aggiunge il substrato cromogeno DAB che ossida la perossidasi e fa sì che il colore precipiti. Le molecole di interesse risulteranno colorate di marrone.

Tramite immunoistochimica viene valutata la presenza di C4d che è un frammento derivato dalla cascata del complemento che viene attivata in caso di rigetto anticorpo-mediato donatore specifico. Inoltre, viene eseguita la caratterizzazione immunoistochimica dell'eventuale componente cellulare presente nella biopsia mediante specifici marcatori: CD3 per identificare i linfociti T, CD68 per i monociti e macrofagi, CD20 per i linfociti B e CD138 per le plasmacellule.

## 1.4 CLASSIFICAZIONE DI BANFF

La Classificazione di Banff della patologia dell'allotrapianto è una classificazione internazionale per la refertazione di biopsie da trapianti di organi solidi. La prima Classificazione risale al 1991 ed è stata sottoposta a revisione ogni due anni. La Classificazione attualmente in uso è quella del 2018.<sup>12</sup>

La Classificazione di Banff consiste in una valutazione istologica che prevede l'assegnazione di un punteggio per gravità e prevede sei possibili quadri istologici (Tabella 5).

<b>Categoria 1</b>	Biopsia normale, non lesioni specifiche
<b>Categoria 2</b>	Lesioni tipiche del rigetto anticorpo-mediato
<b>Categoria 3</b>	Lesioni borderline, sospetto di rigetto cellulo-mediato
<b>Categoria 4</b>	Lesioni tipiche del rigetto cellulo-mediato
<b>Categoria 5</b>	Lesioni croniche: fibrosi interstiziale e atrofia tubulare
<b>Categoria 6</b>	Lesioni e cambiamenti dovuti ad altre cause non imputabili al rigetto acuto o cronico (ad esempio dovute ad infezione virale o ricaduta della patologia di base)

Tabella 5: Possibili quadri istologici secondo la classificazione Banff 2018

Per rendere oggettiva la valutazione della biopsia del trapianto, è stato utilizzato un sistema di valutazione universale che permette una standardizzazione nella lettura ed interpretazione delle biopsie renali. Sono state scelte alcune lesioni che siano indicative dello stato dell'organo ed è stato deciso di valutarle con un punteggio da 0 a 3: 0 nessuna lesione, 1 lieve, 2 moderata e 3 severa (Tabella 6).

<b>i</b>	<b>INFIAMMAZIONE</b>	Valuta il grado di infiammazione della corteccia renale non fibrotica	Lesione tipica rigetto cellulare acuto
<b>t</b>	<b>TUBULITE</b>	Valuta il grado di infiammazione all'interno dell'epitelio tubulare dei tubuli corticali	Lesione tipica rigetto cellulare
<b>v</b>	<b>ARTERITE</b>	Valuta la presenza e il grado di infiammazione della tonaca intima delle arterie	Lesione tipica rigetto umorale
<b>g</b>	<b>GLOMERULITE</b>	Valuta il grado di infiammazione all'interno dei glomeruli	Lesione tipica rigetto umorale
<b>ptc</b>	<b>CAPILLARITI PERITUBULARI</b>	Valuta il grado di infiammazione dei capillari peritubulari	Lesione tipica rigetto umorale

<b>C4d</b>	<b>DEPOSITO C4d</b>	Valuta il deposito di C4d nei ptc	Lesione tipica rigetto umorale
<b>cv</b>	<b>ISPESSIMENTO ARTERIOLARE</b>	Valuta l'estensione dell'ispessimento dell'intima arteriolare dell'arteria maggiormente colpita	Lesione tipica rigetto umorale
<b>ci</b>	<b>FIBROSI INTERSTIZIALE</b>	Valuta l'estensione della fibrosi corticale	Lesione correlata a danno cronico
<b>ct</b>	<b>ATROFIA TUBULARE</b>	Valuta l'estensione dell'atrofia corticale tubulare	Lesione correlata a danno cronico
<b>cg</b>	<b>DOPPIO CONTORNO DELLE MEMBRANE DEI CAPILLARI GLOMERULARI</b>	Valuta la presenza e l'estensione dei doppi contorni della membrana basale glomerulare o della multilaminazione nel glomerulo più gravemente colpito	Lesione tipica del rigetto umorale cronico
<b>mm</b>	<b>ESPANSIONE MESANGIALE</b>	Valuta la percentuale di glomeruli con moderata espansione della matrice mesangiale rispetto a tutti i glomeruli non sclerificati.	
<b>ti</b>	<b>INFIAMMAZIONE TOTALE</b>	Valuta l'estensione dell'infiammazione corticale totale	Lesione tipica del rigetto cellulare cronico
<b>iFTA</b>	<b>AREE DI FIBROSI INTERSTIZIALE E ATROFIA TUBULARE</b>	Valuta il grado di infiammazione della corteccia renale fibrotica	Lesione correlata a danno cronico

Tabella 6: Lesioni valutate nella Classificazione Banff 2018

Sulla base dell'analisi e delle valutazioni della percentuale in cui sono presenti le singole lesioni, la biopsia viene classificata in una delle sei categorie secondo la Classificazione di Banff 2018.

**TABLE 2.**  
**This is a synopsis of the thresholds for all Banff Lesion Scores**

Banff lesion score,	Abbreviation	0	1	2	3
Interstitial inflammation	<i>i</i>	<10%	10-25%	26-50%	>50
Tubulitis	<i>t</i>	None	1-4/tubular cross section or 10 tubular epithelial cells	5-10	>10 or foci of tubular basement membrane destruction with <i>i</i> ≥ 2 and <i>t</i> 2 elsewhere
Intimal arteritis	<i>v</i>	None	<25% luminal area lost	≥25% luminal area lost	Transmural and/or fibrinoid change and medial smooth muscle necrosis
Glomerulitis	<i>g</i>	None	<25%	25-75%	>75%
Peritubular capillaritis	<i>ptc</i>	<3 leukocytes/ PTC	≥1 leukocyte in ≥10% of PTCs with max. of 3-4/PTC	≥1 leukocyte in ≥10% of PTCs with max. of 5-10/PTC	≥1 leukocyte in ≥10% of PTCs with max. of >10/PTC
C4d	<i>C4d</i>	None	<10%	10-50%	>50%
Interstitial fibrosis	<i>ci</i>	≤5%	6-25%	26-50%	>50%
Tubular atrophy	<i>ct</i>	None	≤25%	26-50%	>50%
Vascular fibrous intimal thickening	<i>cv</i>	None	≤25%	26-50%	>50%
GBM double contours	<i>cg</i>	None	1a: only by EM 1b: ≤25% by LM	26-50%	>50%
Mesangial matrix expansion	<i>mm</i>	None	≤25%	26-50%	>50%
Arteriolar hyalinosis	<i>ah</i>	None	Mild to moderate in ≥1	Moderate to severe in >1	Severe in many
Hyaline arteriolar thickening	<i>aah</i>	None	1 without circumferential	≥1 without circumferential	circumferential
Total inflammation	<i>ti</i>	<10%	10-25%	26-50%	>50%
Inflammation in the area of IFTA	<i>i-IFTA</i>	<10%	10-25%	26-50%	>50%

The user of this table should be familiar with the exact definitions underlying each individual Banff Lesion Score. Reliance on these thresholds alone without consideration of the regulatory statutes behind these scores is strongly discouraged. max., maximum; PTC, peritubular capillary.

Figura 7: Score associati alle lesioni nella Classificazione di Banff 2018

## 1.5 RIGETTO

Il rigetto è una delle cause principali di fallimento del trapianto. Si parla di rigetto quando il sistema immunitario del ricevente attacca il nuovo organo riconoscendolo come non-self. Esistono due tipi di rigetto: il rigetto cellulo-mediato o mediato dalle cellule T (T cell-mediated rejection, TCMR) e il rigetto anticorpo-mediato (antibody-mediated rejection, AMR). Entrambi possono essere acuti o cronici, precoci o tardivi nel decorso post trapianto. Le cellule coinvolte nel rigetto sono i linfociti T, i linfociti B, le plasmacellule, gli eosinofili ed i leucociti neutrofili. Le strutture bersaglio sono prevalentemente le cellule tubulari e l'endotelio.<sup>13</sup>

### 1.5.1 Rigetto mediato dalle cellule T (TCMR)

Viene definito come un declino della funzione renale del rene trapiantato e viene identificato da specifiche lesioni identificate con biopsia renale.<sup>14</sup> A creare il danno al trapianto concorrono sia l'immunità adattativa che l'immunità innata.<sup>13</sup>

Secondo la Classificazione di Banff, il TCMR può essere:

- TCMR acuto: caratterizzato da lesioni acute
- TCMR borderline: caratterizzato da lesioni sospette per il rigetto acuto
- TCMR cronico attivo: caratterizzato da lesioni croniche attive

Il TCMR acuto si caratterizza istologicamente con danno tubulare, presenza di infiltrato linfocitario CD4+ e CD8+, edema interstiziale e presenza di neutrofili o cellule mononucleate nei capillari peritubulari.

Esiste anche il rigetto subclinico, evidenziato istologicamente ma senza un aumento della concentrazione sierica di creatinina.<sup>14</sup> È di fondamentale importanza identificare il rigetto subclinico per procedere in maniera tempestiva con il trattamento adeguato. Infatti, si manifesta in modo asintomatico, mantenendo la funzionalità renale nella norma.

L'incidenza del TCMR è del 10-15%<sup>14</sup>, ridotta notevolmente negli ultimi anni grazie alle efficaci terapie immunosoppressive, rappresenta ancora oggi una delle principali cause di fallimento prematuro dell'organo.

### 1.5.2 Rigetto anticorpo-mediato (AMR)

Il rigetto anticorpo-mediato si manifesta come risposta immunitaria nei confronti degli antigeni HLA del donatore espressi sulle cellule endoteliali.

In base alla fase temporale in cui si manifesta, si distinguono tre tipi di AMR: iperacuto, acuto e cronico.<sup>15</sup>

- *AMR iperacuto*: avviene dopo minuti od ore dal trapianto a causa di anticorpi preformati ad alto titolo nei confronti del donatore (DSA).<sup>15</sup> Si

tratta di un evento raro perché questi anticorpi vengono rilevati pre-trapianto tramite tecniche di cross-match ricevente-donatore.<sup>13</sup>

- *AMR acuto*: si manifesta a partire da qualche giorno a qualche settimana posto trapianto ed è dovuto ad anticorpi contro il donatore (DSA) circolanti che si sono preformati a basso titolo o si sono sviluppati post-trapianto e si localizzano a livello dell'organo. Si verifica nel 5-7% di tutti i trapianti renali.<sup>15</sup>

Il danno creato dalla presenza degli anticorpi nel rigetto acuto umorale può essere complemento dipendente o indipendente identificati in base alla presenza o meno di C4d.<sup>16</sup>

Il C4d è un prodotto complementare che si forma dalla frammentazione del C4b in C4d e C4c. La presenza del C4d nei capillari peritubulari e nei capillari glomerulari indica la presenza di un'attività antigene-anticorpo con attivazione della cascata del complemento a livello endoteliale, che è espressione di attacco anticorpale.<sup>15</sup>

- Il danno complemento dipendente è caratterizzato dalla presenza di depositi di C4d nei capillari peritubulari che viene rilevata sul tessuto di biopsia renale tramite tecniche immunoistochimiche. Il processo prevede il legame tra gli anticorpi e l'endotelio vascolare. In seguito, si ha l'attivazione della cascata del complemento che termina con la formazione del MAC - *complesso di attacco alla membrana* e conseguente lisi cellulare.

La lisi cellulare provoca un danno endoteliale che provoca alterazioni nella permeabilità dei vasi e un richiamo di cellule infiammatorie. A livello istologico si osserva capillarite peritubulare e glomerulite.<sup>16</sup>

- Il danno complemento-indipendente è caratterizzato dall'assenza di deposito C4d nei capillari peritubulari. Si manifesta con lesioni istologiche simili a quelle generate dal danno complemento-dipendente dovute all'attivazione della risposta infiammatoria generata dalla presenza di molecole pro-infiammatorie a livello endoteliale.
- *AMR cronico*: si manifesta dopo mesi o anni dal trapianto e prende il nome di nefropatia cronica. Gli anticorpi possono mediare anche un rigetto cronico che ha una prevalenza del 5% ad un anno dal trapianto e del 20% a 5 anni dal trapianto.<sup>15</sup> È caratterizzato da fibrosi interstiziale e atrofia tubulare.

L'AMR può verificarsi anche come risposta immunitaria nei confronti di altri antigeni come gli antigeni del gruppo sanguigno ABO oppure a causa di autoanticorpi diretti nei confronti di autoantigeni come il recettore di tipo 1 dell'angiotensina II (AT1R) e il recettore A dell'endotelina-1 (ETAR).

## 1.5 AT1R E ANGIOTENSINA II

Il recettore di tipo 1 dell'angiotensina II (AT1R) fa parte della famiglia A dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCRs – *G-Protein Coupled Receptors*). Il gene AGT1R che codifica per la proteina AT1R si trova sul braccio lungo del cromosoma 3 (3q24) ed è formato da sei esoni.<sup>17</sup>

La struttura del recettore è divisa in tre domini: il dominio N-terminale extracellulare glicosilato, un dominio transmembrana formato da sette segmenti ad alfa-elica che attraversano la membrana e un dominio C-terminale intracellulare contenente residui di serina e treonina che sono bersaglio di fosforilazione.<sup>18</sup> I segmenti del dominio transmembrana sono collegati attraverso tre anse extracellulari e tre intracellulari. Fisiologicamente l'angiotensina II si lega in modo transitorio ad alcuni amminoacidi dell'ansa extracellulare 2 e dei segmenti transmembrana 2,3,6 e 7 del recettore, attivandolo. Il legame e l'attivazione del recettore da parte dell'angiotensina II genera un cambiamento conformazionale della struttura del recettore che permette al dominio intracellulare di accoppiare le proteine G.<sup>19</sup>

AT1R è espresso in diverse cellule, tessuti e organi come ad esempio nei vasi sanguigni, nel fegato, nel cuore e nel rene.<sup>17</sup> L'espressione del recettore è variabile e può essere influenzata da vari fattori, anche genetici. Per esempio, il polimorfismo A1166C del gene AGT1R è noto per determinare un aumento dei livelli tissutali di AT1R. Il recettore è altamente espresso a livello renale dalle cellule endoteliali, cellule mesangiali e cellule tubulari (Figura 8).<sup>20</sup>

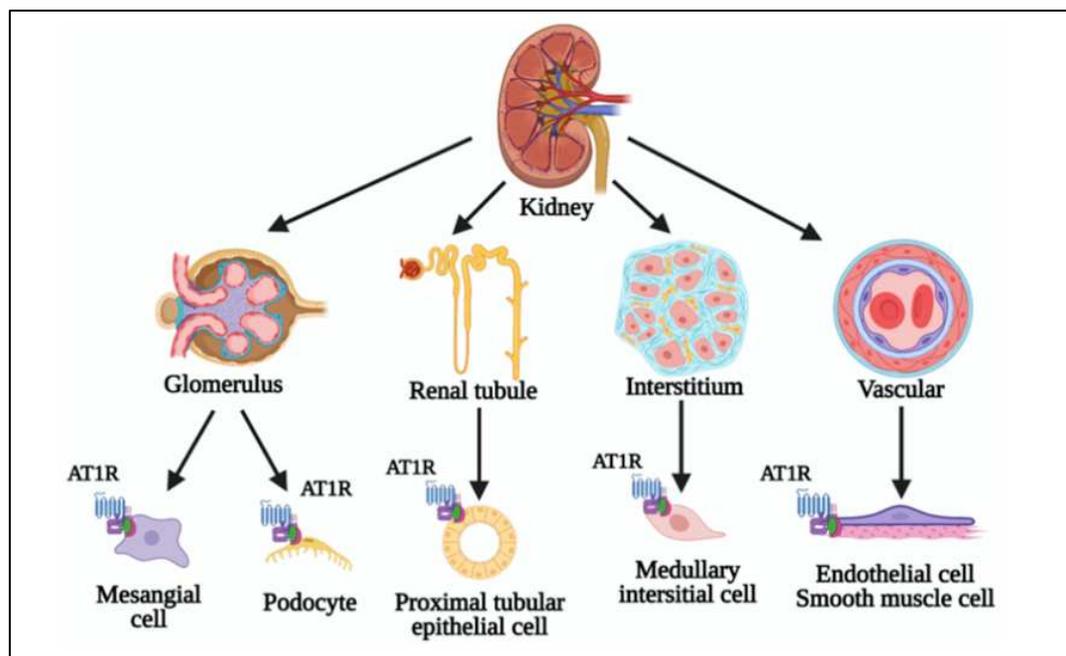


Figura 8: Espressione renale AT1R. Tratto da: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071506> (2022)

L'angiotensina II, che lega il recettore AT1R provocandone l'attivazione, viene prodotta in forma primaria, come angiotensinogeno, dal fegato e fa parte del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) che regola l'omeostasi dell'organismo agendo sulla pressione sanguigna, il volume extracellulare e la concentrazione di sodio plasmatico. Un calo della pressione sanguigna provoca un calo nella perfusione di tutti gli organi. Il rene risponde producendo renina che converte l'angiotensinogeno in angiotensina I. L'angiotensina I è a sua volta substrato di un enzima prodotto a livello polmonare ACE – Angiotensin Converting Enzyme – che la converte in angiotensina II.

L'angiotensina II, legandosi al suo recettore AT1R, stimola l'attività simpatica promuovendo la contrazione muscolare, determina un assorbimento di ioni a livello tubulare richiamando acqua all'interno dei vasi nel tentativo di ripristinare la volemia e comporta un aumento della resistenza periferica per via dell'azione di vasocostrizione arteriolare. Inoltre, stimola la corteccia del surrene a produrre aldosterone che determina l'assorbimento di ioni e acqua e stimola la ghiandola pituitaria a produrre ADH, un ormone che trova i suoi recettori nel rene e che comporta un maggiore assorbimento di acqua (Figura 9).

L'azione dell'angiotensina II ha pertanto un unico obiettivo, ovvero aumentare la pressione arteriosa.

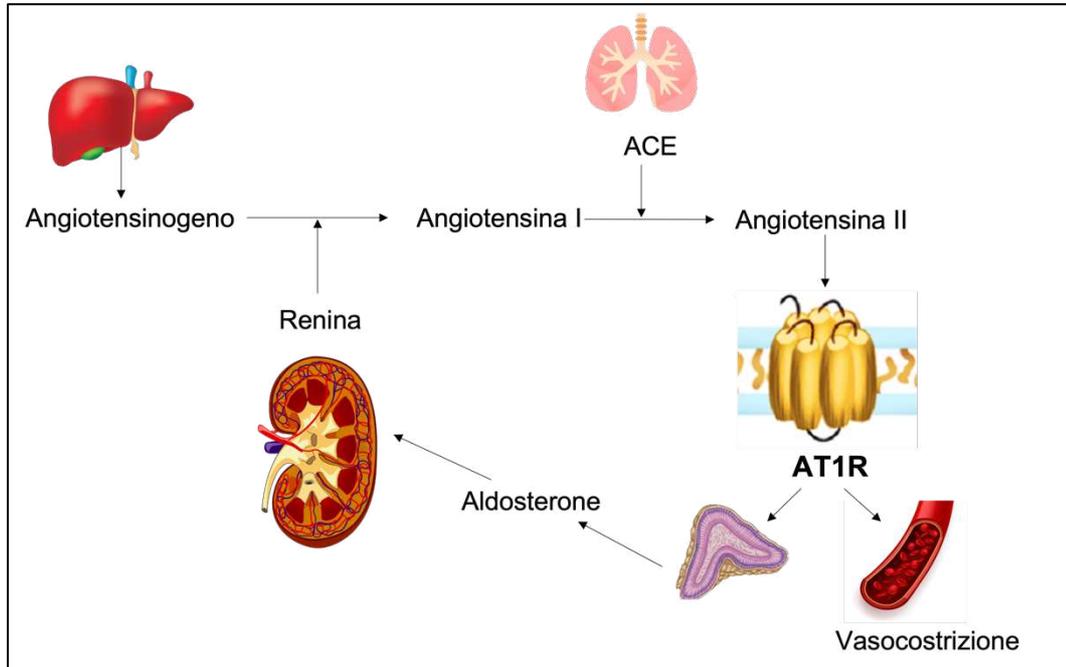


Figura 9: Formazione ed azione Angiotensina II

## 1.6 ETAR ED ENDOTELINA-1

Il recettore dell'Endotelina di tipo 1 (ETAR) fa parte della famiglia dei recettori accoppiati a proteine G ed è formato da un dominio extracellulare glicosilato seguito da 7 domini transmembrana ad alfa elica. I domini sono collegati da tre anse extracellulari e tre intracellulari. La struttura termina con un dominio intracellulare C-terminale contenente residui di serina e treonina che sono bersaglio di fosforilazione.<sup>18</sup> Il gene ENDRA (Endothelin Receptor Type A) che codifica per la proteina ETAR si trova sul braccio lungo del cromosoma 4 (4q31.22-q31.23) ed è composto da otto esoni. Il recettore è formato da 427 aminoacidi ed è localizzato in diversi organi e tessuti come il muscolo, il fegato, il cuore e il rene.<sup>17</sup> Nel rene, ETAR è ampiamente espresso nell'endotelio vascolare, nelle cellule muscolari lisce vascolari, nel mesangio, nell'interstizio e nelle cellule epiteliali tubulari (Figura 10).<sup>20,21</sup>

L'espressione del recettore è influenzata da fattori genetici e ambientali.

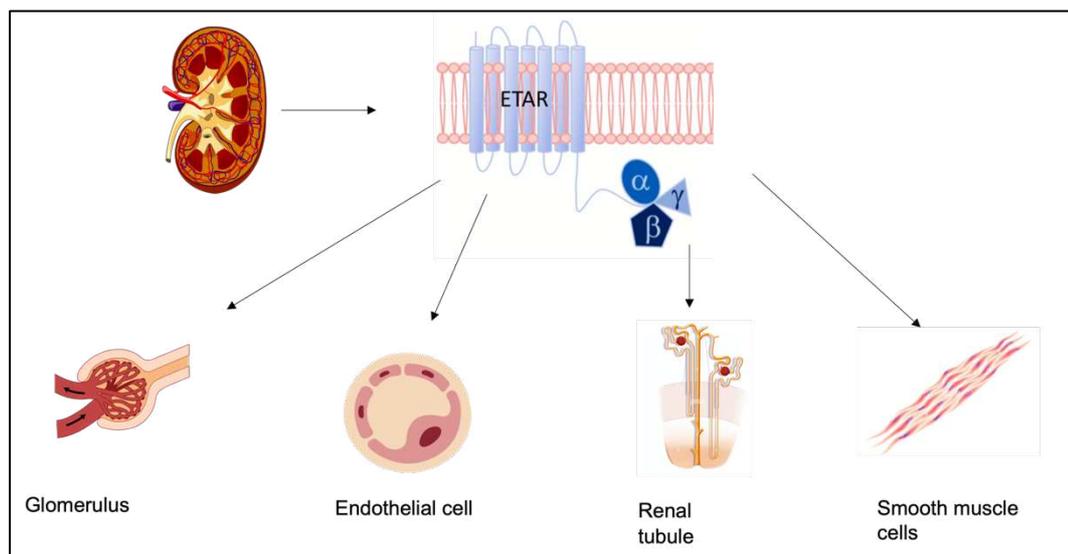


Figura 10: Espressione renale ETAR

Il recettore viene attivato attraverso il legame con l'endotelina di tipo 1. L'endotelina di tipo 1 (ET-1) è l'isoforma predominante della famiglia delle endoteline ed è formata da 21 aminoacidi.<sup>22</sup> È un peptide sintetizzato da diversi tipi di cellule, tra cui le cellule muscolari lisce, le cellule endoteliali e le cellule epiteliali renali. Viene considerata la proteina con azione vasocostrittrice più potente dell'uomo, al di sopra anche dell'angiotensina II.<sup>17</sup> L'endotelina è coinvolta nella regolazione della pressione arteriosa e nel mantenimento dell'omeostasi del bilancio del sodio. Inoltre, ha proprietà mitogeniche, pro-ossidative e proinfiammatorie e stimola la proliferazione cellulare.<sup>22</sup>

L'endotelina viene sintetizzata principalmente dalle cellule endoteliali vascolari. Viene sintetizzata a partire da un precursore inattivo, la preproendotelina

successivamente trasformata in pro-endotelina 1 che, grazie all'azione dell'enzima di conversione dell'endotelina ECE-1 – Endothelin converting enzyme –, viene convertita in endotelina 1.<sup>23</sup> La sua sintesi viene stimolata da diversi fattori rilasciati durante stati infiammatori o traumi che richiedono un'azione vasocostrittrice.

## 1.7 ICAM-1 o CD54

La molecola di adesione intercellulare-1 (ICAM-1 o CD54) è una glicoproteina transmembrana di 505 aminoacidi che fa parte della superfamiglia delle immunoglobuline ed è codificata dal gene ICAM1. Contiene cinque domini extracellulari amino-terminali che funzionano nelle interazioni adesive cellula-cellula e cellula-matrice. Presenta inoltre un singolo dominio transmembrana e un

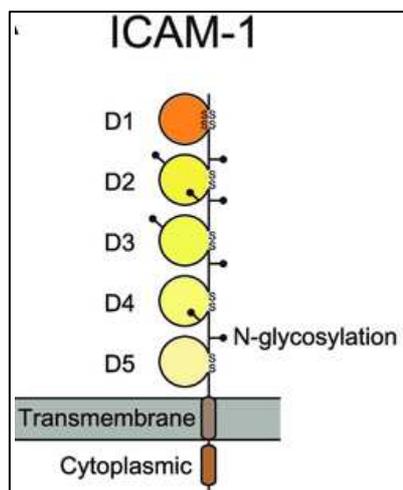


Figura 11: Struttura ICAM. Tratto da: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.588066>

dominio citoplasmatico carbossi-terminale (Figura 11). La sua struttura secondaria è il foglietto beta.

Si lega a due integrine appartenenti alla sottofamiglia 2, CD11a/CD18 (LFA-1 – *Leukocyte Function-Associated Antigen-1*) nei leucociti e CD11b/CD18 (Mac-1). Le interazioni tra ICAM-1 e le integrine sono fondamentali per la migrazione transendoteliale dei leucociti e l'attivazione dei linfociti T, dove il legame di ICAM-1 funge da segnale di co-attivazione.<sup>24</sup>

ICAM-1 è espressa costitutivamente sulla superficie cellulare di un'ampia varietà di cellule in particolar modo cellule endoteliali vascolari e cellule del sistema immunitario. La sua presenza è regolata positivamente dalle citochine proinfiammatorie, l'interleuchina IL-1, il fattore di necrosi tumorale (TNF- $\alpha$ ) e l'interferone (IFN- $\gamma$ ).

Il gene umano ICAM-1 si trova sul cromosoma 19 ed è composto da sette esoni e sei introni. ICAM-1 è up regolato principalmente a livello di trascrizione genica anche se sono riportati anche altri meccanismi di regolazione post trascrizionale.

## 1.8 VCAM-1 o CD106

La proteina di adesione delle cellule vascolari 1 (VCAM-1) o CD106 è una proteina codificata dal gene VCAM1 e appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline. È formata da sei o sette domini Ig. Le coppie di domini 1 e 4, 2 e 5, 3 e 6 sono altamente omologhe tra loro (Figura 12).

VCAM-1 si lega all'integrina VLA-4 (*Very Late Antigen 4*) o  $\alpha 4\beta 1$  che è un dimero composto da CD49d ( $\alpha 4$ ) e CD29 ( $\beta 1$ ). Il legame avviene con il dominio 1 (e/o 4) di VCAM-1.<sup>25</sup>

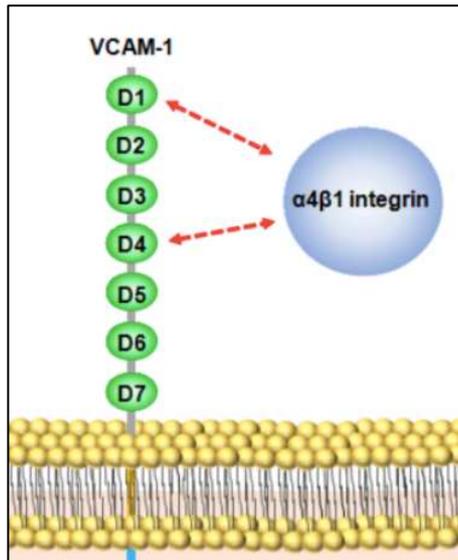


Figura 12: Struttura VCAM. Modificato e tratto da: <https://doi.org/10.3390/ijms19041057>

L'integrina si lega a VCAM-1 solo quando i leucociti vengono attivati da agenti chemiotattici o a stimoli spesso provenienti da lesioni dell'endotelio. Il legame tra VCAM-1 e VLA-4 è fondamentale per l'adesione di linfociti, monociti ed eosinofili all'endotelio vascolare e per promuovere il movimento dei leucociti verso i tessuti infiammati (Figura 13).

VCAM-1 è espressa nelle cellule della risposta immunitaria ed è altamente espressa sulle cellule endoteliali attivate. L'attivazione dell'endotelio è indotta ad esempio dal lipopolisaccaride, IL-1, TNF $\alpha$ .<sup>26</sup>

Il rigetto del trapianto, avviato dall'infiltrazione dei leucociti nei siti di infiammazione, è dovuto ad una complessa interazione tra i leucociti del ricevente e l'endotelio del donatore.

Recenti studi hanno evidenziato un aumento dell'espressione di VCAM-1 nell'endotelio degli organi trapiantati come fegato, cuore, polmoni e reni. In particolare, l'espressione di VCAM-1 nel rene trapiantato è up regolata nel rigetto soprattutto a livello della superficie basolaterale dei tubuli e nei capillari peritubulari.<sup>25</sup>

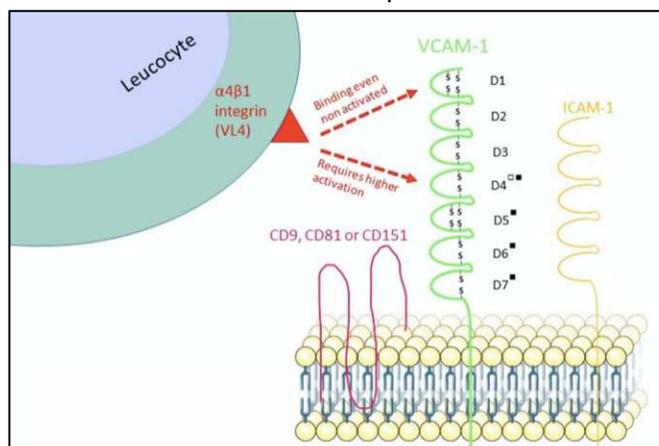


Figura 13: Legame leucocita con ICAM-1 e VCAM-1 Modificato e tratto da: <https://doi.org/10.3390/biology9110368>

## 1.9 ANTICORPI NON HLA

Gli anticorpi non-HLA vengono classificati come autoanticorpi che riconoscono antigeni non HLA localizzati in vari tessuti e cellule come cellule vascolari endoteliali, cellule vascolari muscolari lisce, cellule epiteliali tubulari, cellule mesangiali e cellule immunitarie. Poiché l'endotelio vascolare è il principale componente interposto tra il sistema immunitario del ricevente e il rene trapiantato, la maggior parte degli antigeni che innescano la formazione di anticorpi non HLA sono autoantigeni endoteliali. I meccanismi di formazione degli anticorpi non HLA non sono ancora del tutto chiari.

Lo sviluppo degli anticorpi non HLA comporta dapprima una lesione endoteliale con esposizione di neoantigeni o antigeni criptici. Questo danno può essere causato, prima del trapianto, da diversi fattori, come il danno renale acuto, la malattia renale cronica, la glomerulosclerosi focale segmentaria. Dopo il trapianto, lo sviluppo di anticorpi non-HLA è più complesso e il danno endoteliale può essere causato dal danno da ischemia-riperfusion, dalla nefropatia da BK o dal rigetto. A seguito del danno endoteliale vengono espressi sulla superficie cellulare gli autoantigeni criptici, alloantigeni, DAMP e vescicole extracellulari. Gli autoantigeni e le vescicole extracellulari attivano il riconoscimento antigenico attraverso la via indiretta. La stimolazione della risposta immunitaria attraverso la via di riconoscimento indiretta comporta il riconoscimento ed elaborazione dell'antigene da parte delle cellule presentanti l'antigene del ricevente e la loro presentazione alle cellule T del ricevente. L'attivazione di questa via porta alla selezione di cellule T autoreattive (una sottopopolazione di T helper17) e successivamente alla stimolazione di cellule B autoreattive, responsabili della produzione di anticorpi. Pertanto, la diffusione dell'epitopo, la perdita dell'autotolleranza e la reattività crociata sono processi chiave nella formazione degli autoanticorpi.<sup>20</sup>

Gli anticorpi contro i recettori accoppiati a proteine G, AT1R ed ETAR, sono stati rilevati nei sieri di pazienti con disfunzione renale. Questi anticorpi attivano i rispettivi recettori, pertanto, oltre ad essere considerati dei biomarcatori, sembra che siano tra i vari fattori ritenuti responsabili della disfunzione del trapianto.<sup>18</sup>

Tuttavia, il loro ruolo è dibattuto: questi autoanticorpi sono spesso presenti nei soggetti sani e non tutti i riceventi con elevati livelli anticorpali vanno incontro a disfunzione renale. Inoltre, il fatto che l'elevata presenza di autoanticorpi anti-AT1R sia correlata alla presenza di autoanticorpi anti-ETAR e viceversa, è difficile stabilire quale dei due contribuisca maggiormente al danno renale.

## 1.10 ANTICORPI ANTI-AT1R

Gli anticorpi anti-AT1R sono gli anticorpi non HLA più conosciuti e studiati dalla comunità scientifica. La loro presenza in elevate quantità sembra essere associata ad ipertensione maligna e ad una riduzione nella funzionalità dell'organo trapiantato. Gli anticorpi anti-AT1R sono autoanticorpi facenti parte della sottoclasse IgG1 e IgG3 di fissazione del complemento. Ciononostante, sembrano produrre lesioni endoteliali con un meccanismo complemento-indipendente attraverso l'attivazione diretta delle cellule endoteliali e il reclutamento di cellule infiammatorie nel rene trapiantato.

Il meccanismo di formazione degli anticorpi anti-AT1R è sovrapponibile a quello degli autoanticorpi non HLA.

Gli anticorpi anti-AT1R e l'angiotensina II riconoscono due epitopi diversi della seconda ansa extracellulare del recettore AT1R. La normale attivazione del recettore da parte dell'angiotensina II induce vasocostrizione delle cellule muscolari lisce e proliferazione delle cellule endoteliali vascolari. Gli anticorpi anti-AT1R si legano in modo agonistico al recettore e determinano un effetto allosterico su AT1R in modo prolungato che porta ad un'iperattivazione patologica del recettore che determina un'attività di vasocostrizione dieci volte maggiore rispetto a quella innescata dal ligando naturale (Figura 14).

Inoltre, vengono espressi alcuni fattori di trascrizione come AP-1 e NFκB responsabili dell'aumento dell'espressione genica di fattori pro-infiammatori come MCP-1 e RANTES e pro-coagulanti come il fattore tissutale. MCP-1 e RANTES sono importanti mediatori della risposta immunitaria pro-infiammatoria, coinvolti nella formazione di una serie di citochine, tra cui IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , che partecipano alla formazione dell'infiammazione microvascolare nel glomerulo e nei capillari peritubulari.

La stimolazione del rilascio del fattore di crescita endoteliale (VEGF) attiva la cascata di coagulazione e promuove la formazione di trombi. La stimolazione di AT1R presente sulla superficie delle cellule infiammatorie amplificherebbe la risposta infiammatoria microvascolare, che può portare a lesioni endoteliali e ad un'ulteriore espressione di AT1R, formando così un circolo vizioso responsabile della lesione del rene trapiantato.<sup>20</sup>

La diversa attività tra angiotensina II e anticorpi anti-AT1R potrebbe essere dovuta ad un'attivazione distorta del recettore. Infatti, l'angiotensina II si lega ed attiva due recettori: AT1R e AT2R. L'attivazione di questo secondo recettore è importante perché compensa il primo provocando vasodilatazione e influenzando meccanismi antinfiammatori e anti-fibrotici. Gli anticorpi anti-AT1R attivano AT1R ma non AT2R. In questo modo viene meno il meccanismo di compensazione ed il mantenimento di un equilibrio della pressione arteriosa viene perso.<sup>18,20</sup>

Recenti studi hanno evidenziato che pazienti con anticorpi anti-AT1R hanno un aumentato rischio di sviluppare diversi fenotipi di rigetto cellulare o anticorpale ed hanno una minor aspettativa di sopravvivenza dell'organo trapiantato a breve e lungo termine.

L'impatto negativo degli anticorpi sulla funzione del rene può essere spiegato indirettamente attraverso una maggior possibilità di sviluppare rigetto o direttamente attraverso la stimolazione dell'infiammazione e della fibrosi.

È stata dimostrata una relazione persistente tra la presenza degli anticorpi anti-AT1R e le citochine proinfiammatorie (come TNf-alfa, IL-1 etc) e un andamento negativo del trapianto, anche in assenza di rigetto.

In studi recenti, la presenza di anticorpi anti-AT1R è stata associata con lo sviluppo e la progressione di fibrosi interstiziale e perdita del rene, indipendentemente dalla presenza del rigetto. Sono necessarie ulteriori considerazioni per i pazienti positivi sia per AT1R che per gli anticorpi anti HLA-DSA che sembrano avere un effetto sinergico e un impatto negativo nella sopravvivenza dell'organo.<sup>20</sup>

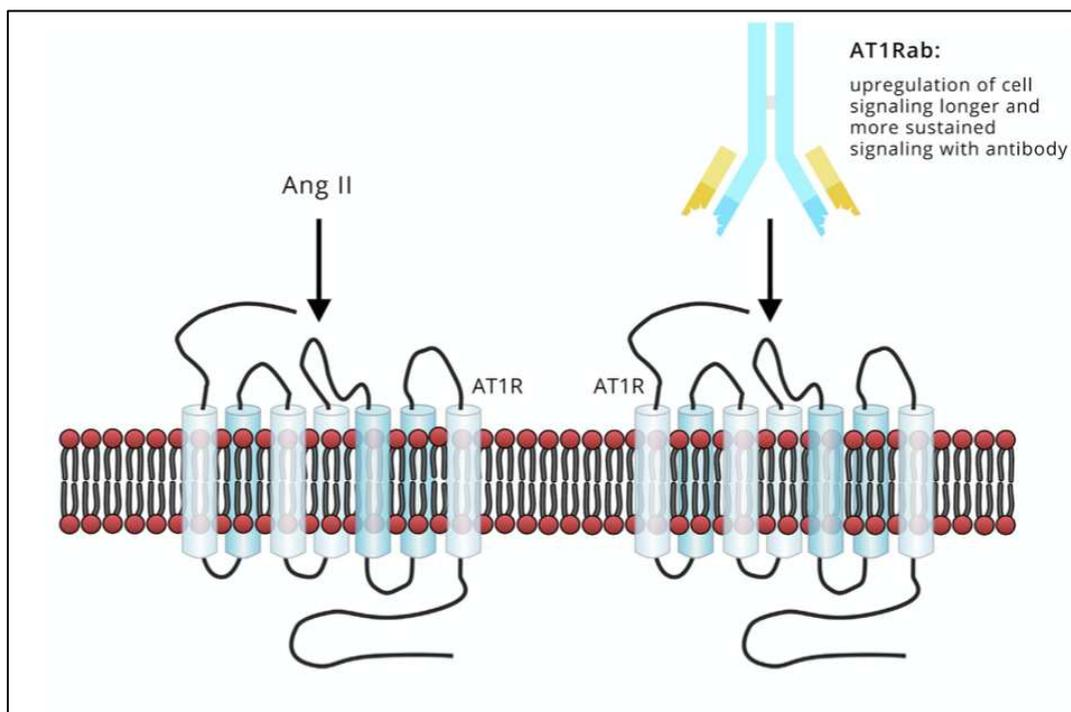


Figura 14: Legame Angiotensina II e anticorpi anti-AT1R al recettore AT1R. Tratto da: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.04.012> (2019).

## 1.11 ANTICORPI ANTI-ETAR

Gli anticorpi anti-ETAR sono autoanticorpi della classe IgG1 che si legano alla seconda ansa extracellulare del recettore ETAR. Il legame è agonistico e persistente, come quello degli anticorpi anti-AT1R. La formazione degli anticorpi è simile a quella degli anticorpi anti-AT1R dove danno endoteliale e autoimmunità si rivelano essere condizioni necessarie. L'elevata presenza di anticorpi anti-ETAR sembra essere associata al rigetto e ad un peggioramento della funzione dell'organo trapiantato con possibile perdita del rene. Inoltre, uno studio ha riportato un'associazione tra anticorpi anti-ETAR e anti-AT1R e una peggiore funzione dell'organo nei soggetti con doppia positività.<sup>20</sup>

Il fenotipo del danno creato dagli auto anticorpi non è ancora stato descritto chiaramente ma sono stati proposti due meccanismi attraverso i quali gli anticorpi anti-ETAR possano causare lesioni al trapianto: il meccanismo complemento-dipendente o indipendente. Il meccanismo complemento-dipendente comporta l'attivazione della via classica del complemento da parte degli anticorpi anti-ETAR di tipo IgG1, similmente a quanto accade con gli anticorpi anti-HLA e le biopsie risultano positive per il deposito di C4d. Inoltre, il danno causato dagli anticorpi anti-HLA durante il rigetto umorale attiva l'endotelio ed espone sulla superficie dell'endotelio i recettori ETAR a cui si legano gli autoanticorpi anti-ETAR (Figura 15).<sup>27</sup>

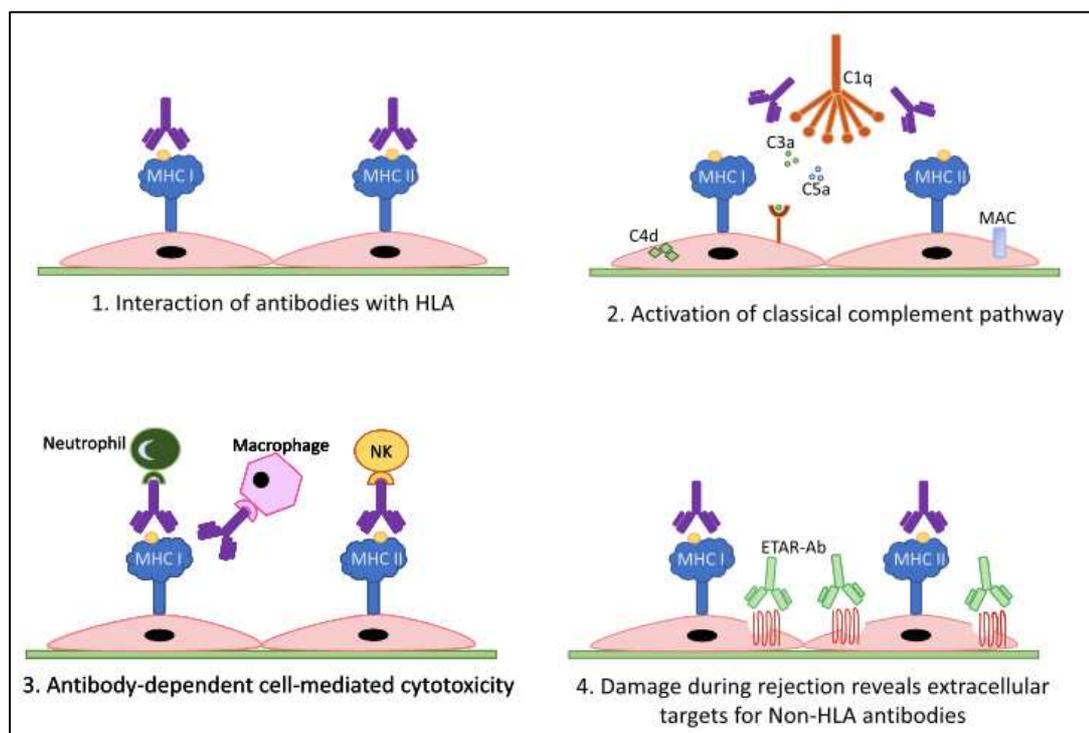


Figura 14: Meccanismo d'azione complemento-dipendente anticorpi anti-ETAR. Tratto da: <https://doi.org/10.1016/j.trim.2021.101505> (2022).

Il meccanismo complemento-indipendente è simile al meccanismo degli anticorpi anti-AT1R che comporta l'attivazione delle cellule endoteliali e il reclutamento delle cellule infiammatorie nel rene. In questo caso le biopsie risulteranno C4d negative (Figura 16).<sup>20</sup>

La normale attivazione del recettore da parte del ligando naturale Endotelina-1, svolge un ruolo nella regolazione del normale flusso sanguigno attraverso un'alternanza di eventi di vasocostrizione e vasodilatazione legando due recettori: ETAR e ETBR. L'attivazione di ETAR è responsabile della vasocostrizione mentre l'attivazione di ETBR è coinvolta nella vasodilatazione.

Gli autoanticorpi anti-ETAR si legano al recettore ETAR con grande affinità e in modo prolungato, intensificando l'attività di vasocostrizione che non è più bilanciata dall'attività di vasodilatazione del recettore ETBR che rimane inattivo. L'attivazione prolungata di ETAR provoca ipertensione, migrazione di fibroblasti, richiamo di cellule immunitarie nel rene e danno dell'organo.<sup>27</sup>

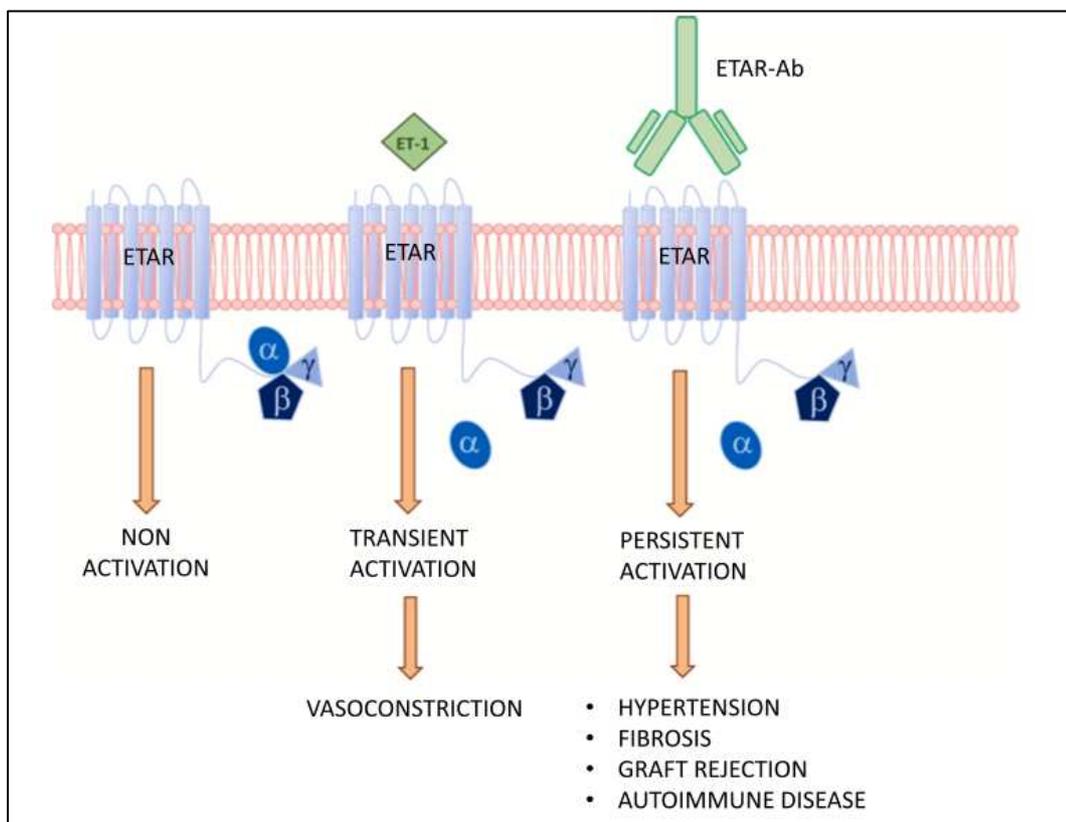


Figura 16: Meccanismo d'azione complementario-indipendente anticorpi anti-ETAR. Tratto da: <https://doi.org/10.1016/j.trim.2021.101505> (2022).

Gli anticorpi anti-ETAR sembrano aumentare il danno e il rischio di perdere l'organo dopo il trapianto.<sup>27</sup>



## 2. MATERIALI E METODI

Questa tesi si è svolta all'interno del progetto "Impact of anti-endothelin-1 receptor Type A antibodies in pediatric renal transplantation" finanziato da Cariparo e approvato dal Comitato Etico Scientifico dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

### 2.1 POPOLAZIONE

È stato condotto uno studio retrospettivo sui pazienti trapiantati nel Centro U.O.C di Nefrologia Pediatrica Dialisi e Trapianto del Dipartimento di Pediatria di Padova. I campioni sono stati utilizzati con il consenso informato dei genitori.

Per l'arruolamento dei pazienti è stato creato un apposito database comprendente 167 pazienti pediatrici trapiantati da gennaio 2011 a giugno 2022. I pazienti in questione sono stati sottoposti ad un follow up a tempi prestabiliti a 6, 12 e 24 mesi post trapianto tramite esami ematochimici e biopsia di protocollo. Sono stati consultati database clinici per ricavare informazioni sulle biopsie e sieri di follow up di ogni paziente.

### 2.2 SAGGIO ELISA

I sieri dei pazienti sono stati analizzati in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Emanuele Cozzi (UOSD Immunologia dei Trapianti) tramite saggio ELISA per valutare i livelli anticorpali anti-AT1R e anti-ETAR.

Il saggio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) è una tecnica che permette di valutare quantitativamente la presenza di un antigene o anticorpo in un dato campione. Esistono quattro tipi di test ELISA: diretto, indiretto, competitivo e a sandwich. In questo caso, è stato utilizzato il saggio ELISA indiretto che prevede la presenza dell'antigene immobilizzato sul fondo del pozzetto della micropiastra. In seguito, viene aggiunto il campione contenente gli anticorpi diretti contro l'antigene specifico che si legheranno sul fondo della piastra. Infine, un anticorpo secondario legato ad un enzima di rilevazione si legherà all'anticorpo primario. In base alla quantità di anticorpi presenti sul campione, ogni pozzetto avrà un colore diverso che verrà letto tramite un lettore di assorbanza per ELISA. Quanti più anticorpi sono presenti, tanto più intenso sarà il colore e maggiore l'assorbanza.

Sono stati utilizzati i seguenti kit: EIA for Quantitative Determination of anti-Angiotensin II Receptor 1 (AT1R)-Antibodies (CellTrend GmbH) e EIA for Quantitative Determination of anti-Endothelin Receptor A (ETAR)-Antibodies (CellTrend GmbH).

Per l'esecuzione del saggio ELISA i reagenti sono stati portati a temperatura ambiente e sono stati preparati wash buffer e anticorpo secondario coniugato all'enzima di rilevazione. Sono stati preparati i campioni di siero in diluizione 1:100 e sono stati caricati in duplicato nei pozzetti al cui fondo è legato l'antigene AT1R o ETAR. Assieme ai campioni sono stati caricati un controllo positivo, uno negativo e campioni di BSA a concentrazioni crescenti utili per costruire la curva di taratura. In seguito, la piastra è stata incubata in frigo per due ore. Al termine dell'incubazione i pozzetti della piastra sono stati lavati con il wash buffer ed è stato caricato l'anticorpo secondario coniugato all'enzima. L'incubazione con l'anticorpo secondario prevede un'ora in agitazione a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, i pozzetti sono stati nuovamente lavati con il wash buffer ed è stato caricato in ogni pozzetto il substrato cromogeno che deve incubare al buio a temperatura ambiente per venti minuti. Infine, viene aggiunta la soluzione di stop e l'assorbanza a 450 nm deve essere determinata entro massimo 30 minuti. Per il calcolo dei risultati è stata creata una curva standard che vedeva nell'asse delle ascisse la concentrazione del campione espressa in U/ml e nell'asse delle ordinate l'assorbanza. Sulla base della curva standard e delle assorbanze ottenute, sono state calcolate le concentrazioni dei vari campioni.

<10 U/ml	NEGATIVO
10-17 U/ml	BORDERLINE
>17 U/ml	POSITIVO
>40 U/ml	ALTAMENTE POSITIVO

*Tabella 7: Tabella interpretazione valori SAGGIO ELISA*

Sulla base dei valori ottenuti sono stati selezionati 12 pazienti che avessero siero e biopsia corrispondente al T0, 6 e 24 mesi post trapianto. Di questi pazienti sono stati scelti 6 pazienti con alti livelli anticorpali anti-AT1R e anti-ETAR (>40 U/ml) durante tutto il periodo di follow up considerati positivi e 6 pazienti con bassi livelli anticorpali (<17 U/ml) durante tutto il periodo di follow up considerati negativi. I pazienti scelti presentano tutti una doppia positività o negatività degli anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR.

Dei 12 pazienti selezionati sono stati recuperati i vetrini della valutazione istologica e i blocchetti di tessuto FFPE (fissati in formalina e inclusi in paraffina) per preparare i vetrini per immunistochemica e fluorescenza. Per ogni paziente sono state raccolte le biopsie a tre tempi diversi: T0, 6m, 24m per un totale di 36 blocchetti. Da ogni biopsia corrispondente a 6 e 24 mesi sono state tagliate 6 sezioni a formare 6 diversi vetrini indirizzate a diverse tecniche (4 vetrini per IHC e 2 per FISH), per le biopsie dei T0 sono stati preparati 4 vetrini per IHC, per un totale di 192 vetrini come riportato nello schema sottostante (Tabella 8).

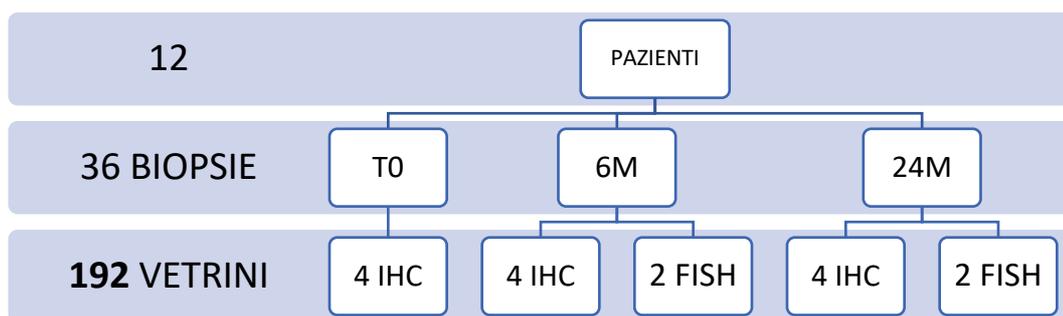


Tabella 8: Schema riassuntivo dei vetrini allestiti per l'analisi immunohistochimica

I frustoli di tessuto prelevati dal rene trapiantato, già inclusi in paraffina, sono stati tagliati al microtomo in fette di tessuto di 4 µm di spessore e fatti aderire a vetrini polisinati (il rivestimento superficiale di lisina migliora l'adesione del tessuto al vetrino).

### 2.3 RIVALUTAZIONE DELL' ISTOLOGIA SECONDO BANFF 2018

Ogni biopsia relativa alle tempistiche di follow up selezionate (0,6,24 mesi) è stata rivalutata secondo classificazione Banff 2018 considerando le 13 lesioni riportate in Tabella 6 e assegnando un punteggio ad ognuna. Sono stati rivalutati quindi i vetrini allestiti per le quattro colorazioni standard: Ematossilina ed Eosina, PAS, Silver PAS e Tricromica di Masson. Per lo stesso scopo, sono state rivalutate anche le immunohistochimiche relative alla presenza di C4d come marker per il rigetto umorale.

### 2.4 IMMUNOISTOCHEMICA – IHC AT1R, ETAR, VCAM-1, ICAM-1

L'immunohistochimica (IHC) è una metodica che prevede l'utilizzo di anticorpi per evidenziare antigeni tissutali, in questo caso proteine su tessuto paraffinato FFPE. Il principio si basa sulla visualizzazione di queste molecole tramite l'applicazione sequenziale di un anticorpo primario specifico per l'antigene ricercato, un anticorpo secondario che lega il primario e di un complesso enzimatico (perossidasi). Il complesso enzimatico reagisce con un substrato cromogeno (3,3'-diamminobenzidina in soluzione cromogena: DAB) producendo una colorazione marrone osservabile al microscopio ottico. Viene utilizzato il metodo indiretto che prevede l'utilizzo di due anticorpi da specie animali diverse. Il primario specifico per l'antigene da ricercare, il secondario (coniugato con un tracciante enzimatico), diretto contro le IgG dell'anticorpo primario.

Per visualizzare sul tessuto i recettori AT1R, ETAR e le molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1, è stata messa a punto la tecnica provando a diluire l'anticorpo primario a diverse concentrazioni per ottenere un risultato ottimale. La diluizione è stata fissata a 1:200 per tutti i 4 anticorpi primari.

Inoltre, è stato allestito un vetrino come controllo negativo. Il controllo negativo è stato trattato con acqua al posto dell'anticorpo primario. Successivamente è stato incubato con l'anticorpo secondario e colorato con la DAB.

Sono stati utilizzati gli anticorpi riportati in Tabella 9.

COMPANY	ANTIBODY	HOST	REACTIVITY	CLONALITY	ISOTYPE	MW (kDa)
GeneTex	AGT1R	Rabbit	Human, Mouse, Rat	Polyclonal	IgG	41
GeneTex	Endothelin A Receptor (C3)	Rabbit	Human, Mouse, Rat, Chicken	Polyclonal	IgG	49
GeneTex	ICAM1/CD54	Rabbit	Human, Rat	Polyclonal	IgG	58
GeneTex	VCAM1/CD106	Rabbit	Human	Polyclonal	IgG	81

*Tabella 9: Anticorpi utilizzati per immunoistochimica*

La tecnica immunoistochimica prevede l'inclusione dei frustoli di tessuto in paraffina ed il loro taglio con il microtomo in sezioni di 4 µm di spessore. Le sezioni vengono incubate over night a 37 °C per migliorare l'adesione al vetrino polarizzato e vengono incubate in stufetta a secco a 60 °C qualche minuto prima del loro utilizzo. Si procede con la sparaffinatura delle sezioni di tessuto tramite passaggi sequenziali in Histo-Clear e con l'idratazione delle sezioni tramite passaggi sequenziali in alcol assoluto sotto cappa chimica. Si eseguono i lavaggi in PBS. Successivamente i vetrini vengono immersi in una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% al buio e vengono lavati in PBS. L'utilizzo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è finalizzato ad eliminare le perossidasi interne per eliminare il rumore di fondo che potrebbe generarsi dalla cross reazione del substrato cromogeno con il tessuto.

Si procede con il processo di smascheramento antigenico necessario per permettere all'anticorpo primario di legarsi all'antigene. Infatti, la struttura secondaria della proteina viene bloccata durante il processo di fissazione e, se rimasta intatta, può essere ripristinata attraverso un processo termico. Il processo prevede l'immersione dei vetrini in una soluzione di tampone citrato presente all'interno di pozzetti termoresistenti con il tappo a vite e l'utilizzo del microonde a 250W. Terminati i cicli in microonde, i pozzetti vengono posizionati sotto cappa chimica all'interno di vaschette contenenti acqua distillata fredda per il raffreddamento dei vetrini che vengono successivamente lavati con PBS.

Si procede con l'allestimento di una camera umida oscura. I vetrini vengono asciugati e, utilizzando una pap-pen viene delimitata nel vetrino la zona contenente il tessuto per evitare la dispersione dei reagenti nelle fasi successive. Le sezioni di tessuto vengono incubate in camera umida con BSA al 2%. Questa operazione è fondamentale per bloccare i siti aspecifici di legame all'anticorpo.

Terminata l'incubazione con BSA i vetrini vengono lavati con PBS e vengono nuovamente posizionati in camera umida. Vengono incubati un'ora con l'anticorpo primario adeguatamente diluito. Nel caso in questione la diluizione scelta a seguito della messa a punto corrisponde a 1:200 per tutti gli anticorpi utilizzati (anti-AT1R, anti-ETAR, anti-iCAM1 o anti-VCAM1). Terminata l'incubazione con l'anticorpo primario, i vetrini vengono lavati con PBS e vengono asciugati e posizionati in camera umida. Su ogni vetrino vengono posizionate due gocce di anticorpo secondario coniugato a perossidasi "EnVision™+ Dual Link System-HRP" (anti-Rabbit) e vengono incubati al buio in camera umida per trenta minuti. Al termine dell'incubazione i vetrini vengono lavati con PBS e posizionati in camera umida aperta sotto cappa chimica. Si procede con il sistema di rivelazione. Per lo sviluppo della reazione con il cromogeno 3,3'-diamminobenzidina (DAB) è necessario lavorare con i guanti e sotto cappa chimica, in quanto la DAB risulta una sostanza cancerogena per contatto. La DAB viene conservata in frigo a +4°C e deve essere preparata al momento del suo utilizzo diluendo una goccia di DAB cromogeno in 1mL di soluzione di buffer substrato presente nel kit DAB facendo attenzione a mescolare bene il cromogeno che tende a depositarsi sul fondo. La soluzione viene posizionata sopra alle sezioni di tessuto di ogni vetrino e viene fatta agire per cinque minuti. Per bloccare la reazione i vetrini vengono lavati con acqua distillata. Inoltre, si effettua un rapido passaggio in Ematossilina di Meyer per contro-colorare i nuclei delle cellule e i vetrini vengono lavati con acqua di fonte.

Infine, si procede con il montaggio dei vetrini che prevede tre rapidi passaggi sequenziali in alcol assoluto, tre rapidi passaggi in Histo-Clear ed un passaggio finale in Histo-Clear mont. L'allestimento dei vetrini prevede l'utilizzo del balsamo Eukitt e il posizionamento del vetrino coprioggetto sopra la sezione di tessuto.

Per l'analisi immunohistochimica sono stati preparati 4 vetrini per ogni biopsia, per un totale di 144 vetrini.

## 2.5 TECNICHE DI VALUTAZIONE IHC

I vetrini preparati tramite tecnica immunoistochimica sono stati analizzati utilizzando una valutazione semiquantitativa. Sono stati presi in considerazione quattro compartimenti: glomerulo, tubulo, vasi e interstizio che sono stati ulteriormente divisi in compartimenti più piccoli per permettere un'analisi più puntuale ed approfondita. Per il glomerulo sono state valutate le cellule mesangiali e i capillari glomerulari. I tubuli sono stati differenziati in tubuli distali e tubuli prossimali. I vasi principalmente analizzati sono i capillari peritubulari e le arterie. Infine, nell'interstizio viene valutata la presenza di cellule infiltrate.

Per la visualizzazione dei vetrini viene utilizzato il microscopio ottico Leica DMLB 30W collegato alla telecamera Leica DFC450C. Per l'analisi di ogni vetrino è stato utilizzato il software di analisi di immagine Leica Application Suite V4 e sono stati impostati i seguenti parametri: luminosità 65%, saturazione 0,90 e gamma 0,65.

Ogni compartimento è stato valutato sulla base dell'intensità del colore visualizzato utilizzando un grading di intensità (Tabella 10).

0	ASSENTE
1+	LIEVE
2+	MODERATO
3+	SEVERO

Tabella 10: Criteri di valutazione analisi semiquantitativa immunoistochimica

Ad ogni vetrino viene attribuito un punteggio totale che viene diviso per i quattro diversi compartimenti per ottenere un valore finale medio dato dall'intensità di colore del vetrino. Per fare l'analisi è stata creata un'apposita tabella (Tabella 11).

LOCALIZZAZIONE	TEMPO DI FOLLOW UP		ANTICORPI			
			AT1R	ETAR	VCAM-1	ICAM-1
GLOMERULI	MESANGIO					
	CG					
TUBULI	PROSSIMALI					
	DISTALI					
VASI	PTC					
	ARTERIE					
INTERSTIZIO	CELLULE					
	INFILTRATE					

Tabella 11: Tabella valutazione semiquantitativa immunoistochimica

**2.6 MESSA A PUNTO IBRIDAZIONE IN SITU AT1R, ETAR, ICAM1, VCAM1**  
 L'ibridazione in situ a fluorescenza (FISH) è una tecnica citogenetica usata per rilevare e localizzare specifiche sequenze di DNA. Può essere utilizzata anche per rilevare specifici target di RNA come, ad esempio, l'mRNA. Impiega le sonde che sono specifiche sequenze di acidi nucleici che mirano a sequenze complementari di interesse.

Di norma si esegue su cellule fresche o in coltura ma può essere eseguita anche su tessuto paraffinato FFPE come valida alternativa. La FISH su tessuto FFPE non è una tecnica utilizzata universalmente perché viene ritenuta impegnativa. Questa tecnica ha il vantaggio di preservare la morfologia del tessuto e consente il confronto diretto tra i risultati ottenuti con la FISH e i dettagli morfologici osservati sulle colorazioni istologiche standard. Il risultato può essere influenzato però da diversi fattori quali le condizioni di fissazione, l'età della sezione, il tipo di tessuto e lo spessore della sezione stessa. Per questo motivo, è necessario personalizzare il trattamento delle sezioni prima di procedere con l'ibridazione.<sup>28</sup>

Le sonde a RNA sono state progettate sul trascritto dei geni AGT1R, ENDRA, ICAM1 e VCAM1 per la visualizzazione dei rispettivi mRNA (Tabella 12).

GENE	MOLECOLA	SPECIE	GENE ID	TRASCritto
AGT1R	AT1R (angiotensin II receptor type 1)	Homo sapiens (human)	185	NM_000685
ENDRA	ETAR (endothelin receptor type A)	Homo sapiens (human)	1909	NM_001957.4
ICAM1	ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1)	Homo sapiens (human)	3383	NM_000201.3
VCAM1	VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1)	Homo sapiens (human)	7412	NM_001078.4

*Tabella 12: Sonde progettate per FISH*

Per ciascun mRNA target sono state disegnate 48 sonde di 20 nucleotidi ciascuna che legano il trascritto di media ogni 50 basi.

Le sonde progettate sono state legate direttamente a specifici fluorofori.

I fluorofori utilizzati sono TAMRA-C9 che ha il picco di eccitazione a 555nm e il picco di emissione a 576nm ed Quasar 670 che ha il picco di eccitazione a 647nm e il picco di emissione a 670nm. Il fluoroforo TAMRA-C9 restituisce una fluorescenza nello spettro del giallo-arancio mentre Quasar 670 restituisce una colorazione nello spettro del rosso.

Per ottimizzare le reazioni sono state co-ibridate due sonde con fluorofori diversi nella stessa sezione di tessuto. In particolare, la sonda per AT1R (fluorescenza rossa) con la sonda per ETAR (fluorescenza gialla) e la sonda per ICAM-1 (fluorescenza rossa) con la sonda per VCAM-1 (fluorescenza gialla).

La tecnica prevede l'inclusione dei frustoli di tessuto in paraffina ed il loro taglio con il microtomo in sezioni di 4  $\mu\text{m}$  di spessore. Le sezioni vengono incubate overnight a 37 °C per migliorare l'adesione al vetrino polarizzato. È necessario utilizzare materiali e reagenti RNAasi-free per prevenire la degradazione dell'RNA. Si procede con la sparaffinatura delle sezioni di tessuto tramite passaggi sequenziali in Histo-Clear e con l'idratazione delle sezioni tramite passaggi sequenziali in alcol assoluto, alcol 95% e alcol 70% sotto cappa chimica.

Si eseguono i lavaggi in PBS. Successivamente i vetrini vengono immersi in una soluzione di proteinasi K 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS e vengono incubati al buio a 37°C. La proteinasi K è fondamentale per rimuovere le proteine e i legami proteina-proteina e proteina-acido nucleico che si creano durante la fissazione in formalina e l'inclusione in paraffina. Si procede con i lavaggi in PBS. I vetrini vengono immersi in una soluzione di Wash Buffer A e successivamente asciugati e posizionati in una camera umida. Per l'ibridazione vengono preparate le sonde diluite 1:100 in Buffer di ibridazione. Per la preparazione delle sonde vengono aliquotate all'interno della stessa provetta due sonde diverse (rossa-gialla). Vengono posizionate le sonde sopra la sezione di tessuto che viene successivamente coperta da un vetrino coprioggetto per permettere una distribuzione omogenea della sonda su tutto il campione. Si procede con l'incubazione dei vetrini overnight a 37 °C al buio in camera umida.

Il giorno seguente vengono lavati i vetrini e incubati in una soluzione di Wash Buffer A a 37°C al buio. Una volta lavati i vetrini vengono asciugati e posizionati in camera umida. Le sezioni di tessuto vengono coperte da una soluzione contenente DAPI 5ng/mL e vengono incubate al buio a 37 °C. Il DAPI (4',6-diamin-2-fenilindolo) è un colorante organico fluorescente che lega fortemente le regioni del DNA ricche in sequenza AT. Viene ampiamente utilizzato nella microscopia a fluorescenza perché permette la visualizzazione dei nuclei cellulari. I vetrini vengono successivamente lavati in una soluzione di Wash Buffer B. Si procede con il montaggio dei vetrini per il quale viene utilizzato il ProLong Antifade Mountants per fissare il vetrino coprioggetto sulla sezione. I vetrini vengono conservati al buio in frigo +4°C e sono pronti per la visualizzazione al microscopio a fluorescenza Zeiss Axio Observer e al microscopio confocale Zeiss LSM 800.

## 2.7 STATISTICA

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software GraphPad Prism versione 9.4.1. Per verificare la distribuzione normale dei dati è stato eseguito il test di Shapiro-Wilk. Poiché i dati non sono distribuiti normalmente, per analizzare le differenze delle medie tra il gruppo di campioni positivi e il gruppo di campioni negativi è stato eseguito il test non parametrico di Mann-Whitney U a due code per campioni non appaiati considerando il livello di significatività  $\alpha=0.05$ .



## 3. RISULTATI

### 3.1 POPOLAZIONE

La popolazione analizzata è composta da 167 pazienti pediatrici trapiantati nel centro U.O.C. di Nefrologia Pediatrica Dialisi e Trapianto del Dipartimento di Pediatria di Padova. Si tratta di pazienti pediatrici: 117 maschi e 50 femmine trapiantati da gennaio 2011 a giugno 2022. Di questi, 14 pazienti hanno ricevuto un trapianto da donatore vivente. L'età media al trapianto è di 8 anni e 8 mesi.

I 12 pazienti sono stati scelti per lo studio in base ai livelli noti di anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR e alla presenza di biopsia e siero corrispondente a 6 e 24 mesi post trapianto. Si tratta di pazienti trapiantati da gennaio 2011 a novembre 2019, 5 pazienti pediatrici femmine e 7 pazienti pediatrici maschi. Di questi, 3 hanno ricevuto l'organo da donatore vivente e 9 da donatore deceduto. Le patologie di base che hanno portato i pazienti a insufficienza renale sono principalmente anomalie congenite di rene e vie urinarie, note sotto l'acronimo di CAKUT, (es. displasia renale mono/bilaterale, ipoplasia renale mono/bilaterale, duplicità ureterale, reflusso vescicoureterale). Nel dettaglio: 6 pazienti avevano CAKUT, 5 pazienti avevano patologie genetiche rare (es. ARPKD, nefronoftisi, complementopatie, deficit da coenzima Q10) e 1 paziente aveva nefrite interstiziale cronica.

### 3.2 PREVALENZA DEGLI ANTICORPI CIRCOLANTI ANTI-AT1R e ANTI-ETAR NELLA POPOLAZIONE PEDIATRICA

Recenti studi hanno evidenziato l'importanza degli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR nel trapianto renale pediatrico. La presenza di livelli anticorpali elevati post trapianto sembra essere associata a infiammazione vascolare e danno renale.<sup>29</sup>

Nella popolazione pediatrica gli anticorpi in questione sembrano avere livelli più elevati rispetto alla popolazione adulta. Per confrontare la popolazione presa in considerazione in questa tesi con i dati in letteratura è stata effettuato il dosaggio degli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR al momento del trapianto (T0), a 6 e 24 mesi post trapianto tramite saggio ELISA.

Dai risultati emerge che nel 42% dei pazienti totali sono presenti elevate quantità (>40 U/ml) di anticorpi anti-AT1R circolanti e nel 49,5% dei pazienti totali sono presenti elevate quantità di anticorpi anti-ETAR circolanti già prima del trapianto. Nella maggior parte dei casi i pazienti presentano una doppia positività.

Il 43,2% dei pazienti risulta negativo al dosaggio degli anticorpi anti-AT1R e il 40,4% dei pazienti risultano negativi al dosaggio degli anticorpi anti-ETAR durante tutto il periodo di follow up.

Il 14,8% dei pazienti pediatrici sviluppa gli anticorpi anti-AT1R de novo post trapianto e il 10,1% sviluppa gli anticorpi anti-ETAR de novo.

Per alcuni pazienti erano disponibili ulteriori sieri dopo i 24 mesi di follow up fino a 10 anni post trapianto. Per questi è stato possibile effettuare il dosaggio anticorpale e i dati puntuali sono riportati nel grafico seguente (Figura 17).

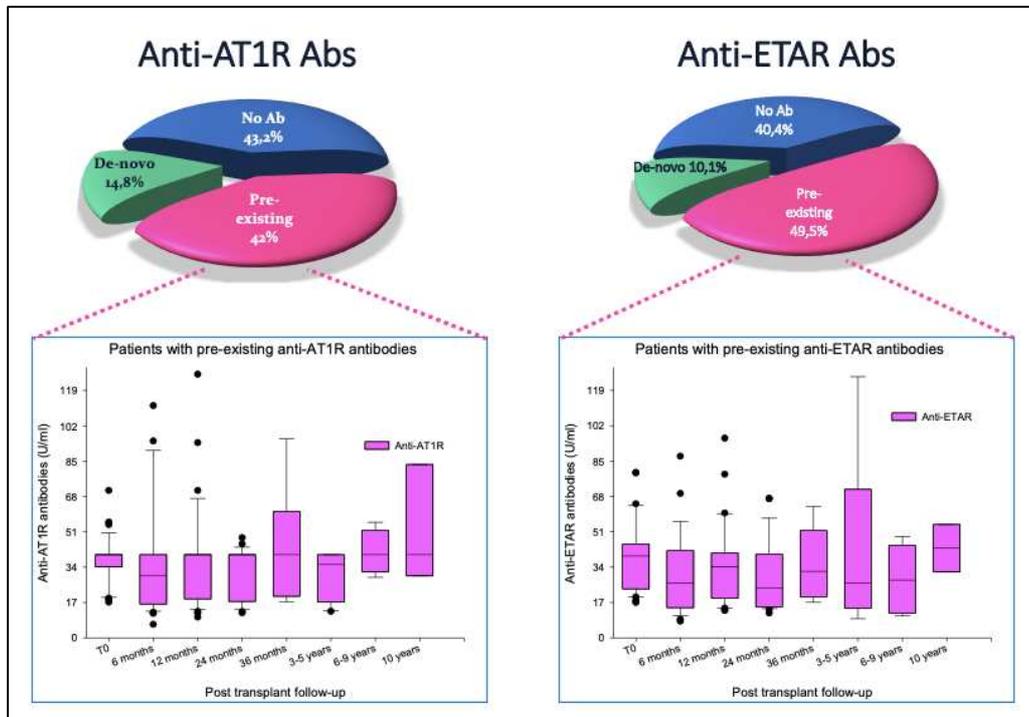


Figura 17: Grafico dosaggi anticorpi circolanti anti-AT1R e anti-ETAR nel tempo.

Per questa tesi sono stati selezionati 6 pazienti con doppia positività e valori anticorpali anti-AT1R e anti-ETAR elevati (>40 U/ml) a partire dal T0 e durante tutto il periodo di follow up e 6 pazienti negativi (<17 U/ml) per entrambi gli anticorpi a partire dal T0 e durante tutto il periodo di follow up (Tabella 13).

ANTICORPI ANTI-AT1R POSITIVI (U/mL)			
PZ	T0	6m	24m
CA	>40	>40	>40
CF	>40	>40	>40
CPD	>40	>40	>40
MA	>40	>40	>40
AT	>40	>40	>40
GA	>40	>40	>40

ANTICORPI ANTI-AT1R NEGATIVI (U/mL)			
PZ	T0	6m	24m
DG	11,1	9,9	14
CG	9,7	8,2	9,2
EC	9,2	6,7	7,2
FA	11,7	11,2	9,4
LNE	10,5	9,3	8,2
LVP	9,7	9,6	10,2

ANTICORPI ANTI-ETAR POSITIVI (U/mL)			
PZ	T0	6m	24m
CA	>40	>40	>40
CF	>40	>40	>40
CPD	>40	>40	>40
MA	>40	>40	>40
AT	>40	>40	>40
GA	>40	>40	>40

ANTICORPI ANTI-ETAR NEGATIVI (U/mL)			
PZ	T0	6m	24m
DG	13,7	13,8	16,8
CG	12,2	9,1	10,5
EC	11,6	7,8	8,2
FA	9,2	11,1	8,9
LNE	10,8	10,2	10,4
LVP	10,8	10	12,4

Tabella 13: Dosaggi anticorpi circolanti anti-AT1R ed anti-ETAR dei 12 pazienti arruolati per lo studio

### 3.3 RIVALUTAZIONE CON CLASSIFICAZIONE BANFF 2018

Poiché i pazienti arruolati per lo studio pilota hanno ricevuto il trapianto renale tra il 2011 e il 2019, è stato necessario rivalutare istologicamente le biopsie utilizzando i criteri del Banff 2018 per permettere un confronto oggettivo tra tutte biopsie, indipendentemente dall'anno in cui sono state eseguite. Di seguito, la tabella riassuntiva con i valori che fanno riferimento alla classificazione di Banff 2018 per i pazienti positivi che presentano valori anticorpali anti-AT1R ed anti-ETAR maggiori di 40 U/mL e negativi che presentano valori anticorpali anti-AT1R ed anti-ETAR minori di 17 U/mL (Tabella 14).

POSITIVI			NEGATIVI		
BANFF			BANFF		
PZ	6M	24M	PZ	6M	24M
CA	4	3	DG	3	1
CF	1	1	CG	3	3
CPD	1	1	EC	1	1
MA	1	1	FA	3	3
AT	1	1	LNE	1	1
GA	1	1	LVP	1	1

Tabella 14: Categorie assegnate ai 12 pazienti secondo la Classificazione di Banff 2018.

Inoltre, sono state valutate e riportate anche le singole lesioni richieste dalla classificazione Banff 2018 per ogni biopsia con un valore da 0 a 3 (0: non presente, 1: lieve, 2: moderato, 3: severo) sulla base della percentuale di lesioni osservata nel tessuto.

Trattandosi di biopsie di follow up (quindi di pazienti con funzionalità renale conservata e stabile) nella maggior parte dei casi le lesioni non erano presenti avendo così un punteggio pari a zero.

Non è stata riscontrata alcuna correlazione statisticamente significativa tra le singole lesioni presenti nella classificazione Banff 2018 e i valori degli anticorpi circolanti dei 12 pazienti pediatrici presi in considerazione.

### 3.4 LOCALIZZAZIONE TISSUTALE E ANALISI SEMIQUANTITATIVA DELLE PROTEINE STUDIATE

Gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR agiscono legando in modo permanente i rispettivi recettori AT1R ed ETAR provocandone un'iperattivazione che sembra portare a conseguenze patologiche con conseguente infiammazione microvascolare e ipertensione. Per verificare se la presenza di elevate quantità di autoanticorpi porti ad una diversa espressione dei recettori, è stata eseguita l'immunoistochimica per AT1R ed ETAR. Con la visualizzazione dei vetrini ottenuti tramite l'uso di uno specifico software di immagine, si è potuto effettuare un'analisi semiquantitativa dei recettori nelle diverse strutture del rene. Inoltre, dato che la localizzazione cellulare renale dei recettori è tutt'ora dibattuta in letteratura, l'immunoistochimica ha permesso di poterne apprezzare la specifica localizzazione nel trapianto di rene pediatrico.

#### *3.4.1 Valutazione di possibili cross reazioni con il cromogeno DAB nel tessuto renale*

Per la corretta messa a punto della tecnica, sono stati allestiti alcuni vetrini per il controllo negativo. Questi ultimi permettono di evidenziare l'eventuale presenza di siti aspecifici in cui la DAB può colorare il tessuto interferendo con il risultato finale. I vetrini ottenuti evidenziano come non siano presenti siti aspecifici nel tessuto (Figura 18), pertanto, il segnale ottenuto nei saggi effettuati può essere considerato specifico.

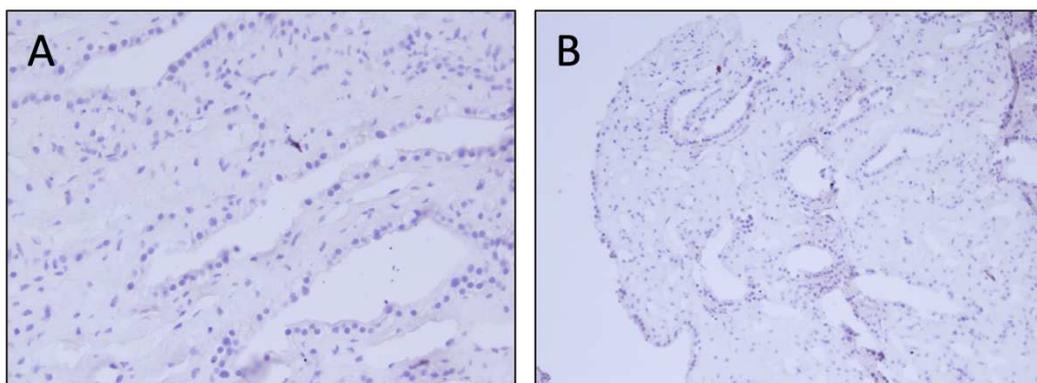


Figura 18: Immunoistochimica, controllo negativo. A: 20X ematossilina, B: 10X ematossilina

### 3.4.2 Localizzazione tissutale dei recettori AT1R ed ETAR

Per ogni biopsia di follow up di ciascun paziente è stata valutata nel dettaglio la presenza dei recettori AT1R ed ETAR in quattro diversi compartimenti: glomerulo, tubuli, vasi e interstizio. Di seguito vengono riportate a titolo esemplificativo le immagini rappresentanti la presenza dei recettori AT1R ed ETAR in ogni compartimento renale considerato (Figura 19, 20).

#### LOCALIZZAZIONE AT1R

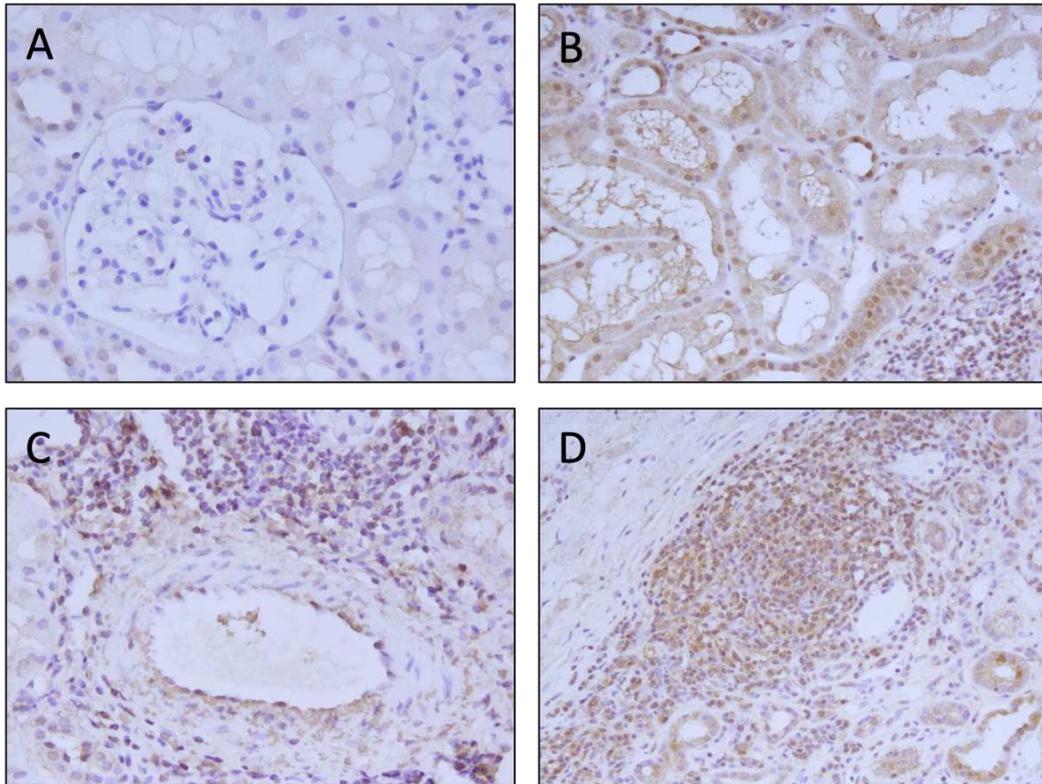


Figura 19: Immunoistochimica AT1R 1:200, ematossilina. A: glomerulo 40X B: tubuli 20X C: arteria 40X D: infiltrato 20X

### LOCALIZZAZIONE ETAR

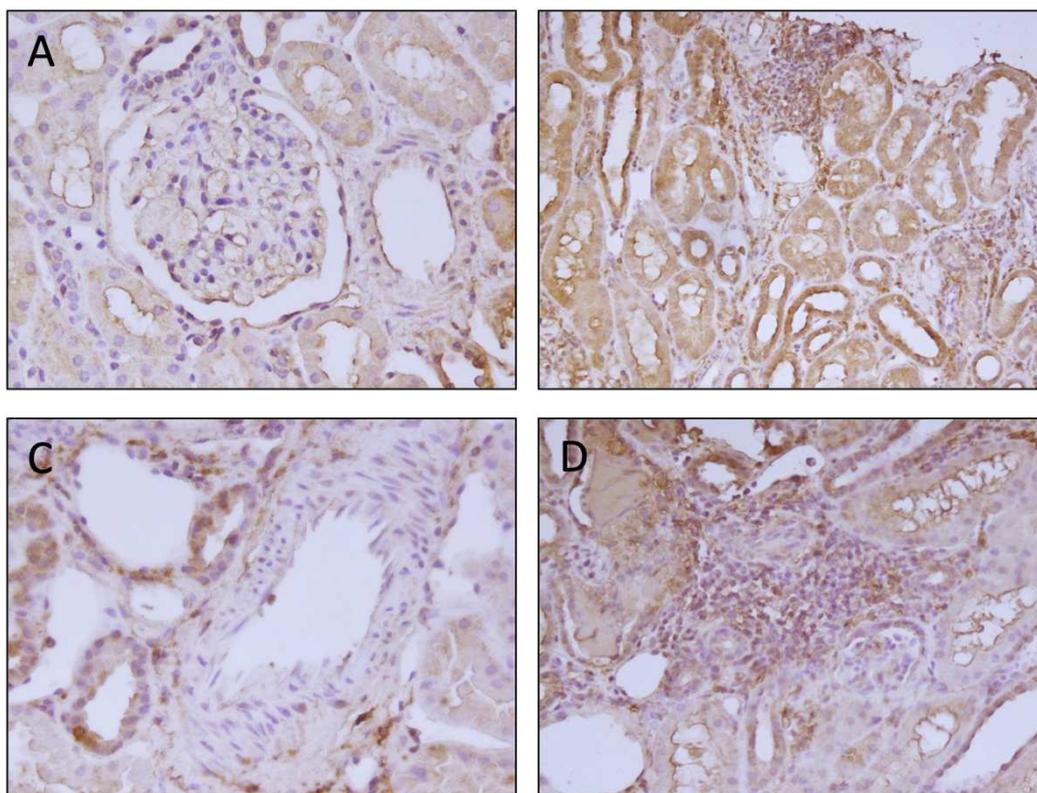


Figura 20: Immunoistochimica ETAR 1:200, ematossilina. A: glomerulo 40X B: tubuli 20X C: arteria 40X D: infiltrato 20X

Sono stati osservati nel dettaglio quattro compartimenti: glomerulo, tubuli, vasi e interstizio. Ad ogni compartimento è stato assegnato un punteggio da 0 a 3 sulla base dell'intensità del colore osservato ed è stata compilata una tabella (Tabella 11) per ogni biopsia di ogni singolo paziente. Sono stati riportati di seguito i valori puntuali di AT1R (Tabella 15) e di ETAR (Tabella 16) alla biopsia a 6 e 24 mesi post trapianto.

VALORI AT1R 6M PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	0,5	2	1,5	0,5	1,125
CF	0,5	2,5	0	1	1
CPD	1	2,5	0,5	1	1,25
MA	0,5	2	0	0,5	0,75
AT	0,5	2	0	1	0,875
GA	0,5	1,5	0,5	0	0,625

VALORI AT1R 6M PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	1	2	0,5	2	1,375
CG	0,5	2,5	0	0	0,75
EC	0,5	2,5	0	1	1
FA	0,5	2	1	2	1,375
LNE	2	3	1	2	2
LVP	1	2,5	0,5	1	1,25

VALORI AT1R 24M PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	1	3	3	2	2,25
CF	0,5	2,5	0,5	1	1,125
CPD	0,5	2,5	0,5	0	0,875
MA	0,5	1,5	0	1	0,75
AT	0	3	0	1	1
GA	0,5	1,5	0	0,5	0,625

VALORI AT1R 24M PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	0,5	2,5	0,5	1	1,125
CG	0,5	3	0,5	2	1,5
EC	0,5	2	0,5	1	1
FA	0,5	4,5	1	2	2
LNE	2,5	4	1,5	0	2
LVP	1	1,5	0,5	1	1

Tabella 15: Valori assegnati ai singoli compartimenti sull' immunoistochimica di AT1R

VALORI ETAR 6M PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	1,5	2	1,5	1	1,5
CF	0,5	2	1	1	1,125
CPD	1	2	0	1	1
MA	1	3	0,5	1	1,375
AT	2,5	4	1	2	2,375
GA	1	2	0	1	1

VALORI ETAR 6M PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	2,5	3	1	1	1,875
CG	1	2,5	1	2	1,625
EC	0,5	3	1	2	1,625
FA	1,5	2	1	2	1,625
LNE	1	2	0,5	1	1,125
LVP	3	3	0,5	1	1,875

VALORI ETAR 24M PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	1,5	3	1	1	1,625
CF	0,5	3	1	1	1,375
CPD	0,5	3	0,5	1	1,25
MA	1,5	1,5	0	1	1
AT	1	3	1	1	1,5
GA	0,5	2	0,5	1	1

VALORI ETAR 24M PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	1,5	3	1,5	0	1,5
CG	1,5	2	1	2	1,625
EC	0,5	2	0,5	1	1
FA	1,5	3	1	1	1,625
LNE	0,5	2	0,5	1	1
LVP	1	2	0	1	1

Tabella 16: Valori assegnati ai singoli compartimenti sull' immunoistochimica di ETAR

Dalle tabelle si evince che i recettori AT1R ed ETAR abbiano una localizzazione simile: risultano espressi soprattutto a livello tubulare, presenti in minor quantità nei glomeruli e nei vasi. Le cellule infiltrate, se presenti, esprimono entrambi i recettori sulla superficie delle loro cellule.

**PAZIENTE AT1R-AC/ ETAR-AC POSITIVO e NEGATIVO A CONFRONTO**

Per confrontare l'espressione tissutale dei recettori AT1R ed ETAR nei pazienti positivi e negativi per gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR, sono state messe a confronto le immagini rappresentanti il paziente che ha ottenuto il punteggio medio più basso e quello con il punteggio medio più alto (Figura 21).

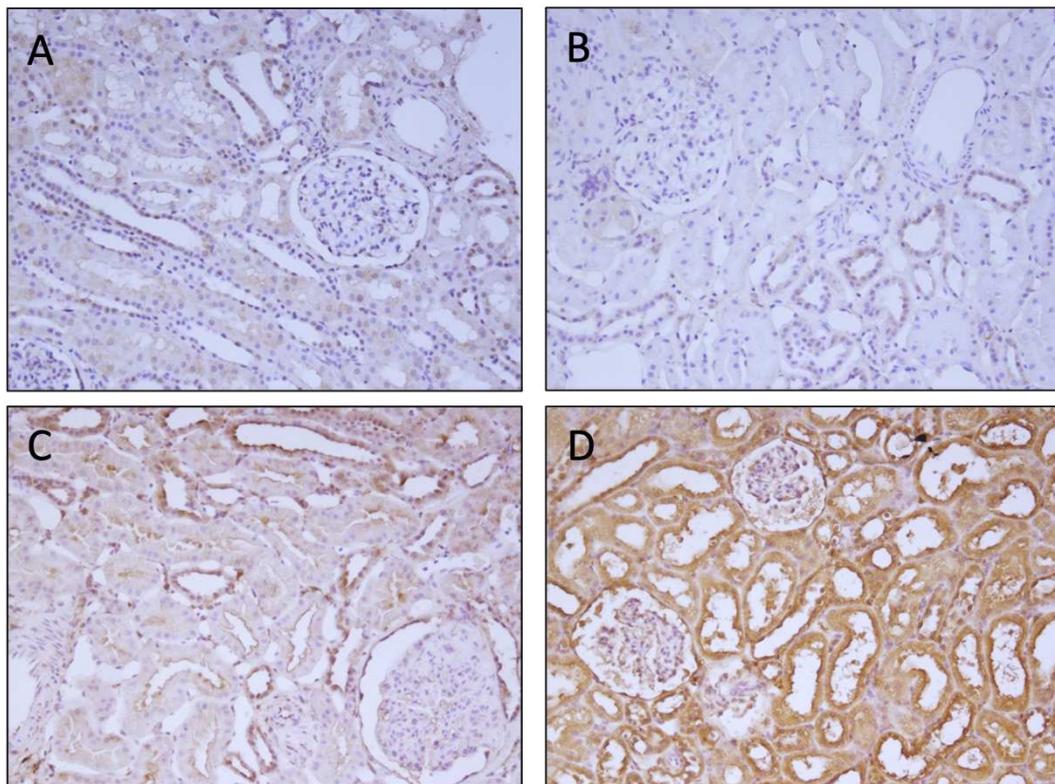


Figura 21: Immunoistochimica 20X, ematossilina. A: AT1R paziente AT1R-Ac e ETAR-Ac negativo B: AT1R paziente AT1R-Ac e ETAR-Ac positivo C: ETAR paziente AT1R-Ac e ETAR-Ac negativo D: ETAR paziente AT1R-Ac e ETAR-Ac positivo

In seguito, è stata calcolata per entrambi i recettori la media dei pazienti positivi e negativi per gli anticorpi anti-AT1R ed ETAR a 6 e 24 mesi post trapianto (Tabella 17).

AT1R (MEDIA)	6M	24M	ETAR (MEDIA)	6M	24M
POS	0,9375	1,1042	POS	1,3958	1,2917
NEG	1,2917	1,4375	NEG	1,625	1,2917

Tabella 17: Media valori ottenuti dall'analisi immunoistochimica dei recettori AT1R ed ETAR a 6 e 24 mesi post trapianto per pazienti positivi e negativi per gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR.

### 3.4.3 Analisi statistica dell'espressione tissutale dei recettori AT1R ed ETAR

È stato eseguito il test di Shapiro-Wilk con il software statistico GraphPad Prism per verificare la normalità dei dati da confrontare. Il test restituisce un output negativo per tutti i gruppi di dati da analizzare con un p-value non significativo. I dati non risultano distribuiti normalmente.

Per confrontare i valori ottenuti dall'analisi dell'immunoistochimica di AT1R ed ETAR, si procede eseguendo il test non parametrico di Mann-Whitney U a due code per dati non appaiati. Questo test permette di valutare l'eventuale differenza significativa tra la media dei valori ottenuti dai pazienti positivi e negativi agli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR.

L'espressione dei recettori AT1R ed ETAR tra i pazienti positivi e negativi per gli autoanticorpi non risulta statisticamente significativa a 6 e 24 mesi post trapianto.

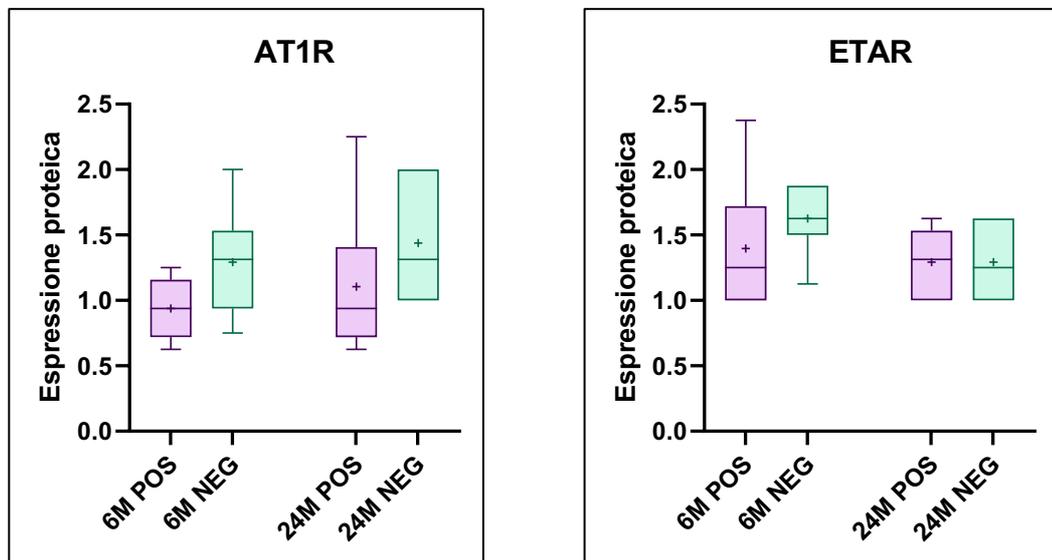


Figura 22: Boxplot rappresentante il confronto dell'espressione proteica AT1R e ETAR a 6 e 24 mesi post trapianto tra i pazienti positivi e negativi per gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR.

#### *3.4.4 Localizzazione tissutale delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1*

L'elevata concentrazione di anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR fa sì che questi agiscano in modo permanente legando i rispettivi recettori AT1R ed ETAR provocandone un'iperattivazione che sembra provocare un'importante infiammazione microvascolare. Inoltre, il legame degli anticorpi con i recettori AT1R ed ETAR sembra portare all'espressione di alcuni fattori di trascrizione responsabili dell'aumento dell'espressione genica di fattori pro-infiammatori come MCP o RANTES che sono coinvolti nella formazione di citochine pro-infiammatorie tra cui IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , che partecipano alla formazione dell'infiammazione.

Le molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 legano le integrine e il loro legame è fondamentale per la migrazione transendoteliale delle cellule del sistema immunitario e la loro attivazione. La loro presenza è positivamente regolata dalle citochine pro-infiammatorie. Per verificare se la presenza di elevate quantità di auto anticorpi porti ad una diversa espressione delle molecole di adesione, è stata eseguita l'immunoistochimica per ICAM-1 ed VCAM-1. La visualizzazione dei vetrini ottenuti con questa tecnica tramite uno specifico software di immagine permette di effettuare un'analisi semiquantitativa sulla presenza delle molecole di adesione nelle diverse strutture del rene e la visualizzazione della loro localizzazione.

Per ogni biopsia di follow up di ogni paziente è stata valutata nel dettaglio la presenza delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 in quattro diversi compartimenti: glomerulo, tubuli, vasi e interstizio. Di seguito vengono riportate a titolo esemplificativo le immagini rappresentanti la presenza delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 in ogni compartimento (Figura 23, 24).

LOCALIZZAZIONE ICAM-1

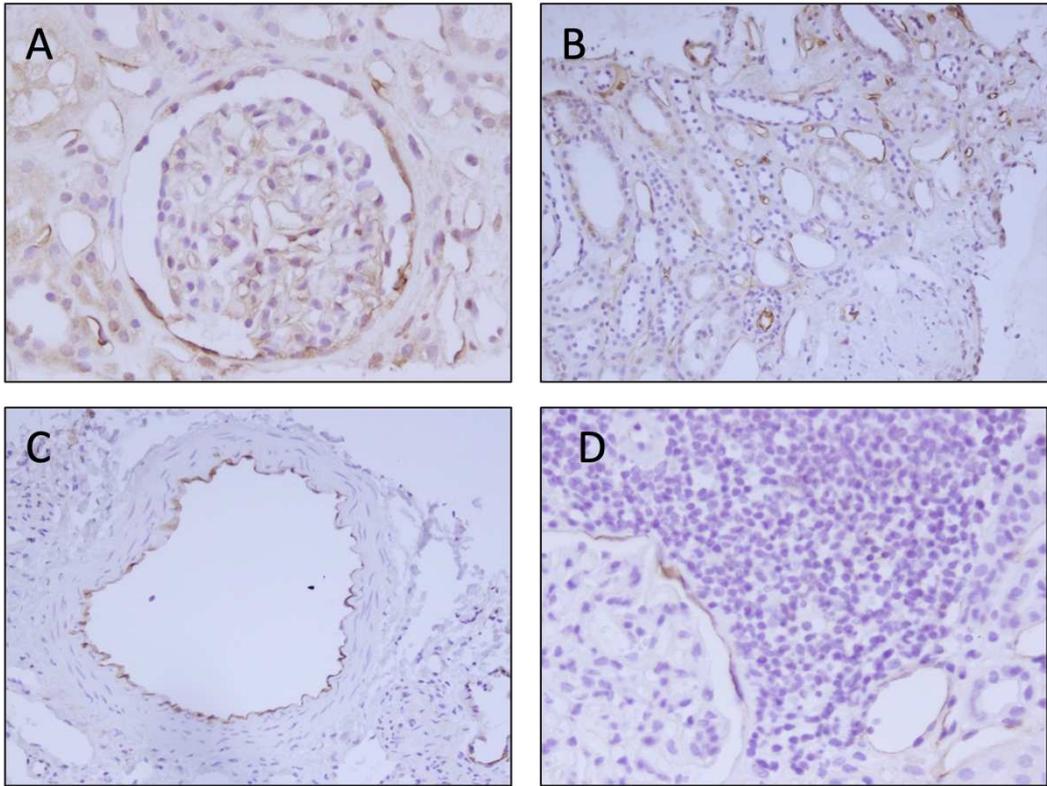


Figura 23: Immunohistochimica ICAM-1 1:200, ematossilina. A: glomerulo 40X B: tubuli 20X C: arteria 40X D: infiltrato 20X

LOCALIZZAZIONE VCAM-1

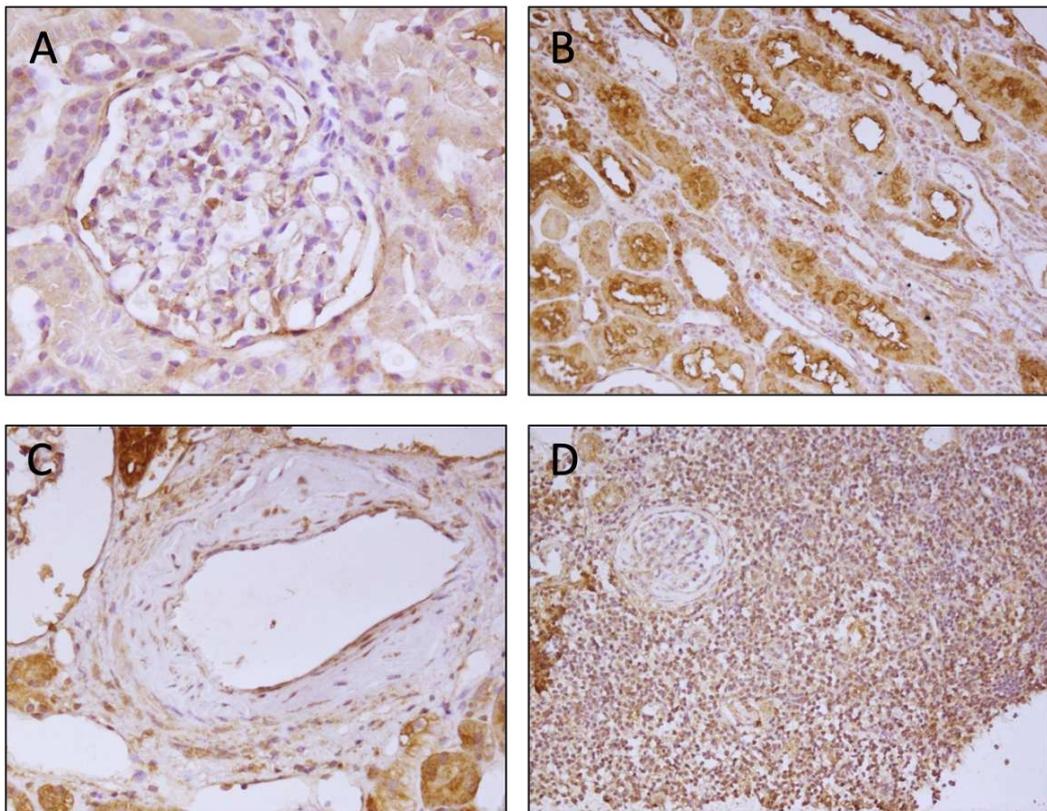


Figura 24: Immunoistochimica VCAM 1:200, ematossilina. A: glomerulo 40X B: tubuli 20X C: arteria 40X D: infiltrato 20X.

La visualizzazione dei vetrini al microscopio ottico e la successiva analisi sono state possibili grazie all'utilizzo di un software di analisi di immagine che permette di impostare gli stessi parametri per la visualizzazione di ogni vetrino. Sono stati osservati nel dettaglio quattro compartimenti: glomerulo, tubuli, vasi e interstizio. Ad ogni compartimento è stato assegnato un punteggio da 0 a 3 sulla base dell'intensità del colore osservato ed è stata compilata una tabella (Tabella 11) per ogni biopsia di ogni singolo paziente. Sono stati riportati di seguito i valori puntuali di ICAM-1 (Tabella 18) e di VCAM-1 (Tabella 19) alla biopsia a 6 e 24 mesi post trapianto.

VALORI ICAM 6M PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	1,5	0	5	0	1,625
CF	1	0	5	0	1,5
CPD	1	0	5	0	1,5
MA	2,5	0	4	0,5	1,75
AT	0,5	0	4,5	1	1,5
GA	1	0,5	4	0,5	1,5

VALORI ICAM 6M PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	1	0,5	2	0	0,875
CG	0,5	1	4	0	1,375
EC	0,5	0	0,5	0	0,25
FA	0	0	3,5	0	0,875
LNE	0	0	1,5	0	0,375
LVP	0,5	1	1,5	0,5	0,875

VALORI ICAM 24M PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	1	0	3	0	1
CF	0	0	4	0	1
CPD	0	1	2,5	0	0,875
MA	1	0	3	0	1
AT	1,5	0	4,5	0,5	1,625
GA	2	1	5	0,5	2,125

VALORI ICAM 24M PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	0	0	2,5	0	0,625
CG	0,5	0	2,5	0	0,75
EC	0	0	1	0	0,25
FA	1	0	4,5	0	1,375
LNE	0	0	0,5	0	0,125
LVP	0,5	0	4	0	1,125

Tabella 18: Valori assegnati ai singoli compartimenti sull'immunoistochimica di ICAM-1

VALORI VCAM 6M PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	1	2,5	0,5	2	1,5
CF	0	3	0,5	1	1,125
CPD	0,5	1,5	1	0	0,75
MA	1	3	1	1,5	1,625
AT	0	3	1	0,5	1,125
GA	0,5	5	2	1	2,125

VALORI VCAM 6M PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	0,5	3	1	1	1,375
CG	1	3	0	1	1,25
EC	0,5	2	0,5	0	0,75
FA	0,5	1,5	0,5	1	0,875
LNE	0	2,5	0	1	0,875
LVP	0	3	1	0,5	1,125

VALORI VCAM 24M PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	0,5	3	1	2	1,625
CF	0,5	3	1	1	1,375
CPD	1	3,5	1	1	1,625
MA	0,5	3	0,5	0,5	1,125
AT	0,5	3	0,5	2	1,5
GA	1,5	2	0,5	1	1,25

VALORI VCAM 24M PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	0,5	2	0,5	1	1
CG	0,5	2	1	1	1,125
EC	0,5	1,5	0,5	0,5	0,75
FA	0,5	2	0,5	1	1
LNE	0	1	0,5	1	0,625
LVP	0,5	1,5	0,5	1	0,875

Tabella 19: Valori assegnati ai singoli compartimenti sull' immunistochemica di VCAM-1

Dalle tabelle si evince che ICAM-1 nei nostri campioni risulta essere localizzato ed espresso quasi esclusivamente a livello vascolare. VCAM-1, oltre ad essere espresso a livello vascolare, è presente a livello tubulare e in minor quantità nei glomeruli. Le cellule infiltrate, se presenti, esprimono entrambe le molecole di adesione sulla superficie delle loro cellule.

#### PAZIENTE AT1R-AC/ ETAR-AC POSITIVO e NEGATIVO A CONFRONTO

Per confrontare l'espressione tissutale delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 nei pazienti positivi e negativi per gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR, sono state messe a confronto le immagini rappresentanti il paziente che ha ottenuto il punteggio medio più basso e quello con il punteggio medio più alto (Figura 25).

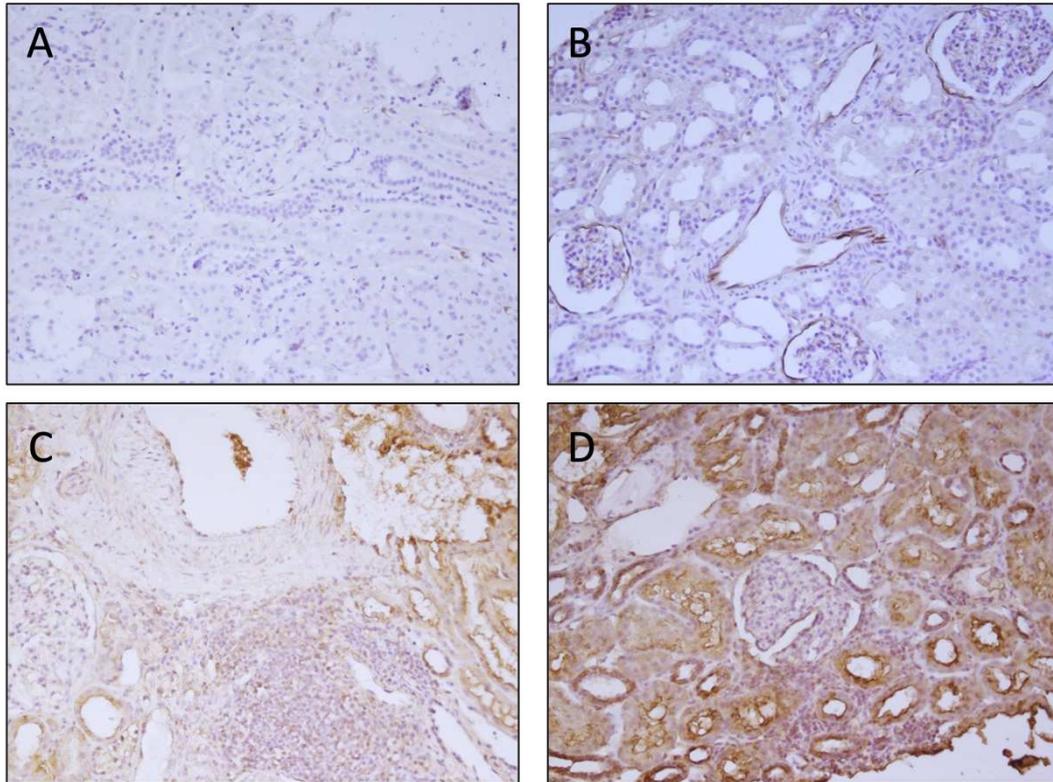


Figura 25: A: ICAM-1 paziente AT1R-Ac e ETAR-Ac negativo B: ICAM-1 paziente AT1R-Ac e ETAR-Ac positivo C: VCAM-1 paziente AT1R-Ac e ETAR-Ac negativo D: VCAM-1 paziente AT1R-Ac e ETAR-Ac positivo

In seguito, è stata calcolata per entrambe le molecole di adesione la media dei valori di espressione nei pazienti positivi e negativi per gli anticorpi anti-AT1R ed ETAR a 6 e 24 mesi post trapianto (Tabella 20).

ICAM1 (MEDIA)	6M	24M	VCAM1 (MEDIA)	6M	24M
POS	1,5625	1,2708	POS	1,375	1,4167
NEG	0,7708	0,7083	NEG	1,0417	0,8958

Tabella 20: Media valori ottenuti dall'analisi immunohistochemica delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 a 6 e 24 mesi post trapianto per pazienti positivi e negativi per gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR.

### 3.4.5 Analisi statistica dell'espressione tissutale delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1

È stato eseguito il test di Shapiro-Wilk con il software statistico GraphPad Prism per verificare la normalità dei dati da confrontare. Il test restituisce un output negativo per tutti i gruppi di dati da analizzare con un p-value non significativo. I dati non risultano distribuiti normalmente.

Per confrontare i valori ottenuti dall'analisi dell'immunohistochemica di ICAM-1 e VCAM-1, si procede eseguendo il test non parametrico di Mann-Whitney U a due code per dati non appaiati. Questo test permette di valutare l'eventuale differenza

significativa tra la media dei valori ottenuti dai pazienti positivi e negativi agli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR.

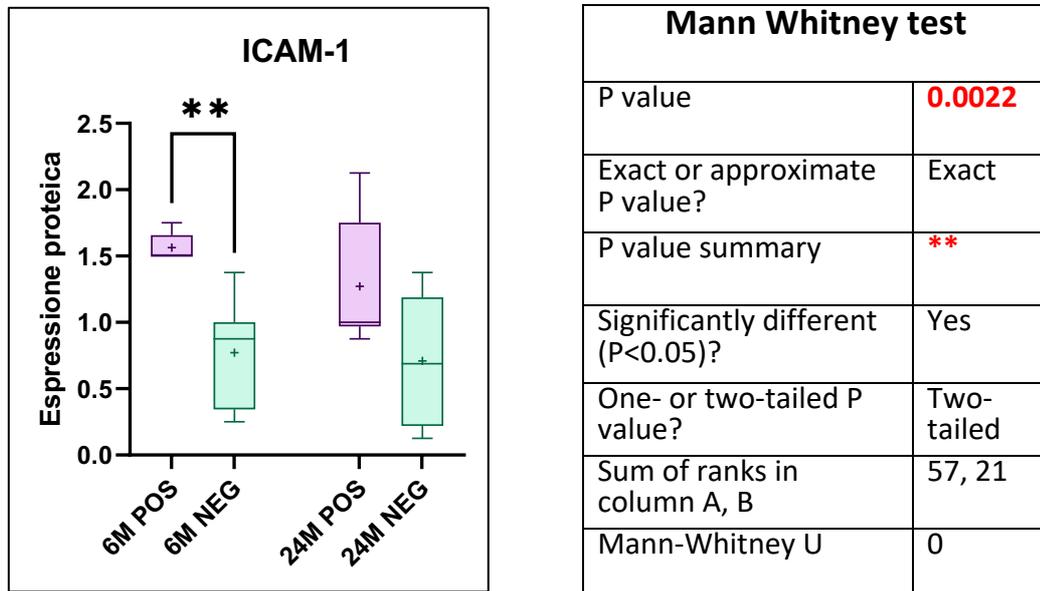


Figura 26: A sinistra il boxplot rappresentante il confronto dell'espressione proteica di ICAM-1 a 6 e 24 mesi post trapianto tra i pazienti positivi e negativi per gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR. A destra l'output restituito dal software statistico GraphPad Prism sul test di Mann Whitney.

La diversa espressione di ICAM-1 tra i pazienti positivi e negativi risulta statisticamente significativa a 6 mesi post trapianto, non statisticamente significativa a 24 mesi post trapianto.

Per cercare di comprendere la mancata differenza nei due gruppi a 24 mesi post trapianto, sono stati analizzati i punteggi dei singoli pazienti (Figura 27). In particolare, il paziente FA, presenta elevati livelli di ICAM-1 a 24 mesi post trapianto. FA, appartenente al gruppo dei pazienti negativi per gli anticorpi anti-AT1R ed ETAR, risulta positivo per gli anticorpi anti-HLA donatore specifico.

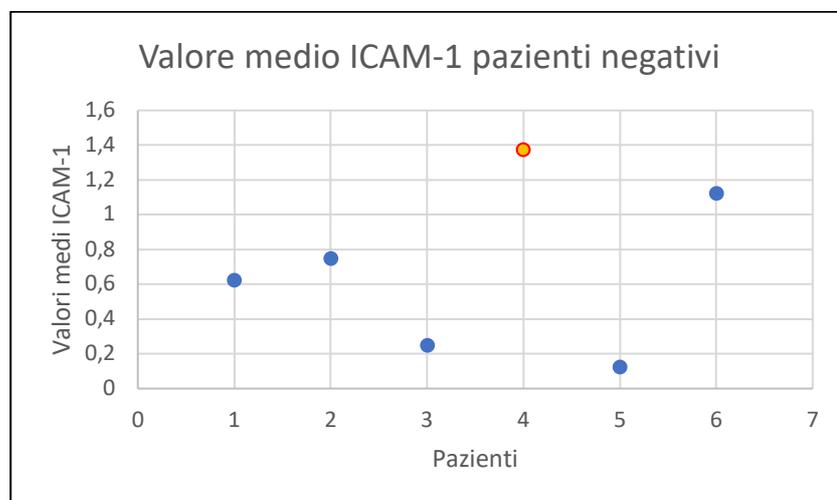
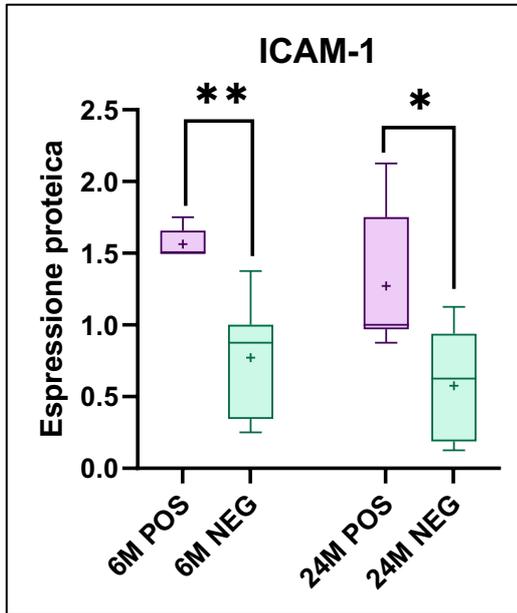


Figura 27: Valore medio ICAM-1 per ciascun paziente negativo agli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR

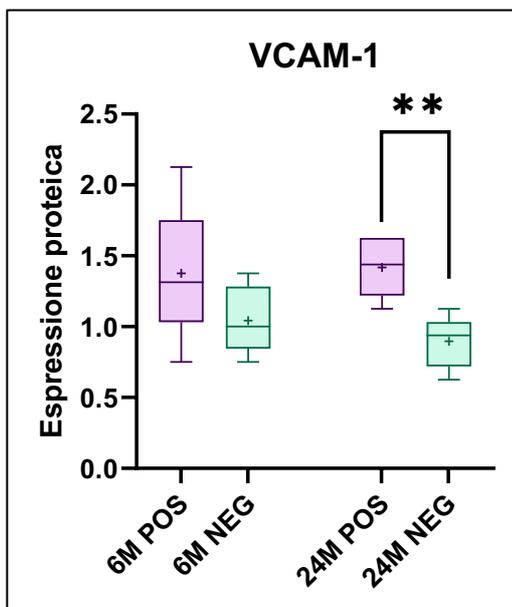
Una volta tolto dall'analisi statistica il paziente "FA", la differenza tra i due gruppi risulta statisticamente significativa anche a 24 mesi post trapianto (Figura 28).



Mann Whitney test	
P value	0.0476
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different (P<0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A, B	47, 19
Mann-Whitney U	4

Figura 28: A sinistra il boxplot rappresentante il confronto dell'espressione proteica di ICAM-1 senza FA a 24 mesi post trapianto tra i pazienti positivi e negativi per gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR. A destra l'output restituito dal software statistico GraphPad Prism sul test di Mann Whitney.

Analisi statistica di VCAM-1: L'espressione di VCAM-1 tra i pazienti positivi e negativi non risulta statisticamente significativa a 6 mesi post trapianto, ma risulta significativa a 24 mesi post trapianto (Figura 29).



Mann Whitney test	
P value	<b>0.0043</b>
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	<b>**</b>
Significantly different (P<0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A, B	56.50, 21.50
Mann-Whitney U	0.5000

Figura 29: A sinistra il boxplot rappresentante il confronto dell'espressione proteica di VCAM-1 a 6 e 24 mesi post trapianto tra i pazienti positivi e negativi per gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR. A destra l'output restituito dal software statistico GraphPad Prism sul test di Mann Whitney.

### 3.4.6 Localizzazione tissutale dei recettori AT1R ed ETAR e delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 sulle biopsie al tempo zero

Avendo a disposizione le biopsie relative al momento zero, ovvero quelle che vengono eseguite poco prima dell'atto operatorio che vede l'inserimento del rene nel ricevente, è stato possibile verificare come si esprimessero i recettori AT1R ed ETAR del donatore e le molecole di adesione prima di essere esposte agli anticorpi circolanti anti-AT1R ed anti-ETAR del donatore.

Per ogni biopsia è stata valutata nel dettaglio la presenza dei recettori AT1R ed ETAR e di ICAM-1 e VCAM-1 nel glomerulo, tubuli, vasi e interstizio. Di seguito vengono riportate a titolo esemplificativo alcune immagini relative all'espressione di AT1R, ETAR, ICAM-1 e VCAM-1 (Figura 30).

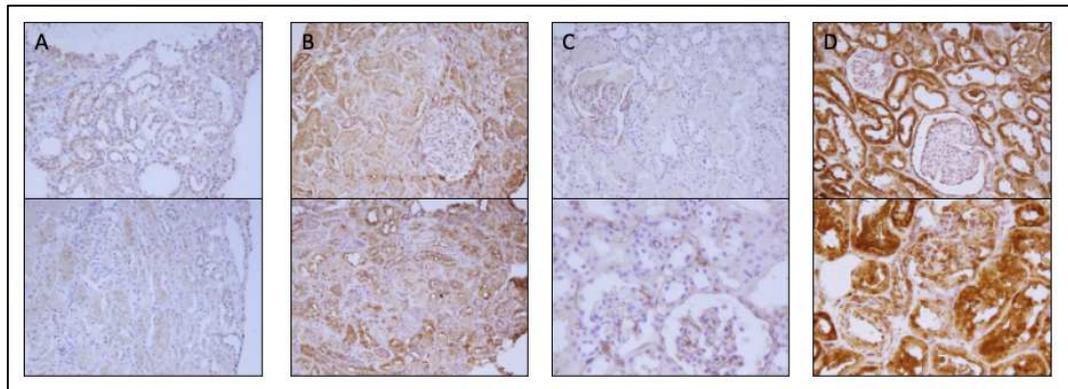


Figura 30: Immunoistochimica T0 ematossilina 20X. A: AT1R, B: ETAR, C: ICAM-1, D: VCAM-1.

Per quanto riguarda la valutazione dell'espressione semiquantitativa è stato assegnato un punteggio da 0 a 3 sulla base dell'intensità del colore osservato ed è stata compilata una tabella (Tabella 11) per ogni biopsia relativa al T0 di ogni singolo paziente (Tabella 21).

VALORI AT1R T0 PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	0,5	1	0	0	0,375
CF	0,5	3	0,5	0	1
CPD	1	1,5	0,5	0	0,75
MA	0,5	2	0,5	0	0,75
AT	0	1,5	0	0	0,375
GA	0,5	2	0	0	0,625

VALORI AT1R T0 PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	0,5	1	0	0	0,375
CG	0,5	2	0,5	0	0,75
EC	0,5	2	0,5	0	0,75
FA	0,5	2	0,5	0	0,75
LNE	0,5	1	0,5	0	0,5
LVP	0,5	2,5	0,5	0	1

VALORI ETAR T0 PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	3	4	0	0	1,75
CF	1,5	2	0	0	0,875
CPD	1,5	3,5	1	0	1,75
MA	1	1,5	1	0	0,875
AT	1,5	4	1	0	1,625
GA	0,5	1,5	0	0	0,5

VALORI ETAR T0 PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	0,5	1	0	0	0,375
CG	1	3	0,5	0	1,125
EC	1	3	0,5	0	1,125
FA	1	4	0	0	1,25
LNE	0,5	1,5	0	0	0,5
LVP	1	4	0,5	0	1,375

VALORI ICAM T0 PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	2	0	3,5	0	1,375
CF	1	0	3	0	1
CPD	2,5	1	4,5	0	2
MA	1	0	2	0	0,75
AT	2	1	4	0	1,75
GA	1,5	0,5	4	0	1,5

VALORI ICAM T0 PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	2	0	3	0	1,25
CG	2	0	3,5	0	1,375
EC	1	1	2	0	1
FA	2	0	2	0	1
LNE	2	0	1,5	0	0,875
LVP	1	2	4	0	1,75

VALORI VCAM T0 PAZIENTI POSITIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
CA	1,5	5	0	0	1,875
CF	0,5	3	0	0	1,125
CPD	0,5	2,5	1	0	1,25
MA	1	3	0,5	0	1,125
AT	2	3	0	0	1,5
GA	0	3	1	0	1,125

VALORI VCAM T0 PAZIENTI NEGATIVI					
PZ	GLO	TUB	VASI	INF	TOT/4
DG	0,5	2	0	0	0,75
CG	1	5	0,5	0	1,875
EC	0,5	5	1	0	1,75
FA	0,5	2,5	0	0	0,75
LNE	1	3	0,5	0	1,25
LVP	1,5	6	1,5	0	2,5

Tabella 21: Valori assegnati ai singoli compartimenti sull' immunostochimica eseguita sulle biopsie al T0 di AT1R, ETAR, ICAM-1 e VCAM-1.

Dall'analisi delle tabelle si evince come il compartimento "interstizio" risulti sempre pari a zero per mancanza di cellule infiltranti nelle biopsie del donatore. Per questo motivo, è stata ricalcolata la media dei punteggi senza considerare la presenza del compartimento riferito alle cellule infiltranti (Tabella 21) ed è stata confrontata con i punteggi medi ottenuti dall'analisi delle biopsie a 6 e 24 mesi post trapianto. Il segnale di fondo in queste biopsie era mediamente più alto.

PZ	MEDIA AT1R	MEDIA ETAR	MEDIA ICAM1	MEDIA VCAM1
CA	0,5	0,5	0,33	0,44
CF	1,33	1,61	1,15	1,36
CPD	1	1	0,83	0,94
MA	1	1,17	0,89	1,02
AT	0,5	0,67	0,39	0,52
GA	0,83	0,94	0,59	0,79
DG	0,5	0,5	0,33	0,44
CG	1	1,17	0,89	1,02
EC	1	1,17	0,89	1,02
FA	1	1,17	0,89	1,02
LNE	0,67	0,72	0,63	0,67
LVP	1,17	1,39	1,02	1,19

Tabella 22: Valori medi ottenuti dall'analisi semiquantitativa dell'immunoistochimica eseguita sulle biopsie al T0 di AT1R, ETAR, ICAM-1 e VCAM-1 non considerando il compartimento "interstizio".

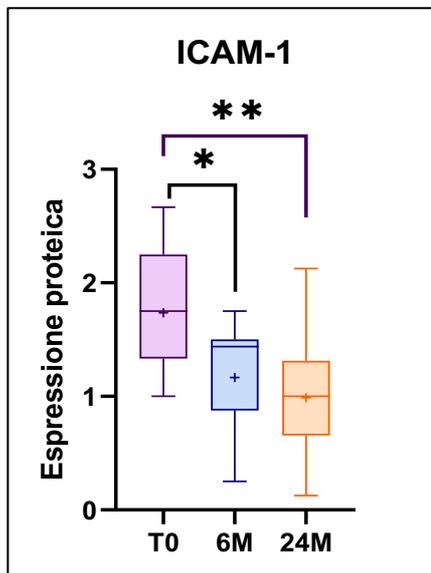
#### 3.4.7 Analisi statistica dell'espressione tissutale dei recettori AT1R ed ETAR e delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 al tempo

È stato eseguito il test di Shapiro-Wilk con il software statistico GraphPad Prism per verificare la normalità dei dati da confrontare. Il test restituisce un output negativo per tutti i gruppi di dati da analizzare con un p-value non significativo. I dati non risultano distribuiti normalmente.

Per confrontare i valori ottenuti dall'analisi dell'immunoistochimica delle biopsie eseguite al T0, si procede eseguendo il test non parametrico di Mann-Whitney U a due code per dati non appaiati. Questo test permette di valutare l'eventuale differenza significativa tra la media dei valori ottenuti dalle biopsie al T0 e le medie dei valori delle biopsie a 6 e 24 mesi post trapianto.

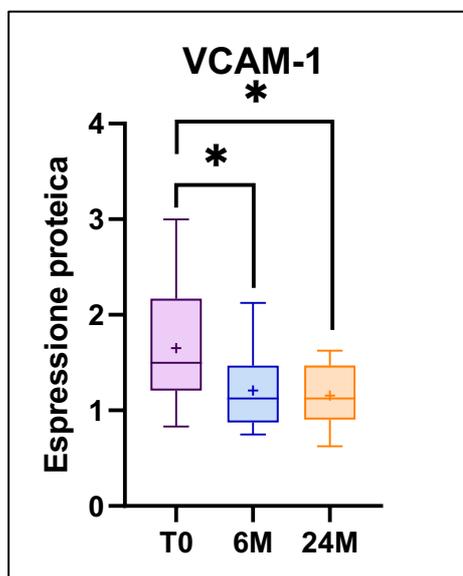
La diversa espressione dei recettori AT1R ed ETAR non risulta statisticamente significativa tra i due gruppi presi in considerazione.

L'espressione media delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 al T0 risulta statisticamente diversa dall'espressione delle stesse molecole a 6 e 24 mesi post trapianto (Figura 31,32).



Mann Whitney test	T0-6M	T0-24M
P value	<b>0.0364</b>	<b>0.0024</b>
Exact or approximate P value?	Exact	Exact
P value summary	*	**
Significantly different (P<0.05)?	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A, B	186, 114	200.5, 99.50
Mann-Whitney U	36	21,50

Figura 31: A sinistra il boxplot rappresentante il confronto dell'espressione proteica di ICAM-1 al T0, 6 e 24 mesi post trapianto. A destra l'output restituito dal software statistico GraphPad Prism sul test di Mann Whitney.



Mann Whitney test	T0-6M	T0-24M
P value	<b>0.0427</b>	<b>0.0368</b>
Exact or approximate P value?	Exact	Exact
P value summary	*	*
Significantly different (P<0.05)?	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A, B	185, 115	186, 114
Mann-Whitney U	37	36

Figura 32: A sinistra il boxplot rappresentante il confronto dell'espressione proteica di VCAM-1 al T0, 6 e 24 mesi post trapianto. A destra l'output restituito dal software statistico GraphPad Prism sul test di Mann Whitney.

### 3.5 MESSA A PUNTO IBRIDAZIONE IN SITU A FLUORESCENZA

Gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR agiscono legando in modo permanente i rispettivi recettori AT1R ed ETAR provocandone un'iperattivazione che sembra portare a conseguenze patologiche con conseguente infiammazione microvascolare e ipertensione. I risultati dell'analisi immunistochemica evidenziano una localizzazione renale diffusa dei recettori AT1R ed ETAR. Pertanto, è stata valutata la localizzazione degli mRNA dei recettori tramite tecnica di ibridazione in situ a fluorescenza. Nella stessa sezione di tessuto è stato possibile co-ibridare due sonde diverse che permettono la visualizzazione della localizzazione degli mRNA di entrambi i recettori contemporaneamente. Le sonde per l'mRNA del recettore AT1R sono legate al fluoroforo Quasar 670 ed emettono nel rosso. Le sonde per l'mRNA del recettore ETAR sono legate al fluoroforo TAMRA-C9 ed emettono nel giallo. Per facilitare l'analisi visiva, la fluorescenza gialla è stata colorata di verde.

I vetrini ottenuti sono stati visualizzati al microscopio a fluorescenza Zeiss (Figura 33,34).

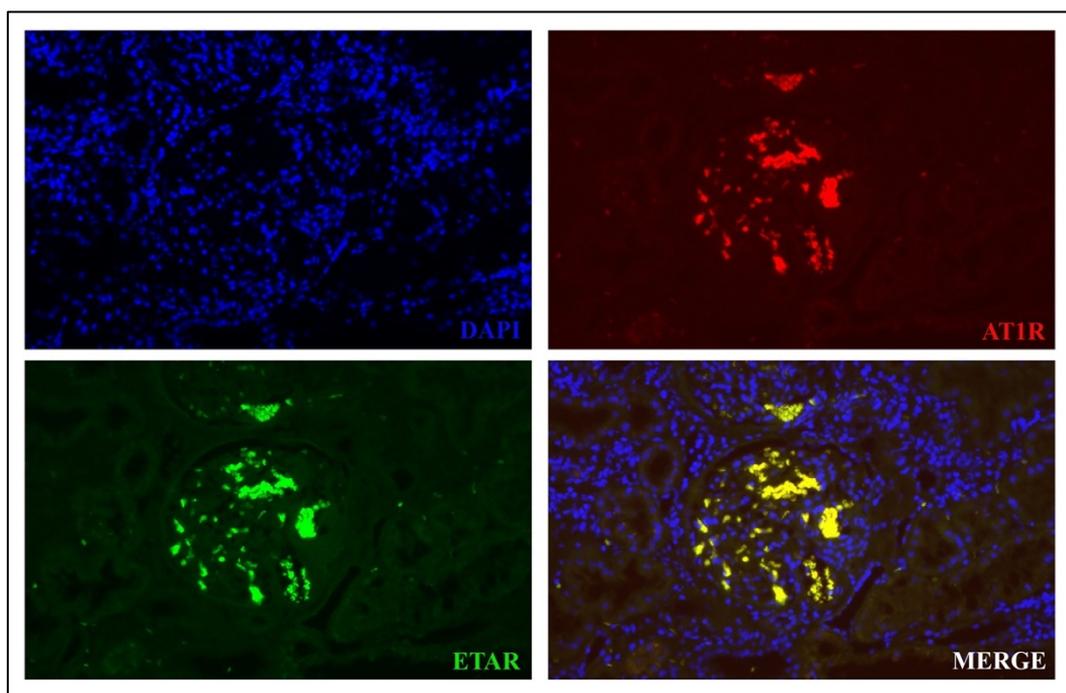


Figura 33: Distribuzione di AT1R ed ETAR nel glomerulo. Visualizzazione con microscopio a fluorescenza, ingrandimento 40X.

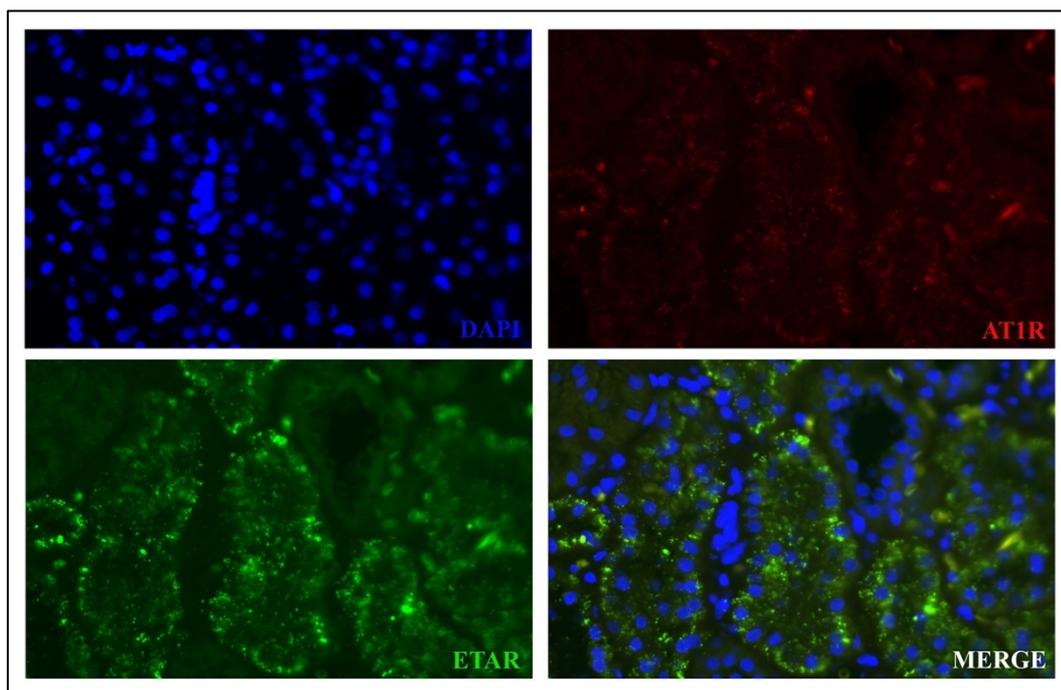


Figura 34: Distribuzione di AT1R ed ETAR nei tubuli. Visualizzazione con microscopio a fluorescenza, ingrandimento 40X.

Le prime immagini ottenute al microscopio a fluorescenza hanno restituito un segnale intenso e compatto ed in alcuni casi molto diffuso. Ingrandendo ulteriormente le immagini è stato possibile notare che si trattasse di segnali aspecifici, di auto-fluorescenza dei globuli rossi (Figura 33) e del comparto tubulare, quel che in istologia viene chiamato droplet proteico intratubulare (Figura 34). Inoltre, la perfetta sovrapposizione delle due sonde ha fatto pensare ad un artificio del segnale.

Nonostante, secondo il produttore delle sonde, i due fluorofori utilizzati emettessero a lunghezze d'onda sufficientemente distanti da poterli co-ibridare in un unico vetrino, dall'analisi dei loro spettri di emissione si evidenzia una piccola regione di sovrapposizione tra i due fluorofori (Figura 35).

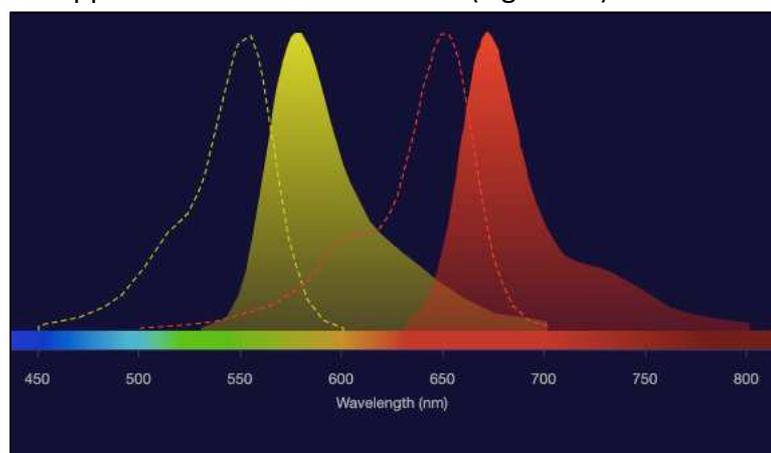
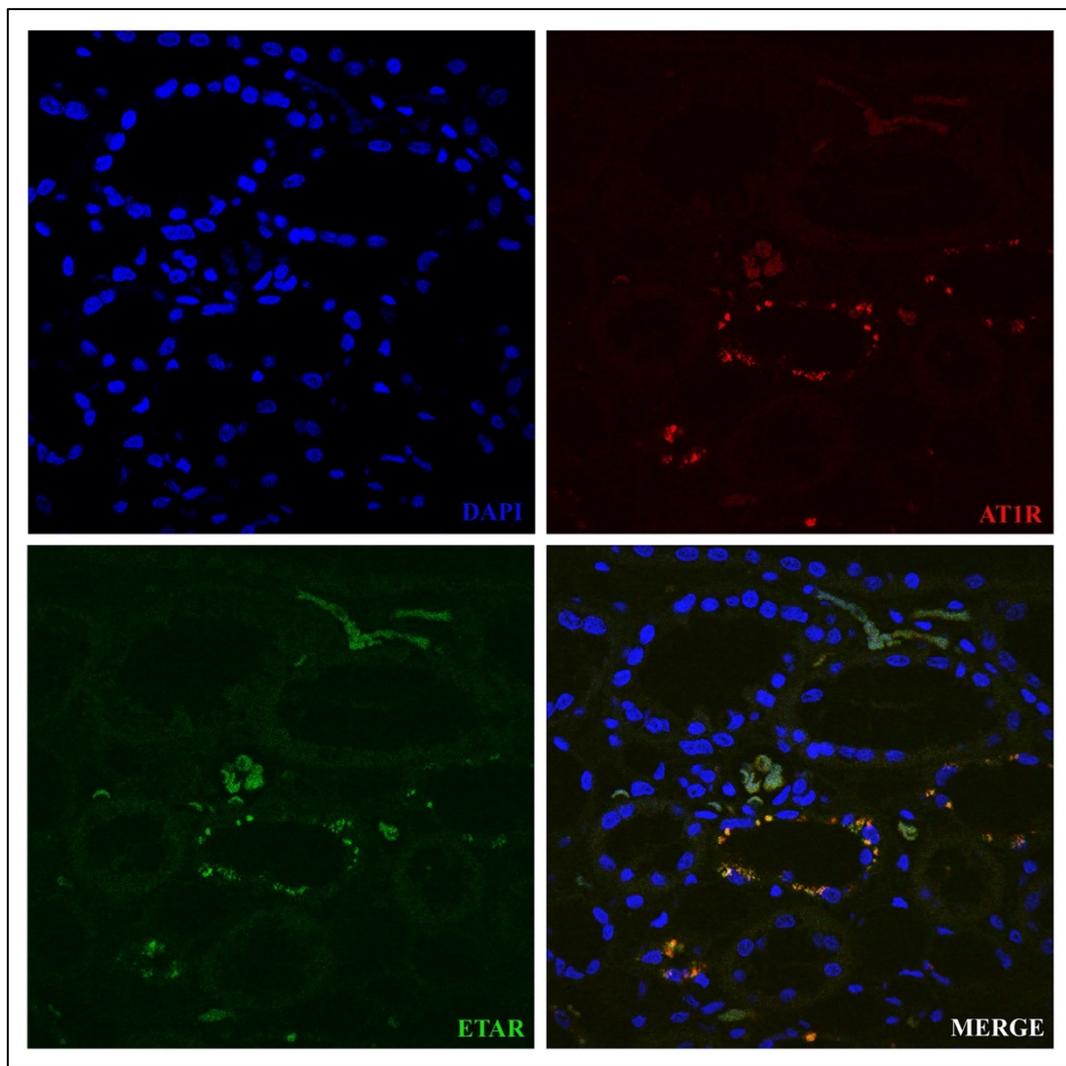


Figura 35: Spettro di eccitazione e di emissione dei fluorofori TAMRA-C9 (giallo) e Quasar 670 (rosso).

Poiché il microscopio a fluorescenza non aveva lampade LED che potessero selezionare specifiche lunghezze d'onda per i due fluorofori, le analisi successive sono state eseguite al microscopio confocale Zeiss LMS 800. Il microscopio confocale, che utilizza i laser e che permette di impostare per ciascun fluoroforo il range di eccitazione e di emissione evitando la zona di sovrapposizione di segnale, ha risolto il problema.

È stato possibile separare sia in eccitazione che in emissione i due fluorofori e ottenere un'analisi più specifica del segnale, eliminando il rumore di fondo generato dall'auto-fluorescenza del tessuto (Figura 36).



*Figura 36: Distribuzione di AT1R ed ETAR nei tubuli. Visualizzazione con microscopio confocale, ingrandimento 63X olio.*

Dalla visualizzazione dei primi vetrini gli mRNA dei recettori AT1R ed ETAR nei nostri pazienti trapiantati, sembrano essere espressi solamente a livello tubulare e non glomerulare. Inoltre, i due mRNA sembrano co-localizzati nel tubulo, ad eccezione di alcuni punti in cui il segnale è specifico per un solo recettore. Ulteriori analisi sono richieste perché il segnale rimane basso rispetto alla presenza dei recettori evidenziata in IHC.



## 4. DISCUSSIONE

Il trapianto renale rappresenta ad oggi il trattamento d'elezione per la cura dell'insufficienza renale terminale pediatrica. Tuttavia, l'emivita stimata per un organo trapiantato in età pediatrica è di 15-20 anni. Per questo motivo la maggior parte dei pazienti andrà incontro ad un secondo trapianto lungo il corso della vita. Poiché i pazienti in età pediatrica hanno una lunga aspettativa di vita, è necessario estendere il più possibile la vita dell'organo trapiantato e ritardare la sua perdita. Una delle principali cause di perdita prematura dell'organo è il rigetto anticorpo-mediato. Un ruolo primario nel rigetto lo rivestono gli anticorpi specifici contro l'antigene leucocitario umano (HLA-DSA), considerato il più importante alloantigene nel trapianto.<sup>19</sup>

Tuttavia, negli ultimi anni è aumentata l'attenzione per la rilevazione e la comprensione del significato clinico degli anticorpi non-HLA nel trapianto di rene. Gli anticorpi non-HLA, ovvero anticorpi diretti contro proteine endoteliali, epiteliali, possono associarsi ad un peggior andamento del trapianto di rene: tra questi gli anticorpi anti-recettore 1 dell'angiotensina II (AT1R) e anti-recettore A dell'endotelina-1 (ETAR). Questi recettori sono ampiamente espressi sulla superficie di cellule, tessuti e organi in tutto il corpo. In particolar modo nel rene presentano un'elevata espressione e la loro attivazione da parte dei ligandi naturali quali angiotensina II ed endotelina-1 regola il normale flusso sanguigno, promuove l'angiogenesi e la proliferazione di cellule endoteliali.

Gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR legano rispettivamente i recettori AT1R ed ETAR in modo allosterico e agonistico provocando un'iperattivazione del recettore che comporta la formazione di un ambiente pro-infiammatorio e un'attività di vasocostrizione talmente elevata da portare il paziente ad avere ipertensione maligna.<sup>20</sup>

Il ruolo degli anticorpi non-HLA nel trapianto di rene è ad oggi molto dibattuto in letteratura. Lo scopo di questa tesi è stato quello di capire se il dosaggio degli anticorpi non-HLA possa essere utile e significativo in relazione al loro possibile ruolo dannoso nell'andamento del trapianto di rene pediatrico.

In accordo con Pearl M. et al. nel 2019, i risultati preliminari di questo studio, suggeriscono una elevata prevalenza di questi anticorpi nella popolazione pediatrica rispetto a quella adulta (circa il 50%).<sup>29</sup> Dai risultati ottenuti dal dosaggio degli anticorpi tramite saggio ELISA, è possibile evidenziare come i valori anticorpali anti-ETAR e anti-AT1R ottenuti risultino più elevati rispetto all'adulto. La ragione di questa differenza non è ancora del tutto chiarita.<sup>30</sup>

I risultati ottenuti dai dosaggi degli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR evidenziano inoltre una forte associazione tra gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR, in accordo con quanto riportato da Pearl M. et al. che nel 2020<sup>31</sup>. Infatti, il 42% dei 167 pazienti pediatrici della popolazione osservata presenta elevati valori degli anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR insieme e solo il 7.5% presenta elevati valori di anti-ETAR singolarmente. Questo risultato sottolinea come tutti gli individui che presentano elevati valori anticorpali anti-AT1R presentino anche una elevata positività per anti-ETAR. Una piccola parte della nostra popolazione presenta solamente elevati valori anticorpali anti-ETAR indipendentemente dalla presenza degli anticorpi anti-AT1R.

Recentemente alcuni autori (Fichtner A. et al. 2021) riportano come nel nostro caso, una maggiore presenza di pazienti positivi per entrambi gli anticorpi, ma al contrario dei nostri pazienti, nel 22% dei casi presentano solamente elevati valori anticorpali anti-AT1R indipendentemente dalla presenza degli anticorpi anti-ETAR<sup>32</sup>. La differenza evidenziata potrebbe essere dovuta alla dimensione del campione analizzato. Nello studio di Fichtner, infatti, vengono presi in considerazione solamente 62 pazienti pediatrici, meno della metà della popolazione considerata per questo studio. Ad ogni modo, l'associazione tra i due anticorpi nei sieri dei pazienti pediatrici con trapianto di rene sembra essere confermata da numerosi studi in letteratura.

Pearl M. et al. nel lavoro del 2020, evidenzia inoltre come sui pazienti biopsiati per causa, la doppia positività comporti un aumento dell'espressione di citochine pro-infiammatorie, aumentando inoltre l'infiammazione delle arterie renali con un declino della funzione renale.<sup>33</sup>

Nella nostra casistica abbiamo confrontato invece i dosaggi anticorpali rispetto alle biopsie di protocollo, ovvero eseguite in assenza di segni clinici di rigetto, che sono state uniformate secondo la classificazione di Banff 2018. Il 70% delle biopsie valutate rientra nella categoria Banff 1, riferita a biopsie normali, in assenza di lesioni specifiche mentre, il restante 30% dei casi, rientra nella categoria rigetto cellulare (6/7 borderline). Non sono state evidenziate differenze tra il gruppo di pazienti pediatrici positivi e negativi agli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR rispetto alle diagnosi istologiche. Numerosi studi in letteratura hanno evidenziato il ruolo di questi auto anticorpi nel rigetto anticorpo-mediato e nel fallimento prematuro dell'organo, un esempio è quello riportato da Sorohan B.M. et al. del 2020.<sup>20</sup> Altri studi come quello di Pizzo H. et al. del 2022<sup>34</sup>, al contrario, sottolineano come la presenza di elevati anticorpi anti-AT1R superiore a 17 U/mL non sia associata ad una ridotta funzionalità renale o a rigetto in una piccola coorte di pazienti pediatrici analizzati.

In uno studio riportato da Pearl M. et al. nel 2020 è stata evidenziata una correlazione tra arterite ed elevati livelli anticorpali<sup>33</sup>. Nello studio pilota di questa tesi, i 12 pazienti non presentano arterite.

Nella nostra casistica è necessario tenere in considerazione che, a differenza di quello che viene riportato negli studi sopra citati, le biopsie valutate sono biopsie di follow up e non biopsie effettuate per causa, quindi se presenti, si tratta di rigetti subclinici. Questa importante differenza potrebbe giustificare l'assenza di una correlazione tra il gruppo dei pazienti positivi agli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR ed eventuale rigetto d'organo nel nostro studio. Infatti, anche nei casi in cui dovessero esserci lesioni biotiche caratteristiche del rigetto, nei nostri pazienti non sarebbero associate ad una funzionalità renale ridotta. Al contrario di quanto presente in letteratura, lo studio di questa tesi sta ricercando delle associazioni precoci tra i livelli anticorpali e le lesioni biotiche. La popolazione presa in considerazione oltre ad essere meno numerosa di quelle descritte in letteratura, ha un periodo di osservazione limitato a 24 mesi post trapianto. Sarà necessario prendere in considerazione eventuali biopsie per causa eseguite a distanza di più anni rispetto al trapianto per ricercare eventuali correlazioni.

I risultati dell'immunoistochimica del tessuto renale al T0 sono stati valutati in maniera indipendente da quelli ottenuti dall'analisi del tessuto a 6 e 24 mesi post trapianto, poiché la biopsia al tempo zero viene effettuata prima che il rene venga impiantato nel ricevente e quindi non è stata esposta agli anticorpi circolanti. Pertanto, la valutazione è stata eseguita per evidenziare eventuali lesioni già presenti nel donatore e per avere un quadro iniziale dell'organo trapiantato. Dalle immagini ottenute è evidente come il tessuto sia particolarmente colorato confrontato con quello delle biopsie di follow up. La forte colorazione di fondo può essere dovuta dal fatto che si tratta di un tessuto che sottoposto ad ischemia e riperfusione ha riportato alcuni danni: particolarmente evidenti quelli tubulari. Su queste biopsie il punteggio correlato all'espressione delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 (escludendo il comparto interstiziale, in quanto i T0 non presentano infiltrato infiammatorio) risulta significativamente aumentato rispetto a quelli ottenuti nelle biopsie a 6 e 24 mesi. Un aumento di espressione di queste molecole è riportato anche nello studio di Burne M. del 2001 in correlazione al danno ischemico renale.<sup>35</sup>

La localizzazione cellulare dei recettori AT1R ed ETAR è stata valutata con l'analisi immunoistochimica. In accordo con quanto riportato da Sorohan B. M. nel 2022, il recettore AT1R è espresso dalle cellule mesangiali, dalle cellule endoteliali e muscolari lisce dei vasi del rene, dalle cellule infiltranti presenti nell'interstizio e, in maggior quantità dalle cellule tubulari<sup>20</sup>. Differentemente da quanto riporta lo

stesso autore in un altro articolo del 2020, nella nostra popolazione, il comparto che esprime maggiormente il recettore AT1R sembra essere il tubulo e non il glomerulo.<sup>19</sup>

I risultati ottenuti sono sovrapponibili a quelli riportati nella maggior parte della letteratura. Il recettore ETAR è estremamente espresso a livello tubulare e presente anche negli altri compartimenti presi in considerazione: glomerulo, vasi e cellule infiltrate. La medesima localizzazione renale viene riportata nello studio effettuato da Banasik M. et al. nel 2021 in cui viene evidenziata la predominante espressione nell'epitelio tubulare.<sup>21</sup>

L'analisi statistica effettuata sui dati ottenuti dall'analisi semiquantitativa non ha evidenziato alcuna differenza significativa dell'espressione dei recettori AT1R ed ETAR tra il gruppo di pazienti positivi agli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR e il gruppo dei pazienti negativi agli anticorpi. Dal nostro studio emerge che non ci sia un aumento o una diminuzione dell'espressione dei recettori in base alla presenza degli auto anticorpi. Per indagare in modo più preciso la possibile presenza di una up-regolazione o down-regolazione a livello genico, sarà necessario effettuare ulteriori analisi di biologia molecolare.

Molti studi riportano come la diversa espressione recettoriale possa essere influenzata da fattori genetici e ambientali, ma non ci sono studi che riportino come l'elevata presenza degli autoanticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR possa essere legata ad una variazione dell'espressione proteica. Il campione studiato presenta una bassa numerosità, pertanto, ulteriori indagini sono necessarie.

Anche per quanto riguarda la localizzazione delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1, l'analisi immunocitochimica si è rivelata efficace. In accordo con quanto riportato in letteratura, le molecole di adesione sono presenti sulle superficie delle cellule endoteliali dei vasi e sulle cellule del sistema immunitario. ICAM-1 si presenta localizzata in particolar modo a livello vascolare, mentre VCAM-1 risulta più diffusa anche sulle altre cellule renali, tubulari e in minor parte glomerulari.

L'analisi statistica effettuata sui dati ottenuti dall'analisi semiquantitativa ha evidenziato alcune differenze significative dell'espressione delle molecole di adesione tra il gruppo di pazienti positivi agli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR e il gruppo dei pazienti negativi agli anticorpi.

In particolare, VCAM-1 risulta espressa di più nei pazienti con elevate quantità di anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR. A 6 mesi post trapianto questa differenza è già presente, ma non risulta essere ancora statisticamente significativa. A 24 mesi post trapianto la differenza di espressione della molecola di adesione VCAM-1, tra il gruppo di pazienti positivi e il gruppo di pazienti negativi per gli auto anticorpi, risulta statisticamente significativa con un p-value di 0.0043.

La molecola di adesione ICAM-1 viene espressa diversamente nei pazienti positivi e negativi per gli anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR. La differenza risulta statisticamente significativa già a 6 mesi post trapianto con un p-value di 0.0022. A 24 mesi post trapianto questa differenza viene persa. Analizzando nel dettaglio i pazienti considerati, è stato possibile notare un soggetto appartenente al gruppo dei pazienti negativi con un punteggio particolarmente elevato. Il paziente in questione risultava infatti negativo agli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR, ma positivo con dosaggi elevati agli anticorpi anti-HLA (DSA). La presenza di DSA nel paziente può giustificare l'aumentata espressione delle molecole di adesione in virtù della loro attività pro-infiammatoria riportata in numerosi studi. Togliendo questo paziente dall'analisi statistica, la diversa espressione di ICAM-1 tra i due gruppi è risultata significativa anche a 24 mesi post trapianto.

In conclusione, secondo i risultati ottenuti dallo studio di questa popolazione pediatrica trapiantata di rene, è ipotizzabile un aumento dell'attivazione recettoriale di AT1R ed ETAR, dovuto alla presenza degli autoanticorpi che porterebbe ad un up regolazione delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1. L'iperattivazione dei recettori AT1R ed ETAR, come già riportato negli studi di Sorohan B. M. nel 2020 e di Pearl M. H. del 2020, comporta l'innescò di una cascata di segnali che culmina con l'espressione di alcuni fattori di trascrizione come AP-1 e NFkB responsabili dell'aumento dell'espressione genica di fattori pro-infiammatori come MCP-1 e RANTES e pro-coagulanti come il fattore tissutale. MCP-1 e RANTES sono importanti mediatori della risposta immunitaria pro-infiammatoria, coinvolti nella formazione di una serie di citochine, tra cui IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , che partecipano alla determinazione dell'infiammazione microvascolare nel glomerulo e nei capillari peritubulari, nonché alla formazione del danno endoteliale.<sup>19,33</sup>

La presenza di citochine pro-infiammatorie e il danno endoteliale comportano un aumento dell'espressione delle molecole di adesione ICAM-1 e VCAM-1 che sono fondamentali per la migrazione transendoteliale delle cellule del sistema immunitario.

Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio, è plausibile pensare che questo meccanismo inizi a manifestarsi già entro primi due anni dal trapianto, anche in pazienti con funzionalità renale stabile.

Sarà necessario aumentare la numerosità dei campioni e, se possibile, effettuare ulteriori analisi molecolari per confermare quello che è stato osservato con l'analisi immunoistochimica.



## 5. CONCLUSIONI

Il rigetto anticorpo mediato causato dagli anticorpi anti-HLA è una delle principali cause di perdita prematura dell'organo.

Negli ultimi anni è aumentato l'interesse per altri anticorpi, non-HLA correlati, che sembrano avere un ruolo nel rigetto del rene: tra questi anche gli anti-recettore 1 dell'angiotensina II (AT1R) e anti-recettore A dell'endotelina-1 (ETAR). L'angiotensina II e l'endotelina-1 legando i rispettivi recettori AT1R ed ETAR, regolano il normale flusso sanguigno. Gli anticorpi anti-AT1R e anti-ETAR sembrano legare gli stessi recettori AT1R ed ETAR in modo permanente provocando un'iperattivazione dei recettori che porta allo sviluppo di un ambiente pro-infiammatorio con la formazione di citochine pro-infiammatorie che partecipano alla formazione dell'infiammazione microvascolare e comportando un aumento dell'espressione delle molecole di adesione intercellulare-1 (iCAM-1) e di adesione vascolare (VCAM-1). L'aumento delle molecole di adesione porterebbe ad un aumento della migrazione delle cellule del sistema immunitario che, una volta uscite dal torrente circolatorio migrerebbero verso l'organo danneggiato.

In conclusione, gli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR non solo possono essere considerati potenzialmente responsabili del danno all'allotrapianto, ma potrebbero considerarsi potenziali biomarcatori precoci del danno.

Per questo motivo, i dati ottenuti incoraggiano l'inserimento del dosaggio anticorpale degli anticorpi anti-AT1R ed anti-ETAR nel monitoraggio dei pazienti post trapianto in aggiunta al dosaggio anticorpale degli anticorpi anti-HLA.



## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Martini, F. H., Tallitsch, R. B. & Nath, J. L. *Anatomia umana*. (2019).
2. Harambat, J., van Stralen, K. J., Kim, J. J. & Tizard, E. J. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatric Nephrology* vol. 27 363–373 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00467-011-1939-1> (2012).
3. Trapianti Rene Sergio Serni, C. & Cirami, L. C. *GUIDA AL TRAPIANTO DI RENE Mininvasiva e dei Trapianti Renali Responsabile Programma Trapianto Rene Responsabile equipe chirurgica*.
4. CENTRO NAZIONALE TRAPIANTI.
5. *RETENAZIONALE TRAPIANTI*.
6. Salvatierra, O., Millan, M. & Concepcion, W. Pediatric renal transplantation with considerations for successful outcomes. *Semin Pediatr Surg* **15**, 208–217 (2006).
7. Laskin, B. L., Mitsnefes, M. M., Dahhou, M., Zhang, X. & Foster, B. J. The mortality risk with graft function has decreased among children receiving a first kidney transplant in the United States. *Kidney Int* **87**, 575–583 (2015).
8. Uggeri, F., Colombo, P. & Scotti-Foglieni, C. Il trapianto di rene nel bambino. *Minerva Chir* **25**, 1477–1490 (1970).
9. Warady, B. A. Should the doqi adequacy guidelines be used to standardize peritoneal dialysis in children? *Peritoneal Dialysis International* **21**, 0–4 (2001).
10. Foster, B. J. *et al*. Impact of HLA mismatch at first kidney transplant on lifetime with graft function in young recipients. *American Journal of Transplantation* **14**, 876–885 (2014).
11. Zotta, F., Guzzo, I., Morolli, F., Diomedi-Camassei, F. & dello Strologo, L. Protocol biopsies in pediatric renal transplantation: a precious tool for clinical management. *Pediatric Nephrology* **33**, 2167–2175 (2018).
12. Roufosse, C. *et al*. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation* vol. 102 1795–1814 Preprint at <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002366> (2018).
13. Tsalouchos, A. & Salvadori, M. Fisiopatologia del rigetto acuto e cronico. *Giornale di Tecniche Nefrologiche e Dialitiche* **31**, 128–132 (2019).
14. Tsalouchos, A. & Salvadori, M. Diagnosi e trattamento del rigetto acuto cellulo-mediato nel trapianto di rene. *Giornale di Clinica Nefrologica e Dialisi* **32**, 22–25 (2020).
15. Tsalouchos, A. & Salvadori, M. Rigetto anticorpo-mediato nel trapianto di rene: fisiopatologia, clinica e terapia. *Giornale di Clinica Nefrologica e Dialisi* **32**, 131–134 (2020).

16. Loupy, A., Hill, G. S. & Jordan, S. C. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nature Reviews Nephrology* vol. 8 348–357 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.81> (2012).
17. el band, J. E. kaaoui *et al.* Evaluation of Antibodies Directed Against Two GPCRs, Anti-AT1R and Anti-ETAR, on Kidney Transplant Outcome. *Curr Protein Pept Sci* **22**, 745–757 (2021).
18. Philogene, M. C., Johnson, T., Vaught, A. J., Zakaria, S. & Fedarko, N. Antibodies against Angiotensin II Type 1 and Endothelin A Receptors: Relevance and pathogenicity. *Human Immunology* vol. 80 561–567 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.04.012> (2019).
19. Sorohan, B. M. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor antibodies in kidney transplantation: An evidence-based comprehensive review. *Transplantation Reviews* vol. 34 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.trre.2020.100573> (2020).
20. Sorohan, B. M. *et al.* Non-HLA Antibodies in Kidney Transplantation: Immunity and Genetic Insights. *Biomedicines* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071506> (2022).
21. Banasik, M. *et al.* The summarized assessment of endothelin a receptor expression in renal transplant compartments associated with antibody-mediated rejection. *Diagnostics* **11**, (2021).
22. Šeruga, M. *et al.* Endothelin-1 Gene Polymorphisms rs5370, rs1476046, and rs3087459 are not Associated with Diabetic Nephropathy in Caucasians with Type 2 Diabetes Mellitus. *Folia Med (Plovdiv)* **59**, 261–269 (2017).
23. C. Urso, G. C. *Stress ossidativo e disfunzione endoteliale*. *Minerva Medica* (2011).
24. Roebuck, K. A. & Finnegan, A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of Leukocyte Biology* vol. 66 876–888 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jlb.66.6.876> (1999).
25. Kong, D. H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H. & Lee, S. Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms19041057> (2018).
26. Yusuf-Makagiansar, H., Anderson, M. E., Yakovleva, T. v., Murray, J. S. & Siahaan, T. J. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Medicinal Research Reviews* vol. 22 146–167 Preprint at <https://doi.org/10.1002/med.10001> (2002).
27. Nowańska, K., Wiśnicki, K., Kuriata-Kordek, M., Krajewska, M. & Banasik, M. The role of endothelin II type A receptor (ETAR) in transplant injury.

28. Zordan, A. Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *Methods in Molecular Biology* **730**, 189–202 (2011).
29. Pearl, M. H. & Reed, E. F. Angiotensin II type I receptor antibodies in pediatric solid organ transplant. *Human Immunology* vol. 80 568–572 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.03.016> (2019).
30. Bjerre, A. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor antibodies in childhood kidney transplantation. *Pediatr Transplant* **20**, 627–632 (2016).
31. Pearl, M. H. *et al.* Endothelin Type A Receptor Antibodies Are Associated With Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies, Vascular Inflammation, and Decline in Renal Function in Pediatric Kidney Transplantation. *Kidney Int Rep* **5**, 1925–1936 (2020).
32. Fichtner, A. *et al.* Association of non-HLA antibodies against endothelial targets and donor-specific HLA antibodies with antibody-mediated rejection and graft function in pediatric kidney transplant recipients. doi:10.1007/s00467-021-04969-1/Published.
33. Pearl, M. H. *et al.* Endothelin Type A Receptor Antibodies Are Associated With Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies, Vascular Inflammation, and Decline in Renal Function in Pediatric Kidney Transplantation. *Kidney Int Rep* **5**, 1925–1936 (2020).
34. Pizzo, H. *et al.* Pre-transplant angiotensin II receptor type I antibodies in pediatric renal transplant recipients: An observational cohort study. *Pediatr Transplant* (2022) doi:10.1111/petr.14400.
35. Burne, M. J. *et al.* IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury. *J Leukoc Biol* **70**, 192–198 (2001).