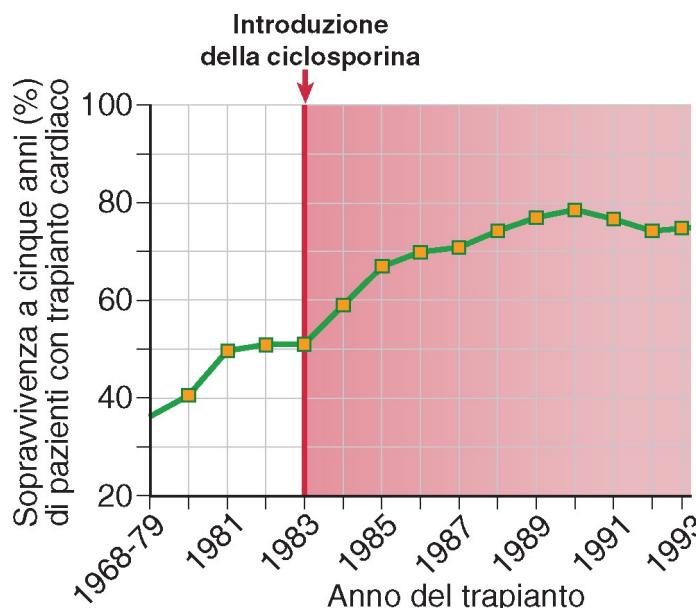


## Rigetto acuto e cronico del trapianto mediato da anticorpi

Per anni le cellule T sono state considerate le cellule principalmente responsabili del rigetto del trapianto. Infatti gli allotrapianti non sono rigettati nei topi e negli individui che non hanno linfociti T. Per questa ragione la maggior parte delle terapie immunosoppressive agisce sulle cellule T. Queste terapie hanno fatto sì che la sopravvivenza a un anno dei soggetti sottoposti a trapianto di cuore o di rene sia fra l'85 e il 95%. Tuttavia episodi di rigetto acuto possono manifestarsi e i trapiantati a lungo termine spesso soccombono di rigetto cronico. Attualmente diversi studi indicano che una parte di questi rigetti sia mediata dagli anticorpi.



Si stima che il 20% degli individui che hanno subito trapianto di reni va incontro a perdita dell'organo trapiantato entro 5 anni e il 50% entro 10-12 anni.  
Nel trapianto di polmone il fallimento è del 50% entro i 5 anni dal trapianto.

## Ruolo degli anticorpi nel rigetto del trapianto

Il rigetto mediato da anticorpi rimane una importante causa di fallimento del trapianto.

Secondo i dati dell'Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN) circa il 60% degli individui in attesa di trapianto di rene presenta anticorpi anti-HLA. Questi includono principalmente donne e individui già trapiantati.

Il 7%, degli individui non sensibilizzati all'HLA sviluppa anticorpi anti HLA del donatore [*de novo* donor specific antibodies (dnDSA)] dopo 5 anni dal trapianto di reni; il 20% dopo 10 anni; il 40% dei pazienti pediatrici e coloro che non aderiscono alla terapia post trapianto sviluppano dnDSA.

**La produzione di anticorpi contro il donatore rappresenta il maggiore fattore di rischio per la sopravvivenza del trapianto.**

Dopo 5 anni dalla comparsa di dnDSA il 40% di pazienti va incontro a perdita del trapianto rispetto all'80% di sopravvivenza dei pazienti che non sviluppano anticorpi. Il 50% dei fallimenti di trapianto più tardivi sono stati attribuiti allo sviluppo di DSA anti-HLA.

**Il rigetto acuto del trapianto si sviluppa nel 20% dei pazienti con anticorpi pre-formati anti-HLA.**

## **Evidenze sul ruolo degli anticorpi nel rigetto del trapianto**

I primi studi di Gorer nel 1936 mostrano che gli allotrianti di pelle erano in grado di indurre alloanticorpi. Tuttavia gli esperimenti di trasferimento degli alloanticorpi durante il trapianto di pelle non erano in grado di mediare il rigetto del trapianto.

Il ruolo degli anticorpi nel rigetto del trapianto è stato suggerito nel 1970 da Paul Russell che dimostra una forte correlazione fra la presenza di anticorpi circolanti specifici per le molecole HLA del donatore e la presenza di lesioni stenotiche delle arterie negli allotrianti renali.

Studi successivi nel modello murino di trapianto di cuore hanno dimostrato che:

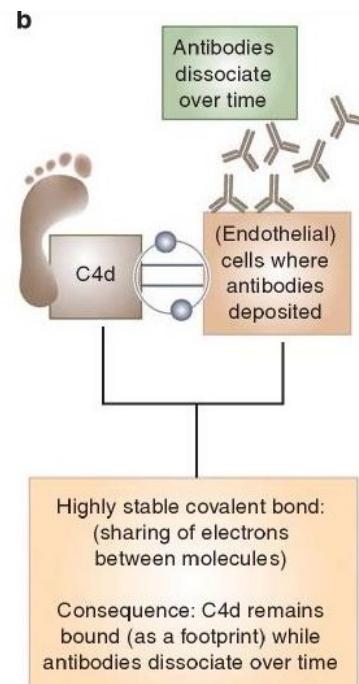
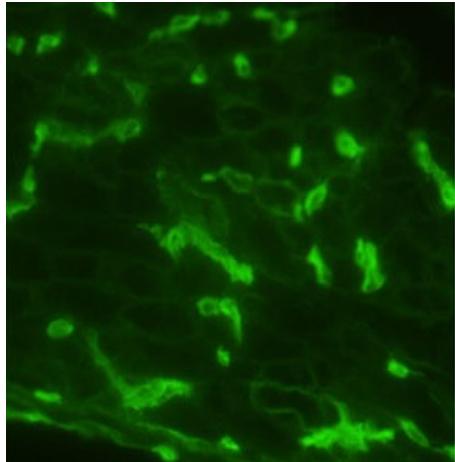
- il trasferimento passivo degli alloanticorpi promuoveva lo sviluppo di arteriopatie del trapianto in topi normali e in topi immunodeficienti.
- Tali lesioni non si sviluppavano in topi deficienti per le cellule B.

Studi clinici hanno dimostrato che il rigetto acuto di trapianto di reni è più grave nei pazienti che presentano anticorpi specifici per le molecole HLA del donatore.

### **THE VASCULAR BED AS THE PRIMARY TARGET IN THE DESTRUCTION OF SKIN GRAFTS BY ANTISERUM**

- I. Resistance of Freshly Placed  
Xenografts of Skin to Antiserum\***

# Deposizione del C4d nei vasi del trapianto come marker dell'attivazione del complemento nel trapianto

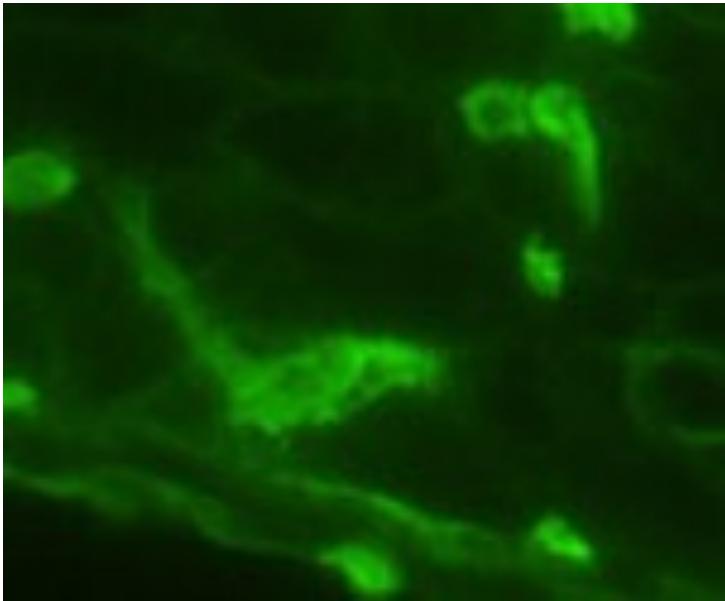


Fino al 1990 l'importanza degli anticorpi nel rigetto del trapianto è stata messa in discussione per la mancanza di evidenze della presenza di anticorpi o del complemento nel trapianto.

Nel 1990 viene dimostrata la deposizione di C4d sulla microvascolatura del trapianto di rene. Questa rappresenta la prova indiretta del legame nell'organo trapiantato degli anticorpi specifici per le molecole del donatore e dell'attivazione del complemento.

Il C4d è un prodotto inerte derivato dalla scissione del C4b e si lega nel sito di attivazione del complemento da parte degli anticorpi anti-HLA donatore (DSA). Il C4d ha una lunga emivita per questo permane nel luogo in cui è stato attivato il complemento

## Il rigetto acuto del trapianto mediato da anticorpi avviene per mezzo dell'attivazione del complemento



Lo sviluppo di saggi in grado di evidenziare la deposizione del C4d insieme all'evidenza che la deposizione di C4d si associa alla presenza di anticorpi anti-HLA negli individui con rigetto del trapianto di reni ha permesso di stabilire il ruolo dell'attivazione del complemento nel rigetto acuto del trapianto mediato da anticorpi.

La deposizione di C4d nei capillari rappresenta il marcitore più affidabile del rigetto acuto del trapianto di reni mediato dagli anticorpi.

# Rigetto acuto d'organo mediato dagli anticorpi (AAMR)

Il rigetto di trapianto mediato dai linfociti T risponde all'aumento del trattamento con immunosoppressori. Mentre il rigetto acuto mediato da anticorpi è refrattario.

I criteri diagnostici dell'AAMR sono stati definiti inizialmente per il trapianto di reni e includono:

## **Box 1 | Diagnostic criteria for acute antibody-mediated rejection**

- Clinical evidence of acute graft dysfunction
- Histological evidence of acute tissue injury:  
that is, neutrophils, macrophages or thrombi in capillaries, fibrinoid necrosis, or acute tubular injury
- Immunopathological evidence for the action of antibodies:  
that is, complement component 4d (C4d) deposited in peritubular capillaries, or antibodies or C3 in arteries
- Serological evidence of HLA-specific antibodies or other donor-specific antibodies at the time of biopsy

L'AAMR generalmente evolve rapidamente e si può manifestare dopo mesi o anni dal trapianto. L'AAMR colpisce il 6.7% (3-12%) dei pazienti con trapianto di rene e il 32% dei pazienti a cui è stato diagnosticato rigetto acuto. Questo tipo di rigetto si presenta con un aumento della creatinina serica (marcatore di disfunzione renale) ed è resistente a qualsiasi tipo di terapia specifica per i linfociti T (steroidi, ciclosporina).

## Caratteristiche della risposta anticorpale nel rigetto del trapianto mediato da anticorpi

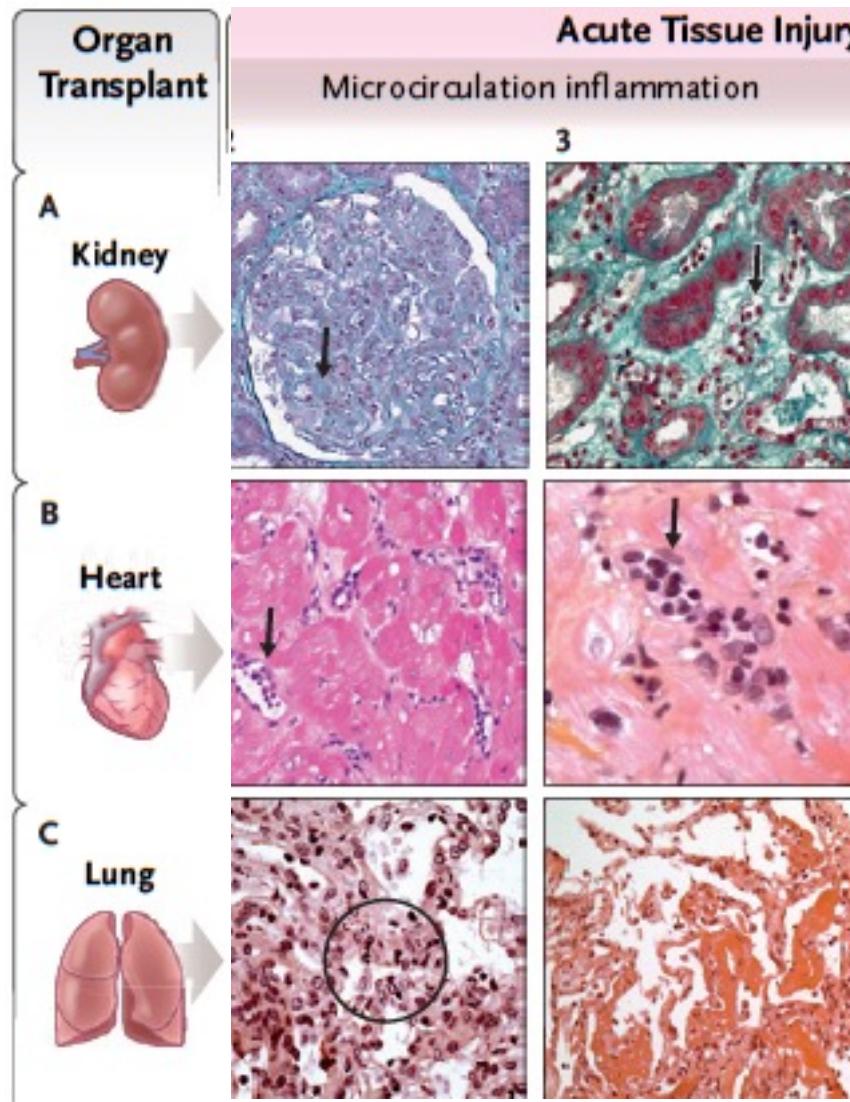
Gli anticorpi contro gli antigeni del donatore possono essere pre-esistenti donor specific antibodies (DSA) o generati in seguito al trapianto e si definiscono de novo DSA (dnDSA). Molto spesso i dnDSA derivano da insufficiente immunosoppressione o da mancata aderenza alla terapia immunosoppressiva.

Sia gli anticorpi anti donatore pre-esistenti che generati de-novo possono essere reattivi:

- verso gli antigeni HLA
- molecole non-HLA es: il recettore di tipo 1 dell'angiotensina II (anti-AT1R) nel rigetto del trapianto di rene; collagene (anti-collagene) nei trapianti di cuore e polmone.

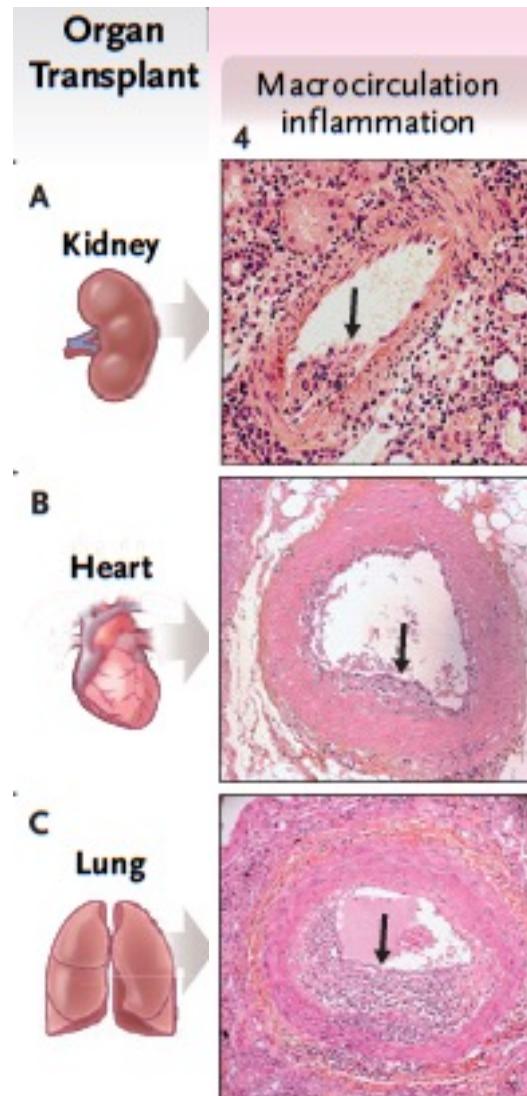
Numerosi studi hanno evidenziato anticorpi anti-AT1R in trapianti di rene con evidenza istologica di rigetto mediato da anticorpi ma senza anticorpi anti-HLA.

## Caratteristiche dell'infiammazione del microcircolo nell' rigetto AMR acuto



Il rigetto mediato da anticorpi è osservabile a livello del microcircolo dell'organo trapiantato ed è caratterizzato da **dilatazione dei capillari, vacuolizzazione delle cellule endoteliali, presenza di cellule attivate nei capillari.** Tali cellule includono monociti, macrofagi, cellule NK, cellule T e neutrofili. Anche lesioni del macrocircolo caratterizzano il rigetto AAMR (arteriti).

## Caratteristiche dell'infiammazione del macrocircolo nell' AMR cronico



La presenza di lesioni a livello del macrocircolo includono infiammazione delle arterie e infiltrato di monociti e linfociti dell'intima.

## Presenza di anticorpi anti-donatore specifici per molecole HLA o altri antigeni

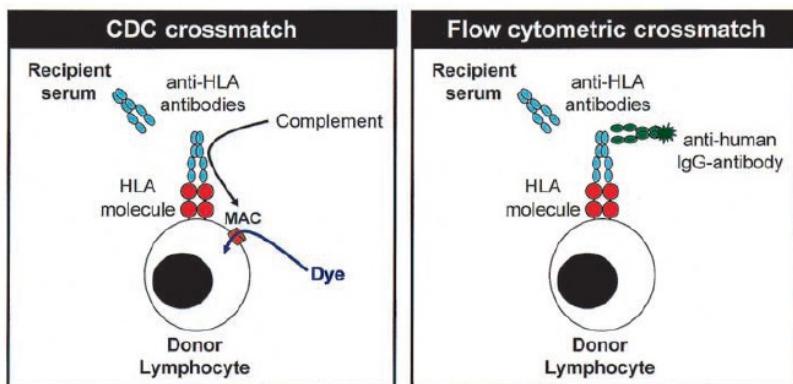
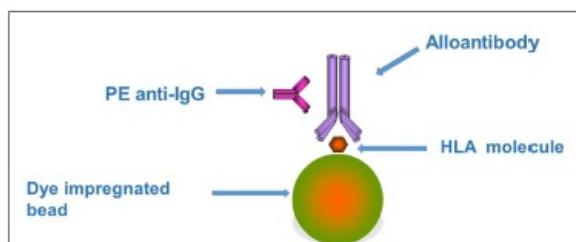


Figure 1

Cell-based methods for detecting HLA-DSA. The complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDC crossmatch) is performed by incubating T- and B-lymphocytes of the donor with serum from the recipient with subsequent addition of complement. If recipient antibodies bind to the donor cells, complement is activated, which creates "holes" in the cell membrane through the membrane-attack complex (MAC). A dye will then stain all cells with permeable membranes indicating antibody binding. The result (percentage of stained cells) is determined by eye using fluorescence microscopy. The flow cytometric crossmatch is performed by incubating T- and B-lymphocytes of the donor with serum from the recipient with subsequent addition of a fluorescent secondary antibody binding to human IgG-antibodies. The fluorescent intensity correlating with the amount of antibody binding to the cells is measured by a flow cytometer.



**FIGURE 1 |** The figure represents the principles underlying the Luminex bead assay. Each bead has one or more different types of human leukocyte antigen (HLA) molecules attached depending on the level of testing being performed. If the test serum contains an HLA antibody it will bind to the appropriate HLA molecule. This binding can be detected by the use of a second phycoerythrin (PE)-labeled anti-human IgG. Each bead gives a specific signal when excited by one of the lasers built into the Luminex instrument due to the unique intensity of fluorophore embedded in the bead. A second laser detects the fluorescent excitation produced by the PE on the second antibody. The combination of the two signals indicates first the presence (PE fluorescence) and second the specificity (bead fluorescence) of the HLA antibody in the test serum.

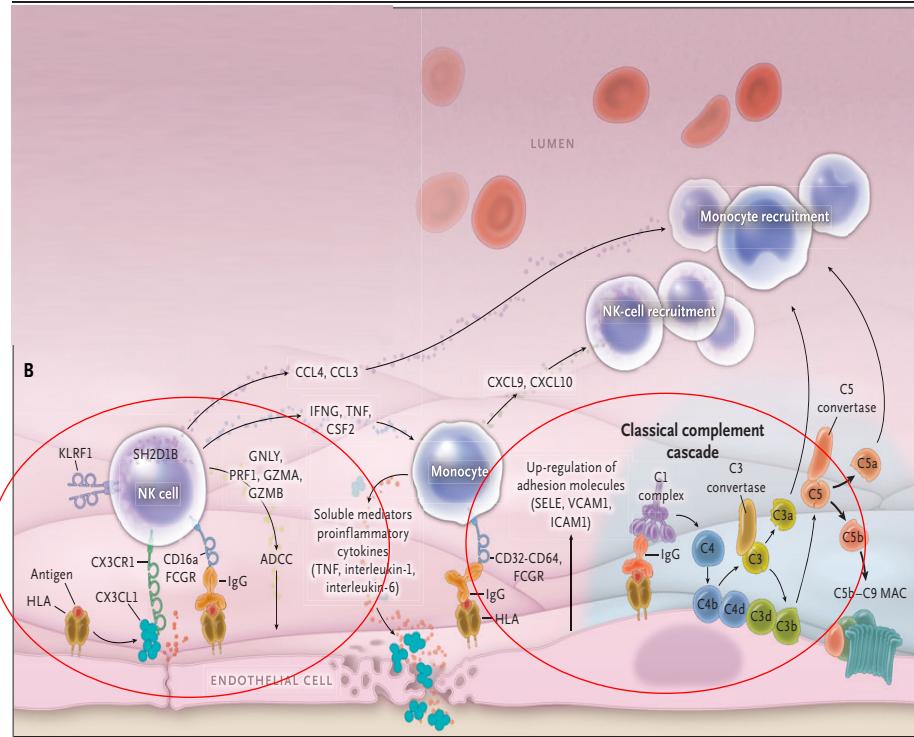
La presenza di anticorpi specifici per il donatore può essere evidenziata attraverso diversi saggi quali la complement dependent cytotoxicity (CDC cross match) o attraverso citofluorimetria.

Gli anticorpi anti donatore possono comparire in qualsiasi momento dopo il trapianto e generalmente sono conseguenti a insufficiente immunosoppressione o a ridotta aderenza alla terapia immunosoppressiva.

I donor specific antibodies sono specifici per molecole HLA o per altri antigeni quali il collagene nel trapianto di cuore o di polmone.

Saggi che utilizzano molecole HLA legate a supporti solidi hanno una maggiore sensibilità e specificità di rilevamento degli anticorpi anti-HLA.

# Meccanismi immunologici nel rigetto acuto del trapianto mediato da anticorpi



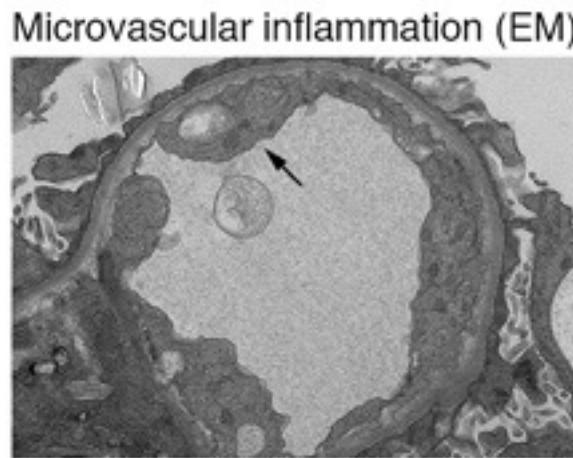
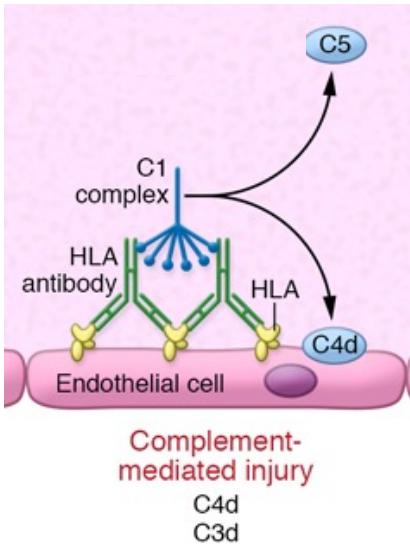
Gli anticorpi che legano le molecole HLA espresse dalle cellule endoteliali del donatore innescano diversi meccanismi immunologici:

- Attivazione del complemento
- Attivazione delle cellule NK

## Meccanismo del danno dell'organo mediato dagli anticorpi anti-HLA: attivazione del complemento

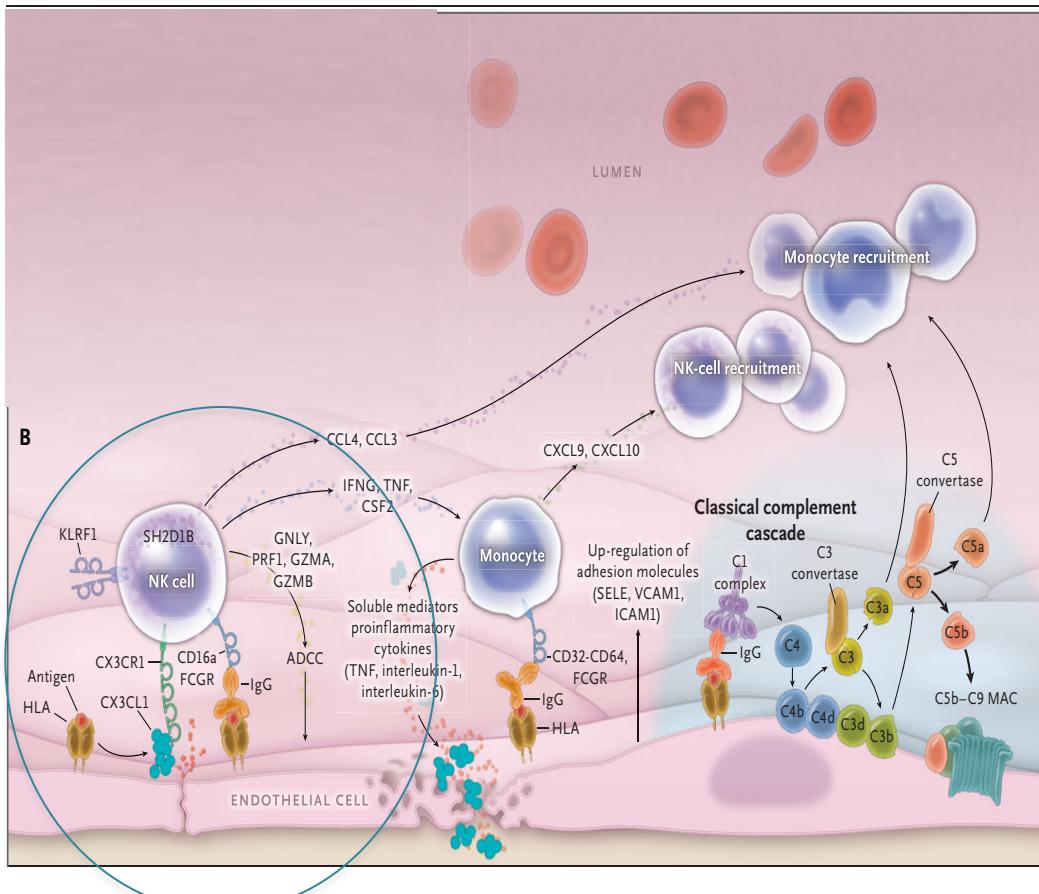
L'attivazione del complemento ha un ruolo importante nel rigetto del trapianto:

- Gli anticorpi anti-donatore legando le cellule endoteliali attivano la cascata del complemento con conseguente liberazione di C5a e C3a che agiscono da anafilotossine mediando il richiamo di monociti e neutrofili.
- L'attivazione del complemento determina la formazione del MAC a livelli sublitici che è in grado di attivare NF-κB nelle cellule endoteliali che induce l' espressione di citochine e molecole di adesione. La lisi delle cellule endoteliali in seguito alla formazione del MAC è rara nell' AMR.



I livelli di attivazione del complemento dipendono da: l'isotipo degli anticorpi, l'abbondanza dell'antigene bersaglio, la densità delle immunoglobuline, il sottotipo di IgG. Le IgG sono l'isotipo anticorpale maggiormente responsabile del AMR (antibody mediated rejection). In particolare la presenza di IgG3 è stata associata al fallimento dei trapianti di rene e di fegato.

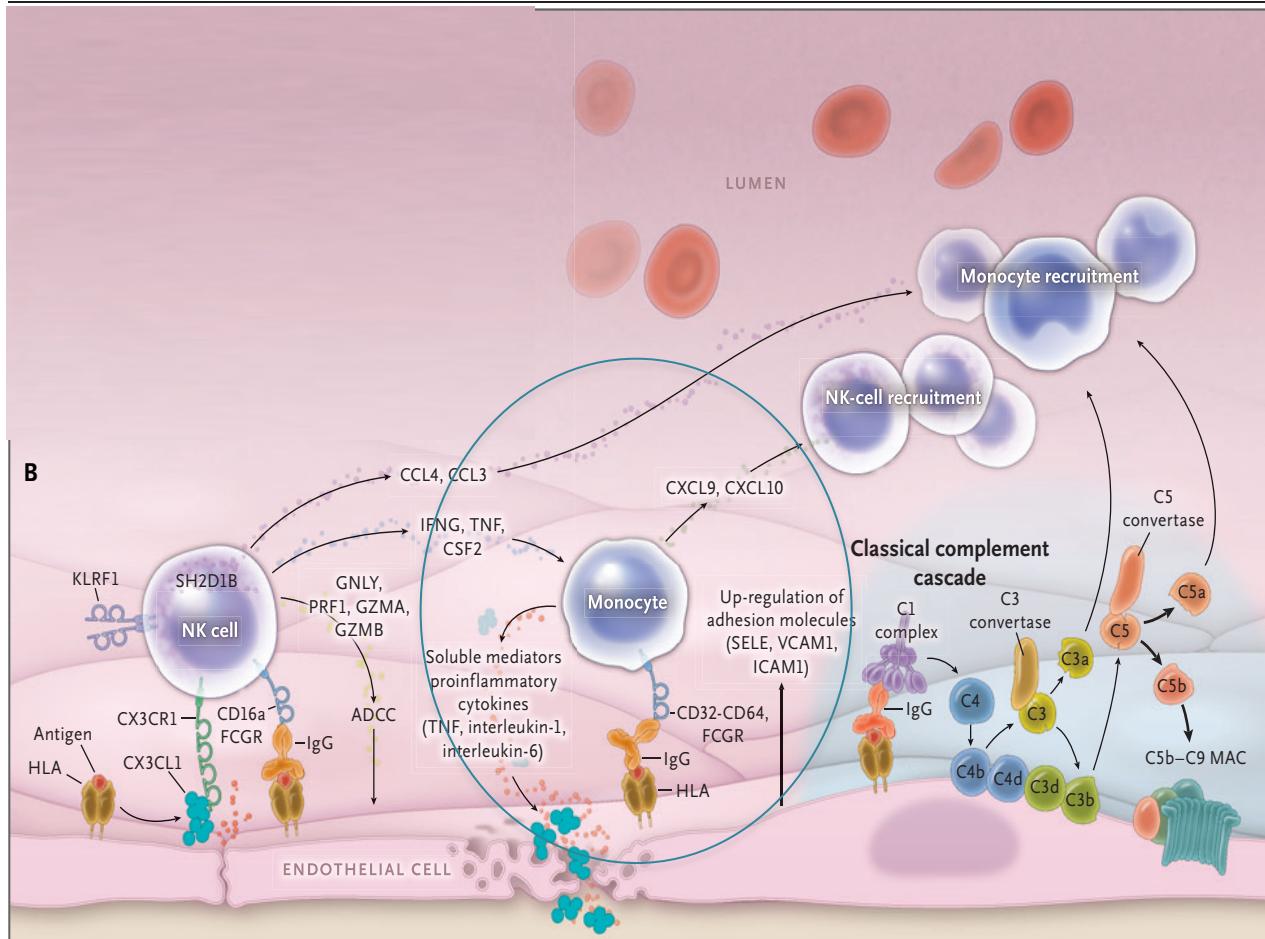
## Meccanismi immunologici nel rigetto acuto del trapianto mediato da anticorpi



Gli anticorpi anti-donatore legati alle cellule endoteliali interagiscono con il recettore per le IgG espresso dalle cellule NK (CD16) attivandole. Le cellule NK attivate rilasciano:

- chemochine che richiamano i monociti (CCL4 e CCL3)
- citochine quali IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , che agiscono sui monociti aumentando le capacità citotossiche e sulle cellule endoteliali aumentando l'espressione di molecole di adesione.

# Meccanismi immunologici nel rigetto acuto del trapianto mediato da anticorpi

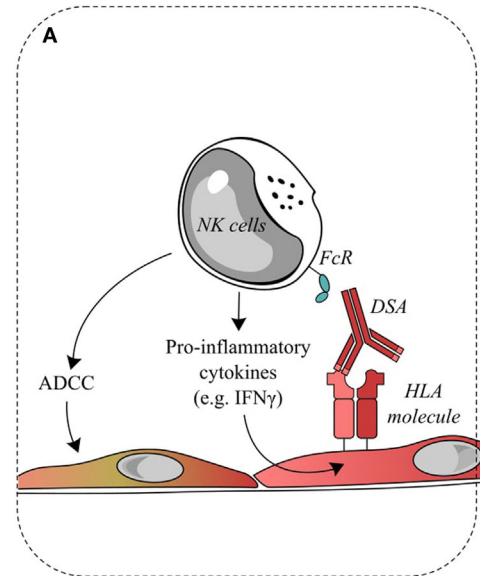


I monociti attivati rilasciano citochine pro-infiammatorie quali IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 che possono attivare o anche danneggiare le cellule endoteliali.

L'aumento dell'espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali facilita l'adesione dei leucociti all'endotelio.

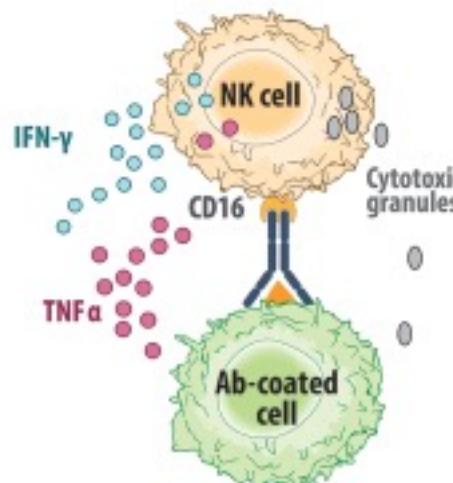
I monociti attivati mediano il reclutamento delle cellule NK mediante la produzione delle chemochine CXCL9 e CXCL10.

## Meccanismi immunologici nel rigetto acuto del trapianto mediato da anticorpi



Le cellule NK mediante la produzione di citochine quali IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  attivano le cellule endoteliali aumentando l'espressione delle molecole HLA. Inoltre queste cellule possono mediare il danno delle cellule endoteliali attraverso la citotossicità anticorpo dipendente (ADCC).

### Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)



## Ruolo della neo sintesi di anticorpi nel rigetto acuto del trapianto

### Acute antibody-mediated rejection

- C4d deposition in peritubular capillaries
- Donor-specific antibodies in serum
- Histologic evidence of injury (microthrombi in peritubular capillaries, tubular injury and/or cellular infiltration)

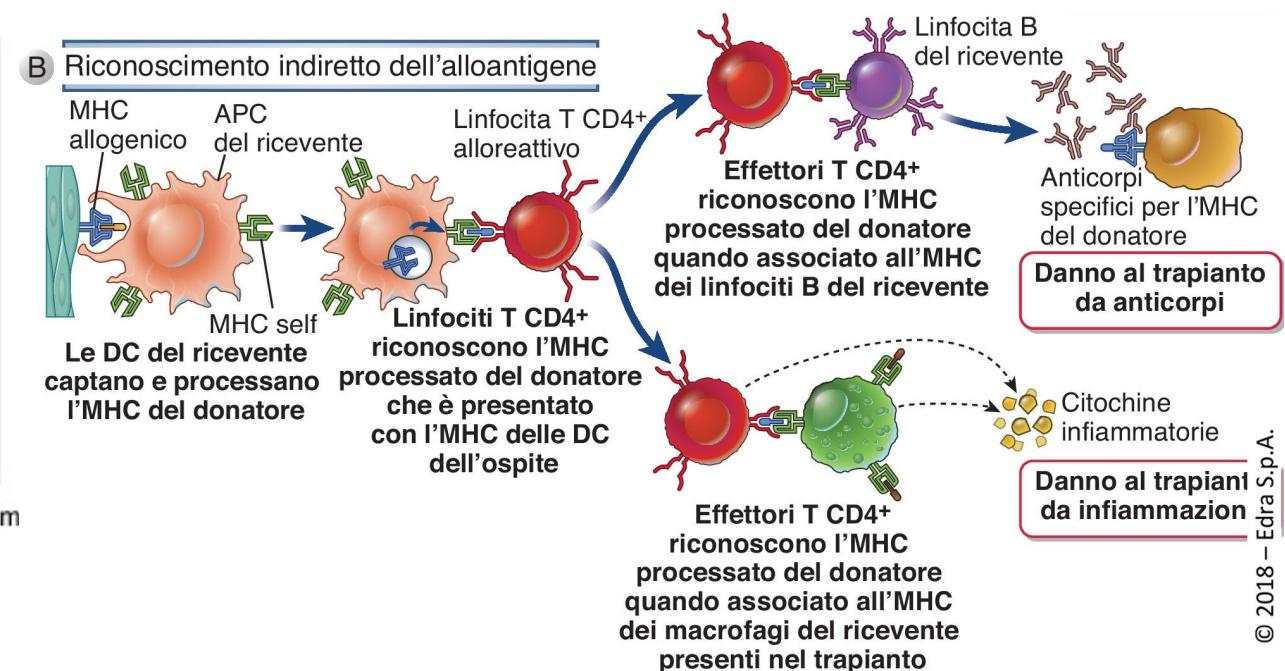
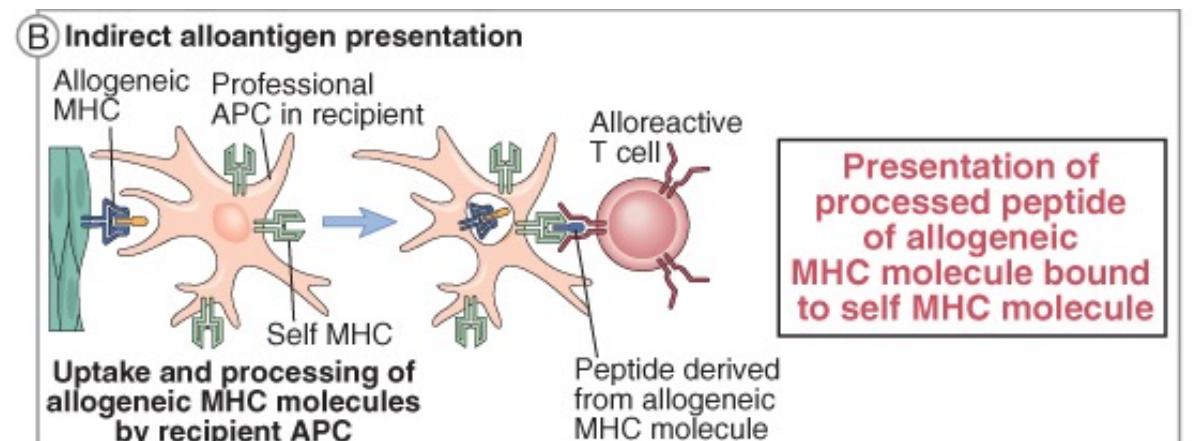
Nel rigetto acuto del trapianto mediato da anticorpi, l'aumento dei livelli di anticorpi specifici per gli alloantigeni del donatore dopo il trapianto correla con l'incidenza di rigetto acuto del trapianto.

I pazienti che sviluppano anticorpi anti-HLA del donatore hanno una minore probabilità di sopravvivenza.

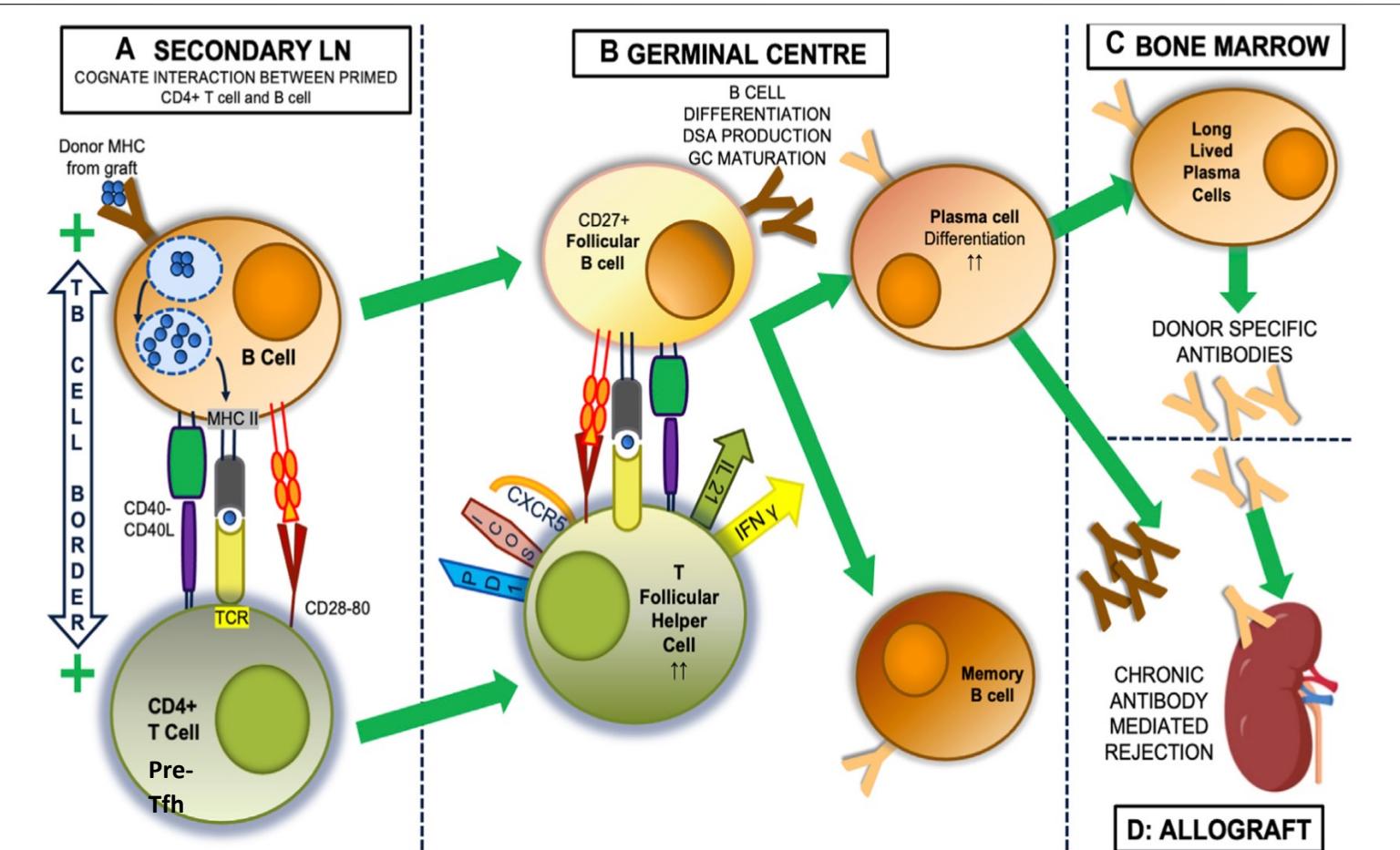
# Antigeni e presentazione antigenica nel rigetto del trapianto mediato da anticorpi: I linfociti T CD4+ che riconoscono per via indiretta l'alloantigene cooperano con i linfociti B nella produzione di anticorpi allospecifici

La risposta anticorpale verso gli alloantigeni richiede generalmente l'help da parte delle cellule T. Esperimenti nel topo hanno dimostrato che la produzione di anticorpi verso alloantigeni richiede la presentazione indiretta dell'alloantigene.

La risposta B include il differenziamento di plasmacellule che migrano nel midollo osseo dove continuano a produrre anticorpi.



## Generazione delle risposta B del ricevente specifica per gli antigeni del donatore



Cellule B donor specifiche incontrano l'antigene nel follicolo. I linfociti B così attivati migrano nella zona di confine T-B del linfonodo. Allo stesso tempo la DC presenta l'antigene alla cellula T naïve mediando il differenziamento a Tfh.

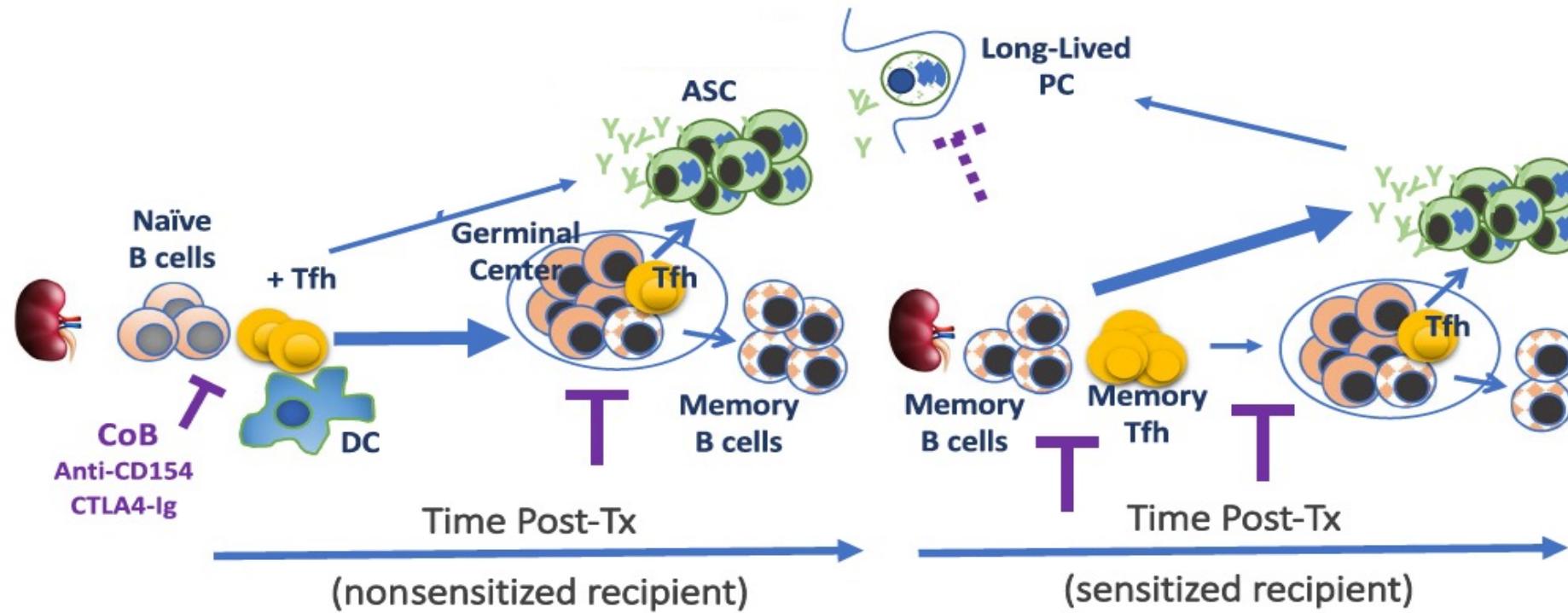
Nella zona di confine l'interazione fra Tfh, precedentemente attivata dalla DC, con il linfocita B è mediata da:

- TCR-MHC+peptide
- CD28-CD80/86
- LFA1-ICAM
- CD154-CD40

Le cellule B che ricevono la segnalazione differenziano in antibody secreting cells (ASC) o entrano nel follicolo dove danno origine al CG.

Nel CG le cellule B vanno incontro a molteplici cicli di ipermutazione somatica e commutazione di classe con la generazione infine di plasmacellule e cellule B della memoria.

## Risposta B in riceventi sensibilizzati o non al donatore



**FIGURE 1** Elaboration of donor-specific B cell responses in nonsensitized and sensitized recipients. Thickness of arrowed lines represent relative differentiation fate. ASC, antibody secreting cell; COB, costimulation blockade; DC, dendritic cell; PC, plasma cell; Tfh, T follicular helper cell

# Terapie del rigetto mediato da anticorpi

Il primo obiettivo dei trattamenti terapeutici del rigetto del trapianto mediato da anticorpi è o la rimozione degli anticorpi circolanti anti-HLA del donatore o la riduzione della loro produzione.

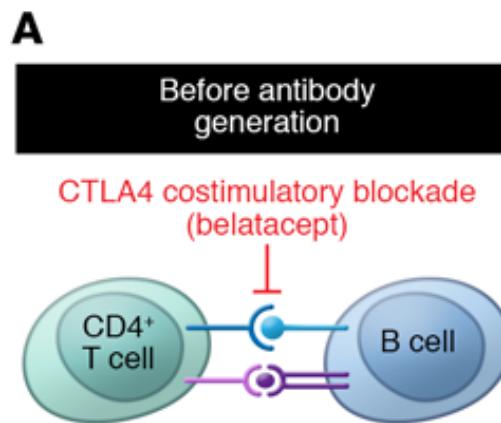
Le terapie attualmente adottate consistono nel trattare i pazienti con:

il belatacept (molecola di fusione CTLA4-Ig)

plasmaferesi [procedura terapeutica che permette la separazione della componente liquida del sangue (il plasma) dalla componente cellulare e la rimozione di sostanze in essa presenti],

l'infusione di Immunoglobuline

glucocorticoidi

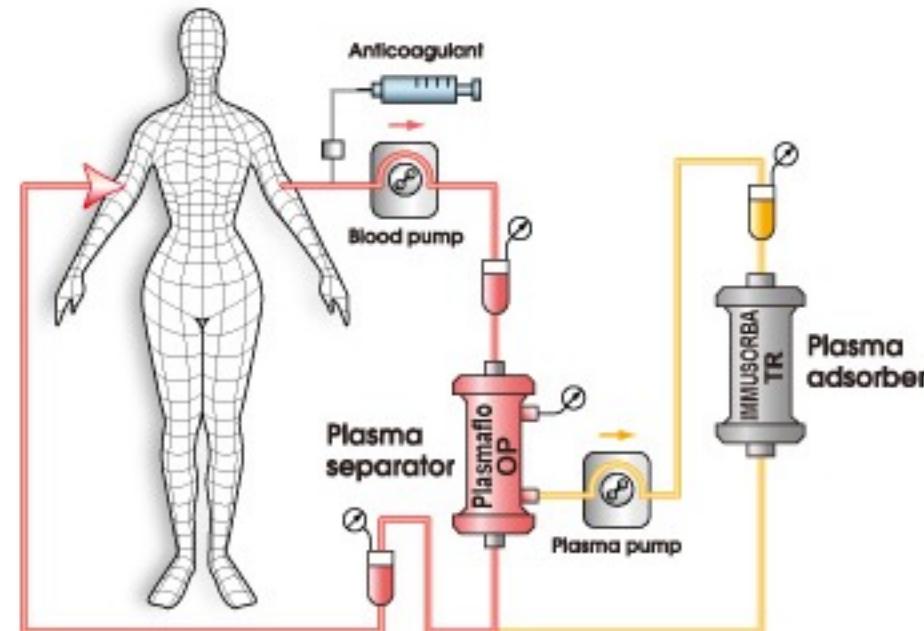
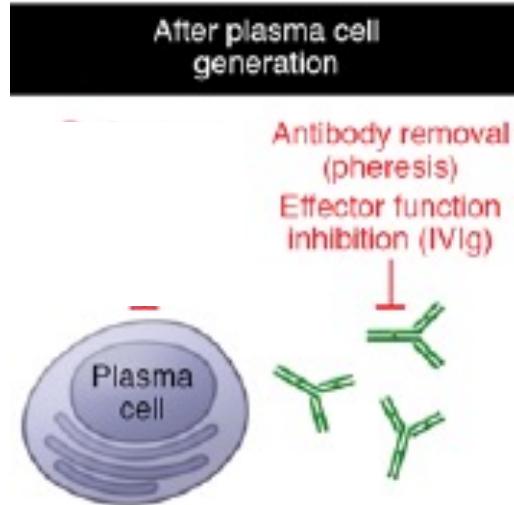


Il blocco della costimolazione riduce la produzione degli anticorpi contro il donatore.

Blocco della costimolazione T-B.  
Che previene la formazione di anticorpi.

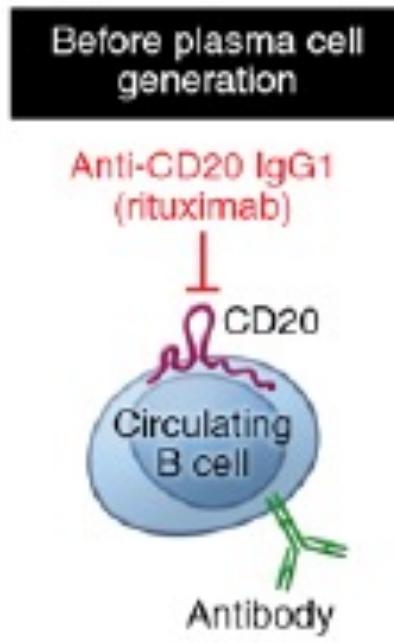
## Terapie del rigetto mediato da anticorpi

### Rimozione degli anticorpi dal plasma



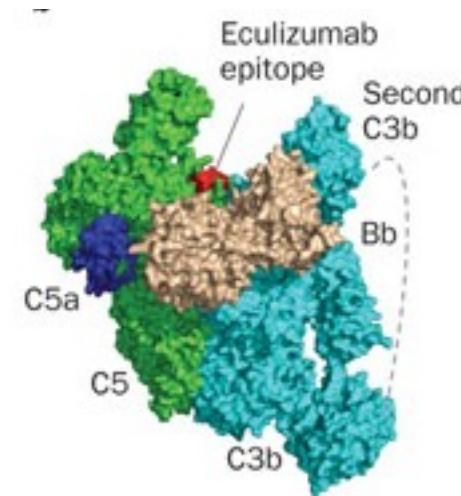
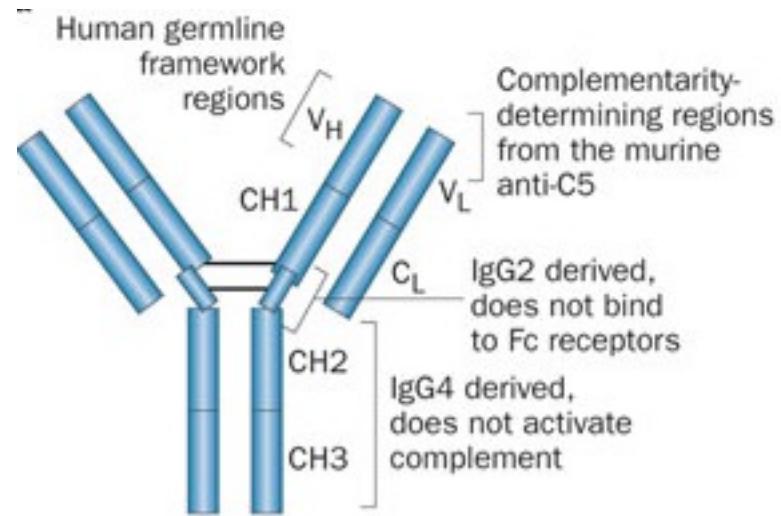
Gli studi hanno dimostrato che la rimozione degli anticorpi dal plasma e l'infusione di immunoglobuline sono efficaci a breve termine.

## Terapie per la prevenzione della produzione di anticorpi specifici per gli alloantigeni del donatore



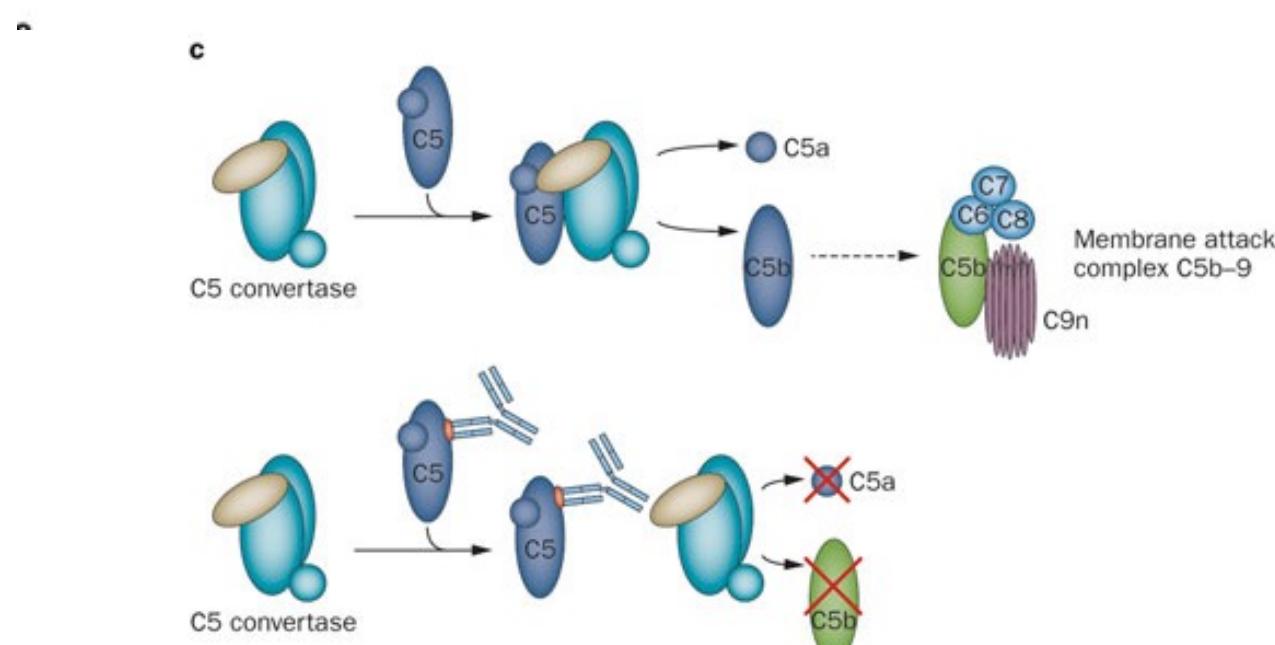
Il trattamento con un anticorpo anti-CD20 che è una glicoproteina di membrana espressa dai linfociti pre-B e B ma non dalle plasmacellule. Tale anticorpo elimina i linfociti B attraverso attivazione del complemento o antibody dependent cytotoxicity. Determina una forte riduzione dei linfociti B. Tale trattamento è risultato efficace nel desensibilizzare pazienti candidati al trapianto con elevati livelli di anticorpi anti-HLA diminuendo il tempo di attesa per il trapianto. Non agisce sulle plasmacellule. Tale trattamento non ha mostrato benefici nei pazienti con rigetto acuto del trapianto mediato da anticorpi.

## Il trattamento dei pazienti trapiantati con eculizumab previene l'AMR



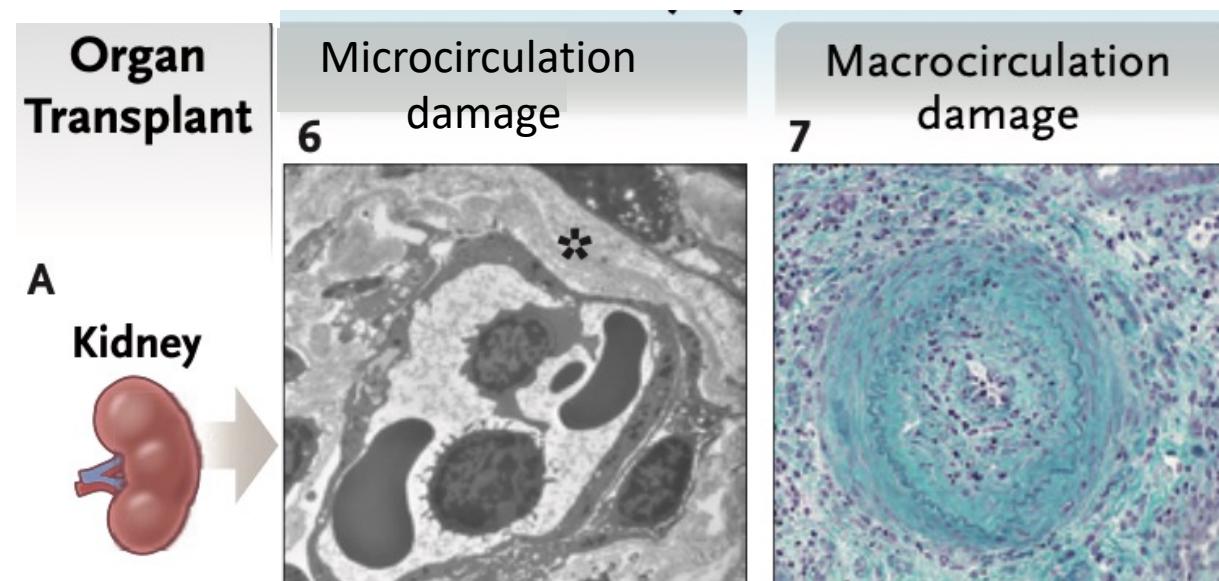
Eculizumab è un anticorpo umanizzato specifico per il C5 del complemento.

Questo anticorpo blocca il taglio del C5 e viene utilizzato nel trattamento del rigetto acuto del trapianto mediato da anticorpi.



## Rigetto cronico mediato da anticorpi (CARM)

Dati recenti indicano che una parte dei rigetti cronici potrebbe essere mediata dagli anticorpi anti donatore (DSA, donor specific antibodies). Anticorpi anti-HLA sono comunemente presenti nei pazienti sottoposti a trapianto (21% trapianto di reni, 14-23% trapianto di cuore, fegato o polmone). L'analisi dopo 5 anni dal trapianto degli anticorpi anti donatore ha dimostrato che i DSA sono presenti nel 51% degli individui che mostravano rigetto e nel 2% dei pazienti stabili. In generale la presenza di anticorpi contro gli antigeni HLA del donatore precede il rigetto del trapianto nel 60% dei casi. Le caratteristiche della glomerulopatia del CARM nel trapianto di rene includono: duplicazione della membrana basale glomerulare (glomerulopatia), proliferazione dell'intima delle arterie e infiltrato di macrofagi.



## **Test clinici per ridurre il rischio di rigetto del trapianto**

Tipizzazione di gruppo sanguigno: test eseguito in tutti i trapianti perché l'incompatibilità ABO rappresenta una barriera al successo del trapianto .

Tipizzazione HLA: la tipizzazione HLA si concentra sulle molecola HLA-A, -B, DR. La tipizzazione è stata basata su test sierologici. Tale tecnica è stata successivamente sostituita dalla PCR.

Screening per la presenza di anticorpi preformati: verifica della presenza di anticorpi reattivi con molecole HLA allogeniche.

## Trapianto di midollo osseo

Dal 1980 il trapianto di midollo osseo è stato adottato nella terapia di diverse patologie ematologiche e non.

Questo trapianto è usato in clinica per:

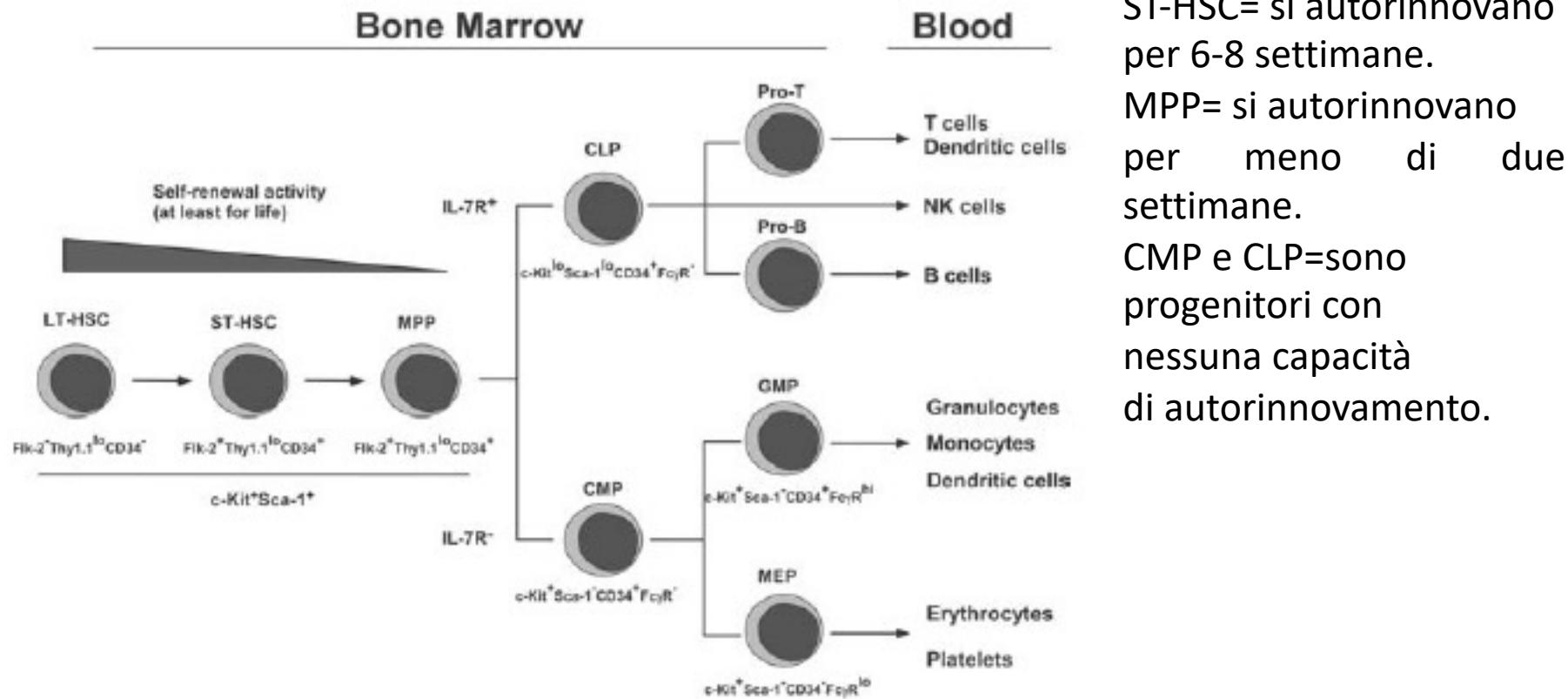
- trattare malattie genetiche in cui la funzionalità di cellule di derivazione ematopoietica è compromessa (immunodeficienze, β-talassemia)
- trattamento di leucemie (leucemia mieloide acuta, leucemia linfoide acuta)

L'efficacia terapeutica del trapianto di midollo osseo nei tumori ematologici risiede nell'effetto citoriduttivo della chemio-radioterapia e nell'effetto graft versus tumor mediato dalle cellule immunocompetenti del trapianto contro le cellule tumorali del ricevente. Nel trattamento delle malattie non maligne l'efficacia terapeutica risiede nella sostituzione del midollo malato con uno sano.

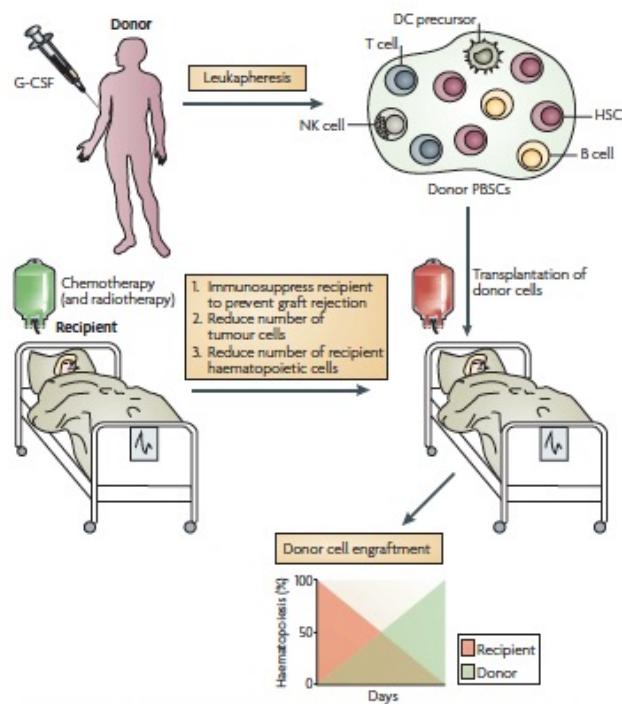
## Trapianto di midollo osseo

Il trapianto di midollo osseo si effettua aspirando il midollo da un donatore e iniettandolo per via endovenosa nel ricevente ( $10^9$  cellule per Kg). L'esito del trapianto di midollo è più sensibile alle differenze nelle molecole HLA rispetto al trapianto di organo solido. Il trapianto di midollo può essere autologo o allogenico. Le cellule staminali ematopoietiche sono responsabili della ricostituzione del sistema ematopoietico del ricevente. Prima che il trapianto possa essere effettuato il midollo del ricevente deve essere eliminato con un trattamento radiante o chemioterapico in modo da liberare le nicchie midollari e favorire l'attecchimento del trapianto.

## Le cellule staminali ematopoietiche sono responsabili dello sviluppo, del mantenimento e della rigenerazione delle cellule del sangue.



Le cellule staminali ematopoietiche sono in grado a livello di singola cellula di rinnovare nuove cellule staminali e di generare una progenie che differenzia nei diversi elementi del sangue.



**Figure 1 | Allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation.** Donors receive granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) to mobilize haematopoietic stem cells (HSCs), which are collected by leukapheresis. Patients (recipients) receive chemotherapy (and radiotherapy), which is designed to prevent immunological graft rejection, reduce the number of tumour cells (when the allogeneic stem-cell transplantation (SCT) is used to treat cancer) and to create niches for HSC engraftment. The leukapheresis product (peripheral-blood stem cells (PBSCs)) is then infused intravenously into the recipient. Engraftment of donor neutrophils and platelets typically occurs between 10 and 20 days post-transplantation, but engraftment of other cell lineages, such as T cells, B cells, macrophages, dendritic cells (DCs), Langerhans cells and erythroid cells, may take longer. When conditioning regimens are of lower intensity (for example low-dose irradiation), patients can remain as mixed donor-recipient chimaeras for months, and donor leukocyte infusions may be required to convert this mixed chimerism to a full donor chimerism. NK, natural killer.

Inizialmente le cellule staminali ematopoietiche erano trasferite a partire dal midollo osseo, successivamente tali cellule sono state ottenute a partire da:

Sangue periferico di donatori dopo trattamento con fattori stimolanti le colonie (G-CSF)

Cellule di cordone ombelicale

Il trapianto di midollo è spesso associato a:

**Rigetto del trapianto contro l'ospite**  
(graft versus host disease)

immunodeficienza

# Graft versus host disease

La GVHD è causata dalla reazione dei linfociti T allogenici (appartenenti ad un altro individuo) presenti nell'inoculo midollare contro gli antigeni dell'ospite.

Clinicamente si può presentare in forma acuta o cronica.

La GVHD acuta è caratterizzata da morte delle cellule epiteliali della pelle, del tratto gastrointestinale, del fegato. Inizialmente era stata classificata in base al periodo di insorgenza (prima di 100 giorni dal trapianto). Può essere classificata in 4 stadi in base della gravità.

## Panel 2: Chronic GVHD symptoms

- Skin**  
Dyspigmentation, new-onset alopecia, poikiloderma, lichen planus-like eruptions, or sclerotic features
- Nails**  
Nail dystrophy or loss
- Mouth**  
Xerostomia, ulcers, lichen-type features, restrictions of mouth opening from sclerosis
- Eyes**  
Dry eyes, sicca syndrome, cicatricial conjunctivitis
- Muscles, fascia, Joints**  
Fascitis, myositis, or joint stiffness from contractures
- Female genitalia**  
Vaginal sclerosis, ulcerations
- Gastrointestinal tract**  
Anorexia, weight loss, oesophageal web or strictures
- Liver**  
Jaundice, transaminitis
- Lungs**  
Restrictive or obstructive defects on pulmonary function tests, bronchiolitis obliterans, pleural effusions
- Kidneys**  
Nephrotic syndrome (rare)
- Heart**  
Pericarditis
- Marrow**  
Thrombocytopenia, anaemia, neutropenia

## Panel 1: Acute GVHD symptoms

### Skin

- Maculopapular skin rash

### Upper gastrointestinal tract

- Nausea, anorexia, or both, and positive histological findings

### Lower gastrointestinal tract

- Watery diarrhoea ( $\geq 500$  mL)
- Severe abdominal pain
- Bloody diarrhoea or ileus (after exclusion of infectious causes)

### Liver

- Cholestatic hyperbilirubinaemia

La GVHD cronica può insorgere dopo una GVHD acuta o *de novo* è caratterizzata da fibrosi e atrofia di diversi organi e nella forma più grave porta all'insufficienza funzionale dell'organo e può essere fatale.

## **Patofisiologia della reazione del trapianto contro l'ospite**

50 anni fa Billingham definisce il GVHD come una sindrome in cui le cellule immunocompetenti del donatore riconoscono e attaccano i tessuti del ricevente e formula le tre condizioni necessarie affinchè la GVHD possa insorgere:

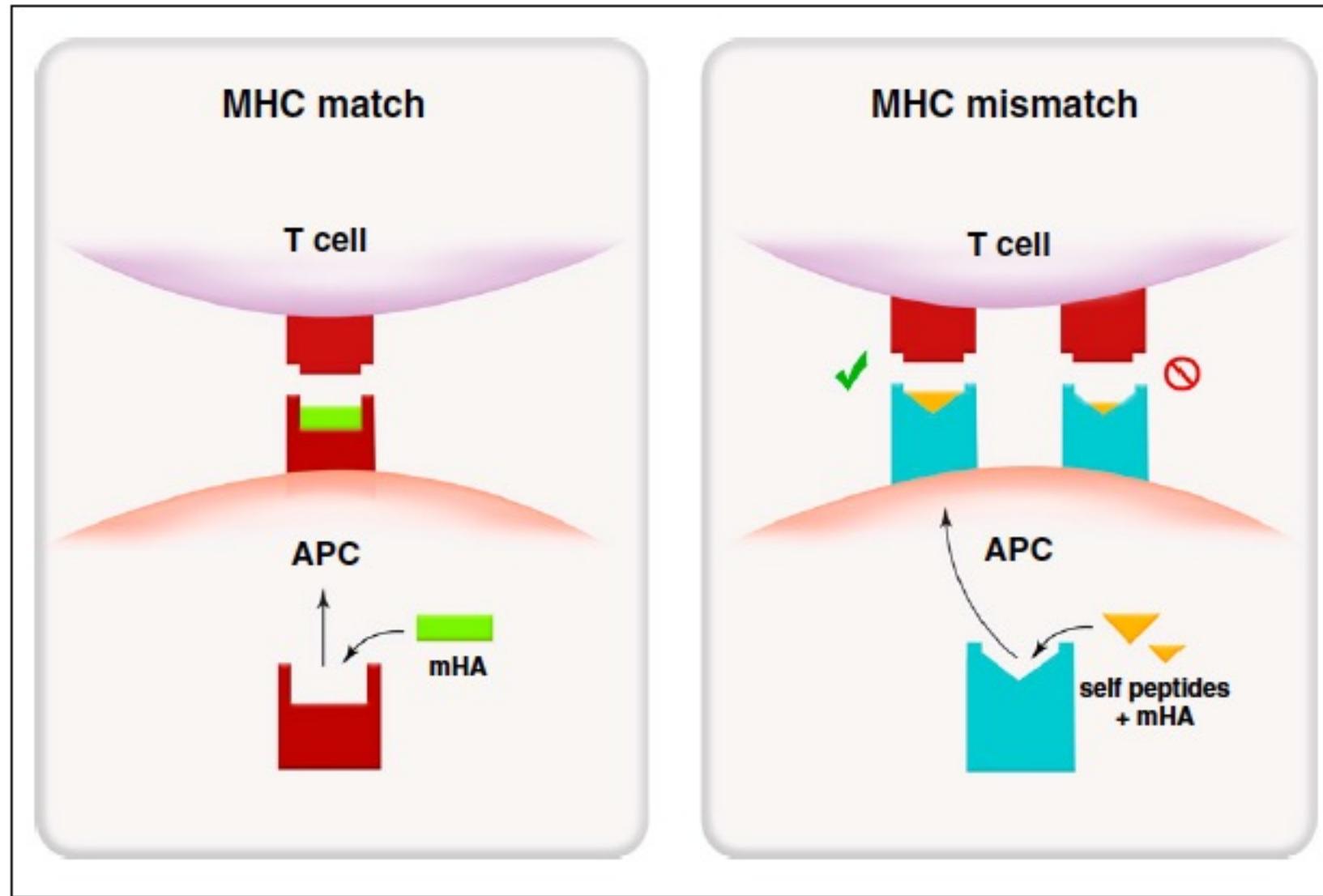
1. Il trapianto doveva contenere cellule immunologicamente competenti
2. Il ricevente doveva esprimere antigeni tissutali diversi da quelli del donatore
3. Il ricevente non doveva essere in grado di montare una effettiva risposta immune contro il donatore

Oggi sappiamo che le cellule immunologicamente competenti sono i linfociti T e che la GVHD può insorgere quando tessuti che contengono cellule T sono trasferiti in un individuo che non è in grado di eliminare tali cellule.

## Cause dell'insorgenza di GVHD

- ❖ La GVHD insorge quando le cellule T del donatore riconoscono antigeni sulle cellule del ricevente.
- ❖ Gli antigeni maggiormente responsabili della GVHD sono gli antigeni HLA.
- ❖ Idealmente il ricevente e il donatore dovrebbero avere in comune gli stessi alleli delle molecole HLA di classe I (A,B,C) e di classe II (DR).
- ❖ L'incidenza di reazioni GVHD è direttamente correlata al grado di mismatch fra le molecole HLA espresse dal donatore e dal ricevente
- ❖ Malgrado l'identità nelle molecole HLA il 40% dei pazienti sviluppa GVHD

## Riconoscimento degli alloantigeni nel trapianto di midollo MHC matched o non-matched



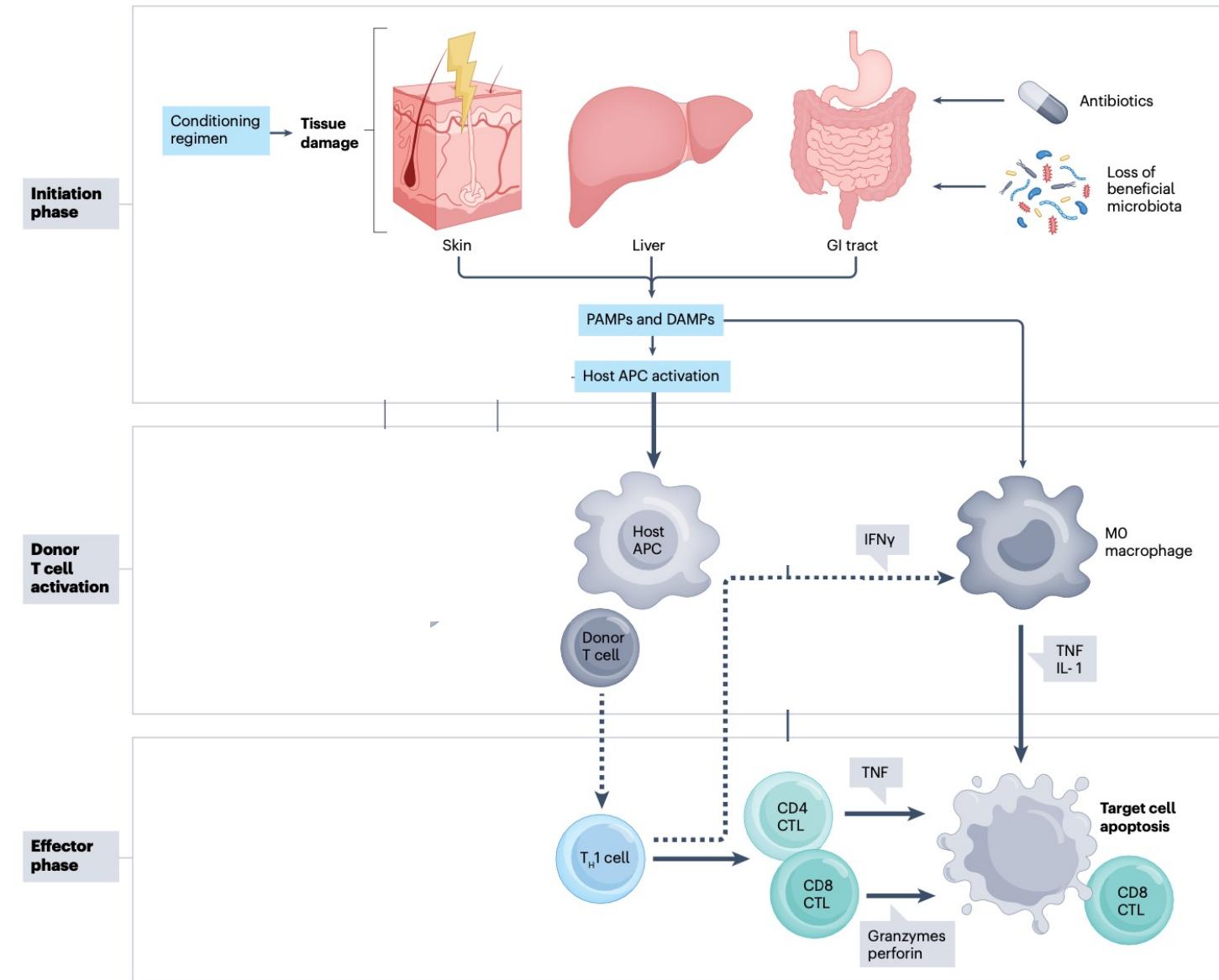
# 3 fasi che caratterizzano il GVHD acuto

Il GVHD acuto avviene in tre fasi:

i) **Iniziazione.** Il regime di condizionamento (chemioterapia e radioterapia) causa il danno tissutale che favorisce il rilascio di citochine infiammatorie e determina l'attivazione delle APC del ricevente.

ii) **Attivazione e differenziamento** dei linfociti T del donatore

iii) **Fase effettrice.** Questa fase è caratterizzata dall'apoptosi delle cellule tissutali mediata dalle citochine e dai linfociti T e le cellule Natural Killer.



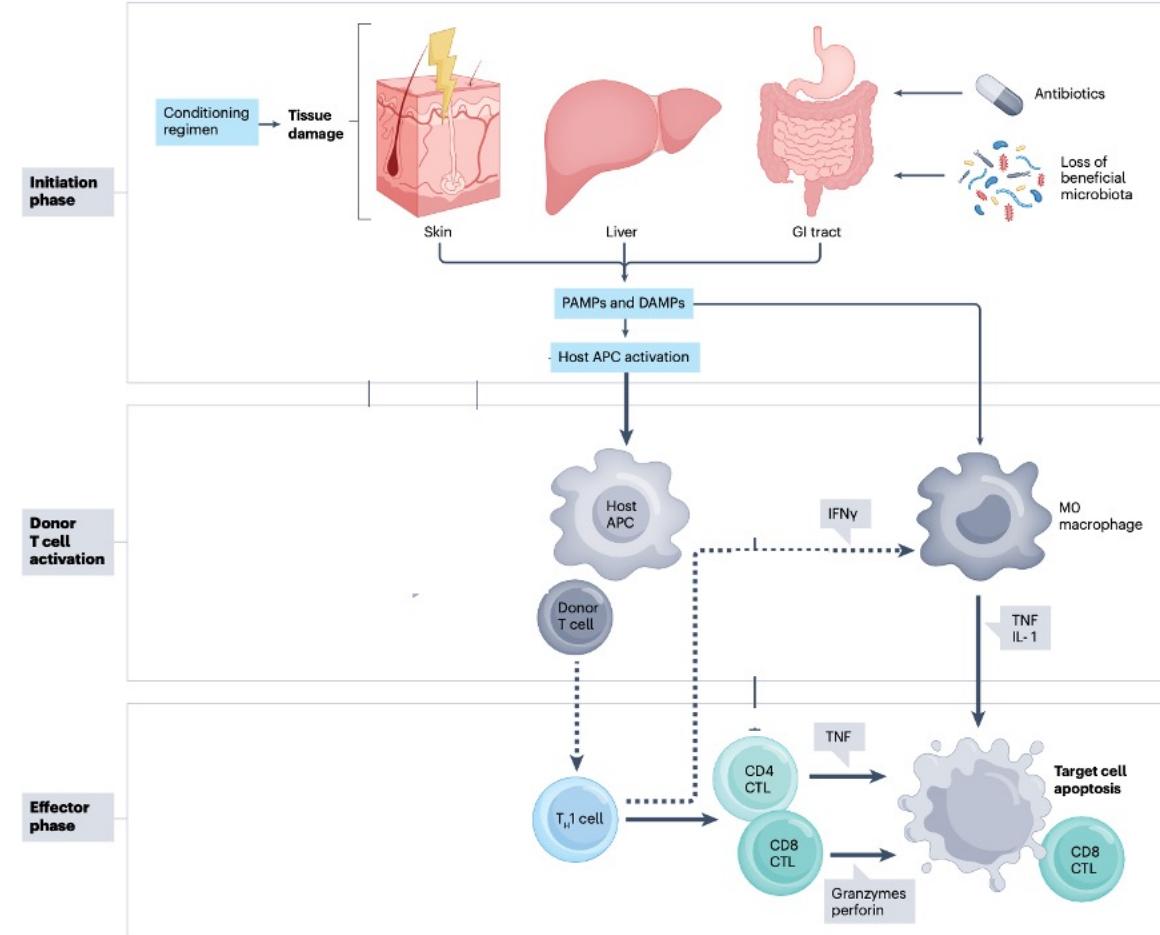
### 3 fasi che caratterizzano il GVHD acuto

Il GVHD acuto avviene in tre fasi:

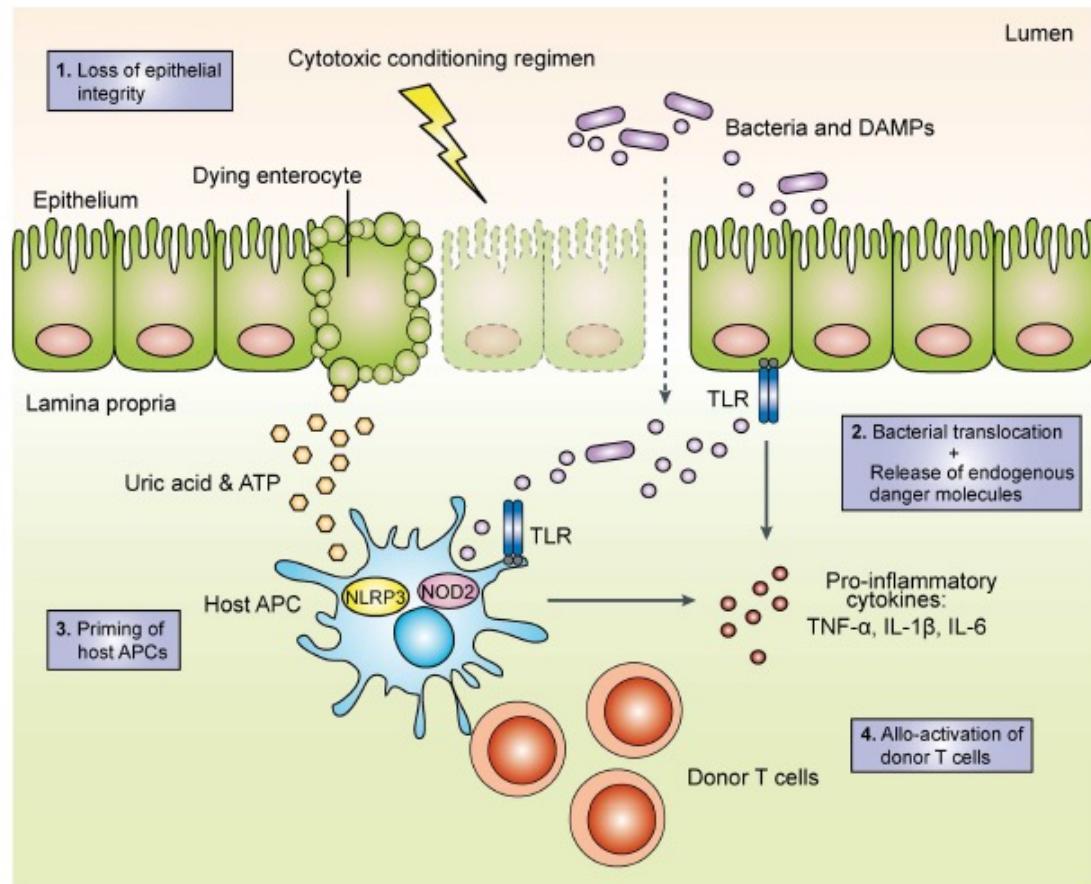
i) **Iniziazione.** Il regime di condizionamento (chemioterapia e radioterapia) causa il danno tissutale che favorisce il rilascio di citochine infiammatorie e determina l'attivazione delle APC del ricevente.

ii) **Attivazione e differenziamento** dei linfociti T del donatore

iii) **Fase effettrice.** Questa fase è caratterizzata dall'apoptosi delle cellule tissutali mediata dalle citochine e dai linfociti T e le cellule Natural Killer.



# Iniziazione



**FIGURE 1 | Schematic overview of the initiation phase of acute graft-versus-host disease.** During the toxic conditioning regimen with total-body irradiation and/or chemotherapy, the destruction of intestinal epithelial cells leads to the loss of the epithelial barrier function. The subsequent translocation of luminal bacteria as well as the release of endogenous danger molecules such as adenosine triphosphate (ATP) and uric acid result in the

production of pro-inflammatory cytokines. Activated host and/or donor antigen-presenting cells then prime allo-reactive donor T cells, which perpetuate acute GVHD. TLR, toll-like receptor; APC, antigen-presenting cell; DAMP, danger-associated molecular pattern; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; NOD2, nucleotide-binding oligomerization domain; NLRP3, NACHT, LRR, and PYD domains-containing protein 3.

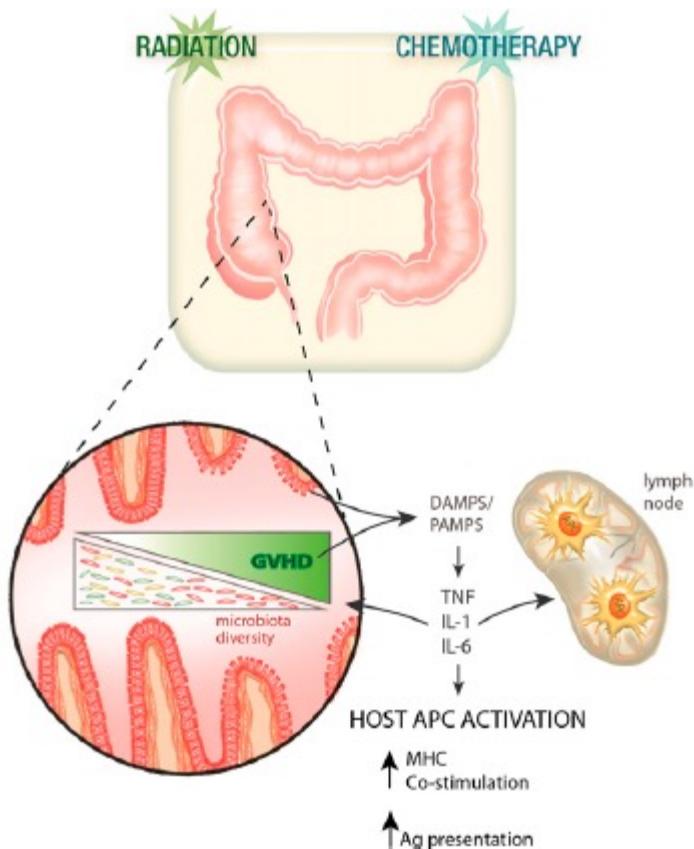
Prima dell'HSCT i riceventi il trapianto sono sottoposti a regimi di condizionamento (chemioterapia e radioterapia) che sono mielosoppressivi (deplezione delle cellule staminali del ricevente) e immunosoppressivi (limitare il rigetto del trapianto da parte del ricevente). L'intensità di tali trattamenti è importante per determinare i tempi di insorgenza e le caratteristiche del GVHD.

Il danno dei tessuti indotto dalla radio- e chemioterapia causa il rilascio di DAMPs (damage associated molecular patterns) e altera la barriera epiteliale dell'intestino favorendo il passaggio di molecole di origine microbica (batteri, funghi e virus) nella mucosa.

Il regime di condizionamento altera anche il microbiota intestinale alterando l'equilibrio degli epitelii.

Nei tessuti e nei linfonodi i **DAMPs e PAMPs** (pathogen associated molecular patterns) attivano le cellule dendritiche, i macrofagi e le cellule epiteliali attraverso la stimolazione dei TLR. Queste cellule produrranno citochine pro-infiammatorie quali TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6.

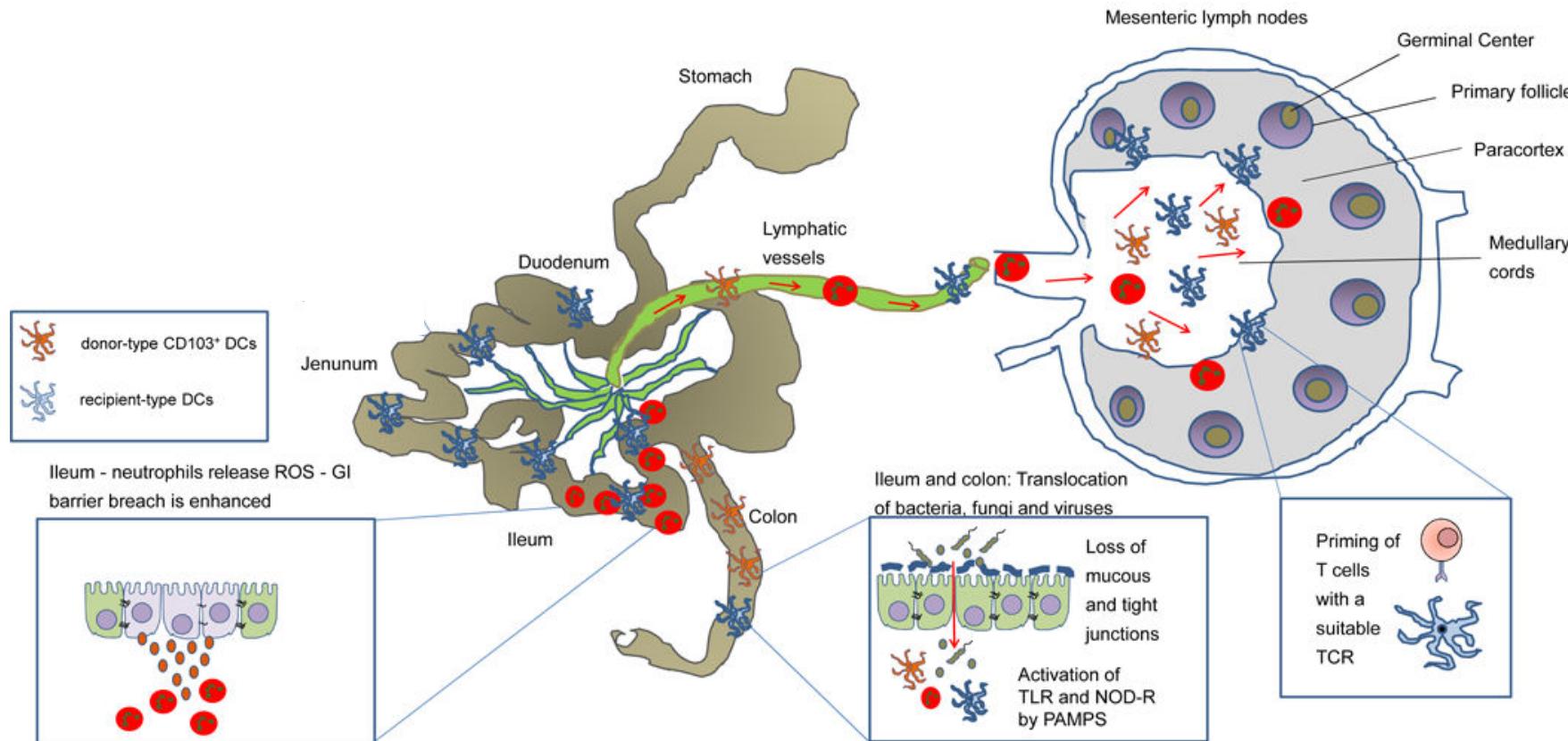
# Regime di condizionamento e l'infiammazione associata



**Figure 1. GVHD pathophysiology phase 1: transplant conditioning and inflammation.** Following conditioning (radiation and/or chemotherapy), the integrity of the GI mucosa becomes compromised allowing the release of DAMPS and PAMPS, which in turn promote the production of proinflammatory cytokines from recipient cells. These cytokines contribute to host APC (hematopoietic and nonhematopoietic) activation in the gut and lymphoid tissue. GVHD impacts on the gut microbiota, reducing its diversity with a loss of enteric commensal organisms and an outgrowth of pathogenic microbes that further exacerbates the pathological DAMP/PAMP cascade.

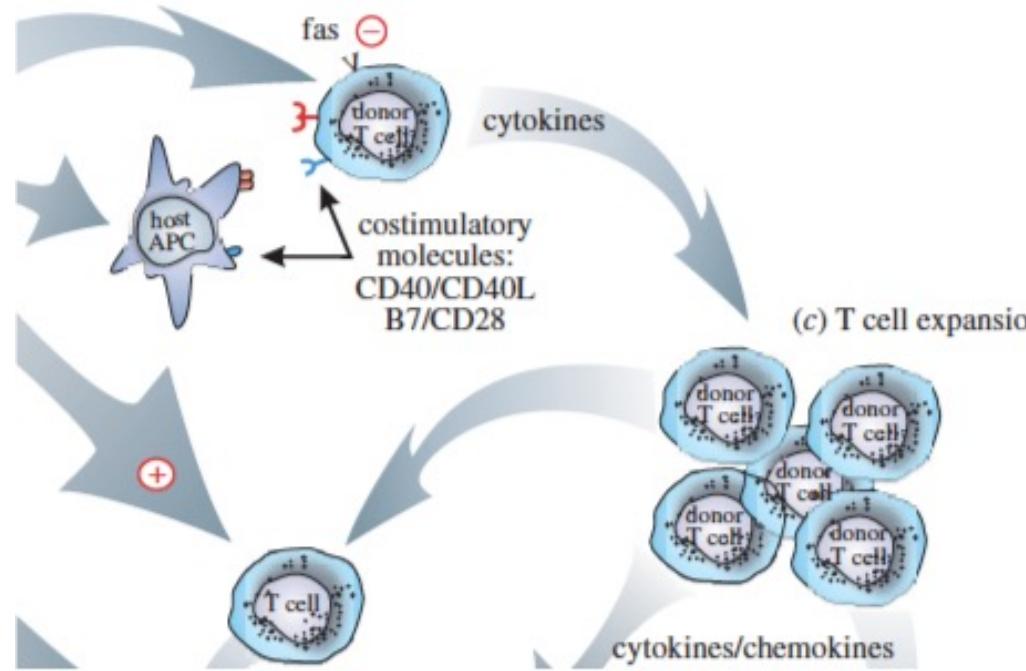
Molti gruppi hanno dimostrato che l'intensità di tali trattamenti determina danni dei tessuti dell'ospite es: l'integrità della mucosa gastrointestinale e il successivo passaggio di LPS e altri DAMPs/PAMPS nella mucosa intestinale e nei linfonodi del ricevente.

## Fase di inizio e fase di attivazione del GVHD acuto



PAMPs derivati dai microrganismi che invadono la barriera intestinale attivano le cellule dell'immunità innata incluse le dendritiche che migrano dall'intestino danneggiato ai linfonodi dove attiveranno i linfociti T alloreattivi del donatore.

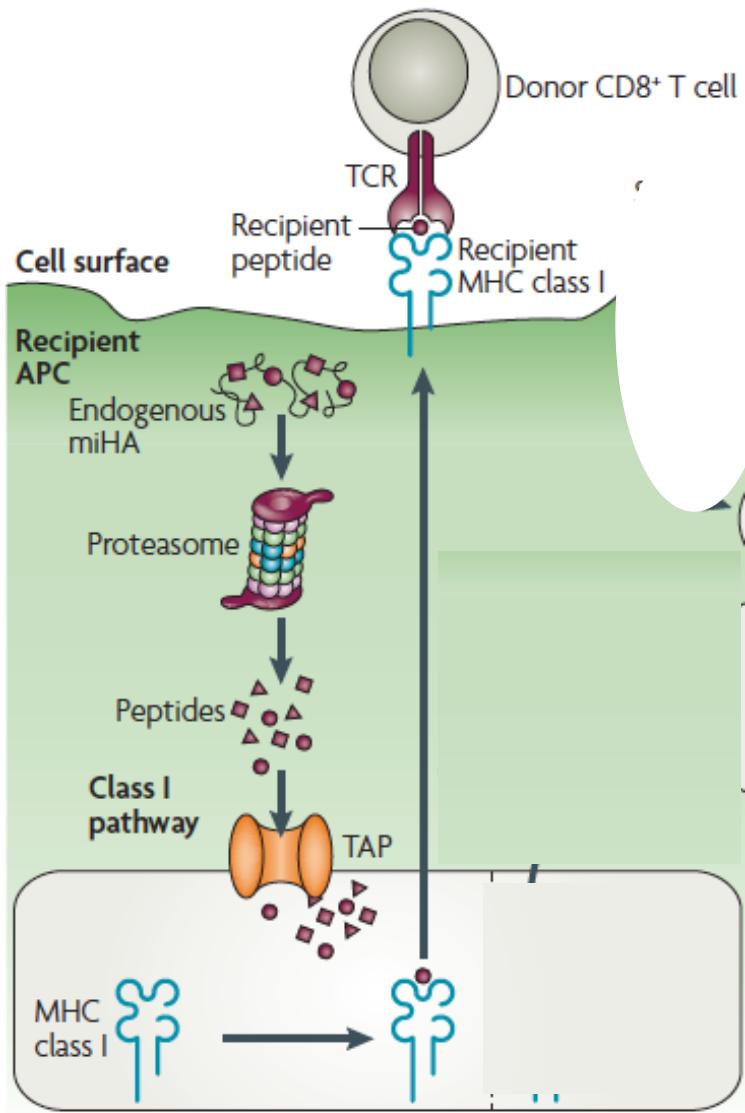
## Fase 2 attivazione e differenziamento dei linfociti T alloreattivi del donatore



Il priming e l'attivazione dei linfociti T alloreattivi del donatore caratterizzano la fase 2 del GVHD. Studi nel modello murino suggeriscono che i linfociti T CD8+ del donatore sono attivati al livello dei linfonodi dalle cellule presentanti l'antigene del ricevente. Diversamente i linfociti T CD4+ possono anche essere attivati dalle cellule del ricevente di origine non ematopoiteica nel tratto gastrointestinale in grado di presentare l'antigene. Queste cellule includono le cellule epiteliali ed endoteliali.

# Priming dei linfociti T CD8+ nel GVHD

## a Initiation phase of GVHD

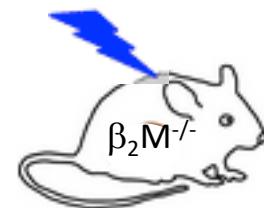


Nel modello murino di trapianto di midollo allogenico identico per le molecole MHC di classe I è stato dimostrato che il trasferimento di midollo e di linfociti T citotossici specifici per l'MHC di classe I e peptidi di antigeni minori di istocompatibilità (mHA) non induce GVHD se le cellule dendritiche del ricevente non esprimono molecole MHC di classe I → Il GVHD mediato dalle cellule T CD8+ richiede la presenza delle APC di origine ematopoietica del ricevente.

# Ruolo delle APC dell'ospite o del donatore per l'inizio e il mantenimento del GVHD



Topo C6 (H-2b) irradiato e ricostituito con midollo osseo di topo C6  $\beta_2M^{-/-}$



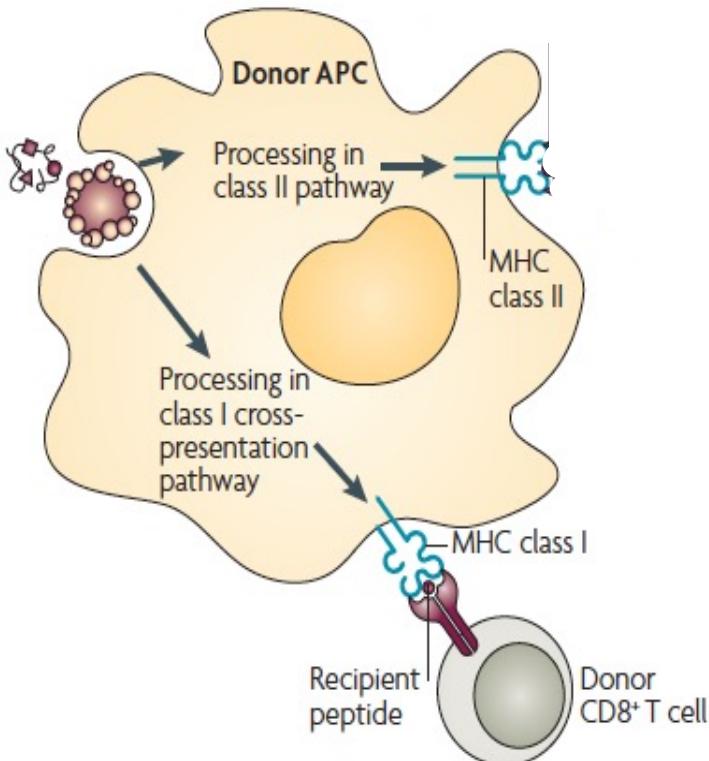
Irradiato e trapiantato (ricostituit) con midollo osseo di topo C3H.SW (H-2b) e linfociti T CD8+.



Non sviluppano o sviluppano una forma lieve di GVHD

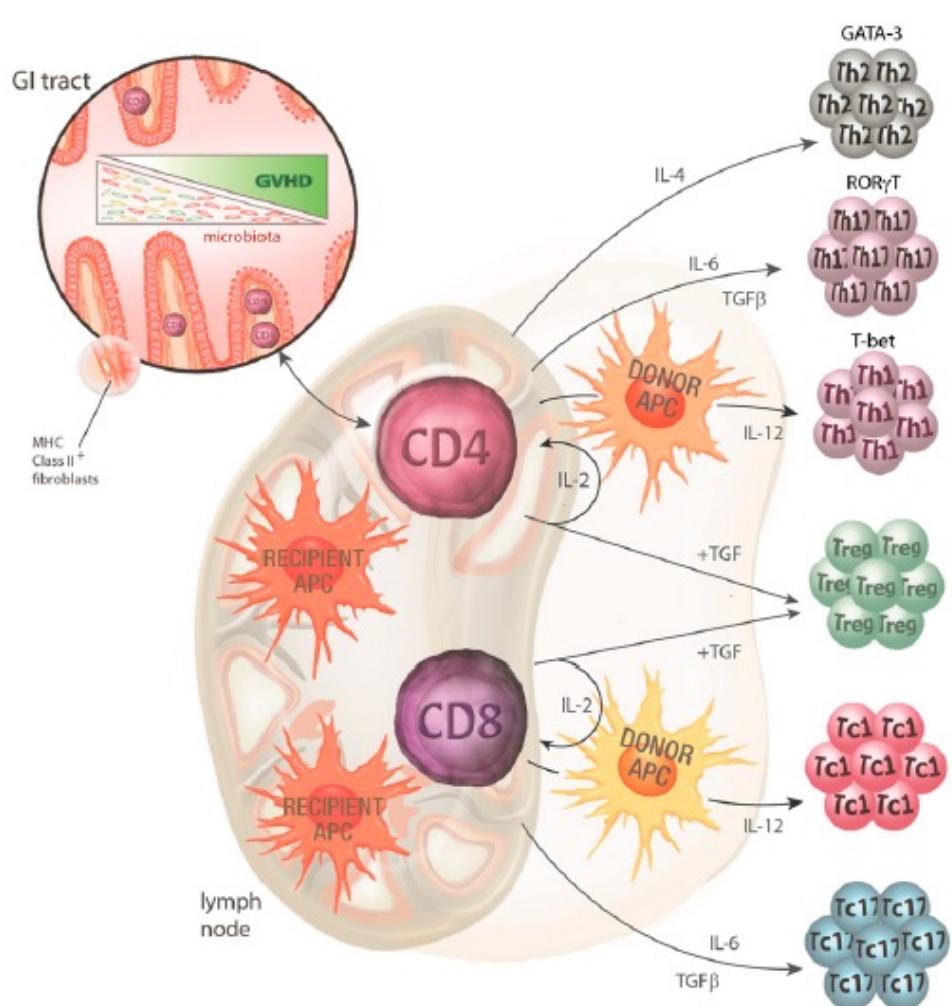
Per verificare quali APC (donatore o ricevente) fossero responsabili dell'attivazione delle cellule T alloreattive in grado di mediare il graft versus host disease sono stati generati topi le cui APC non esprimevano le molecole MHC di classe I. Per questo sono stati generati topi chimerici mediante trapianto di midollo da topi  $\beta_2$ microglubulina deficienti ( $\beta_2M^{-/-}$ ). I topi ottenuti sono stati trapiantati con midollo osseo di un topo normale con lo stesso MHC del ricevente. Modello MHC identico e diverso per gli antigeni minori di istocompatibilità.

# Ruolo delle APC del donatore nel GVHD



Il trapianto di midollo da topi MHC classe I deficienti causa un GVHD meno grave di quello che si manifesta trapiantando midollo che esprime MHC classe I. Le APC del donatore aggravano il GVHD attraverso la cross-presentazione dell'antigene.

## Priming dei linfociti T CD4+ nel GVHD

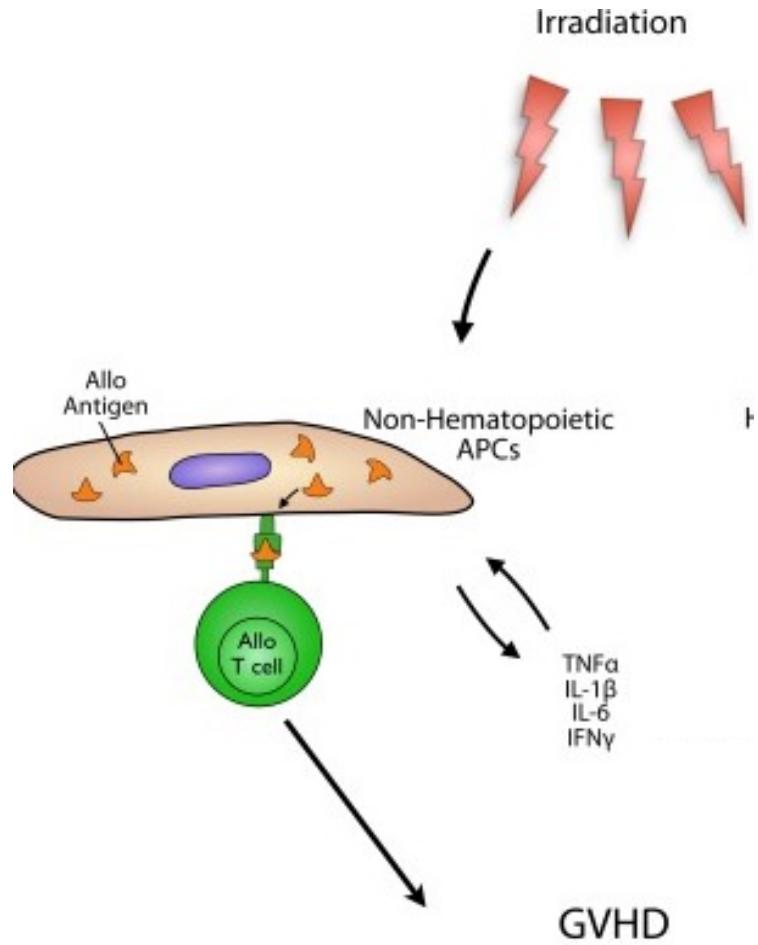


Inizialmente era stato proposto che similmente a quanto osservato per le risposte T CD8+, le DC del ricevente fossero essenziali nell'induzione dei linfociti T CD4+ alloreattivi nel GVHD.

Studi successivi hanno dimostrato che la deplezione delle cellule dendritiche, dei macrofagi e delle cellule B del ricevente non impedivano lo sviluppo del GVHD mediata dai linfociti T CD4+. Modelli di topi transgenici hanno confermato che il GVHD acuto mediato dai linfociti T CD4+ avviene anche in assenza delle DC del ricevente.

Nel caso delle risposte T CD4+ alloreattive, queste cellule sono reclutate nei tessuti infiammati e nei tessuti quali l'intestino possono essere attivate dalle cellule del ricevente di origine non ematopoietica.

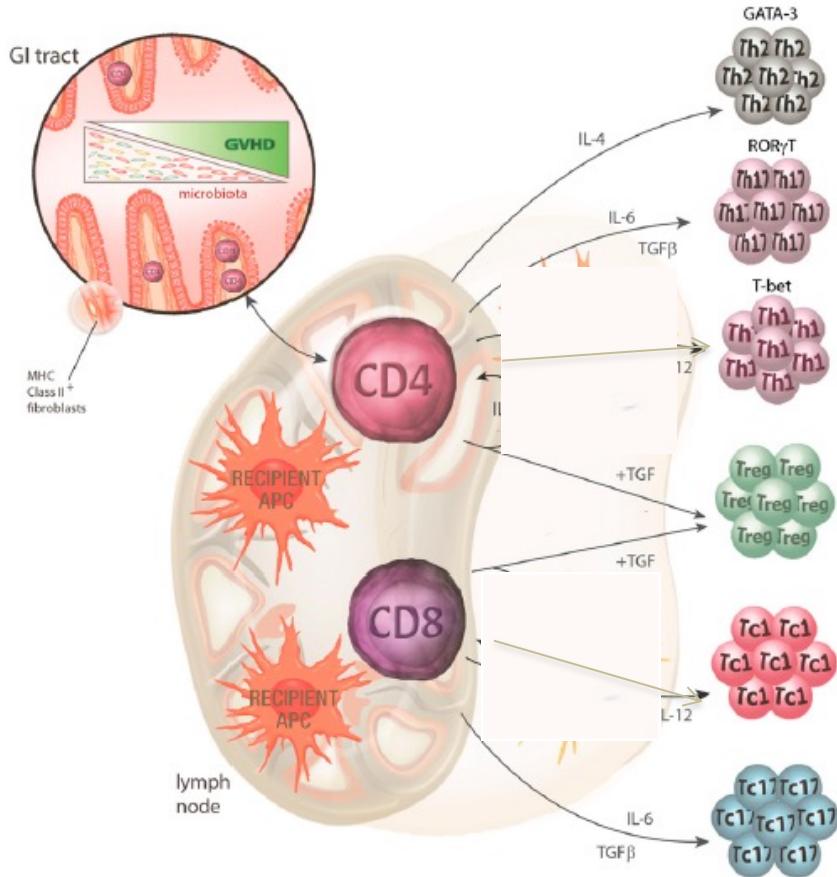
## Il regime di condizionamento induce le cellule del tessuto che non hanno origine dal midollo osseo a acquisire la funzione di cellule presentanti l'antigene



Le cellule del ricevente di origine non ematopoietica una volta attivate dal regime di condizionamento (danno tissutale, azione delle citochine pro-infiammatorie) agiscono da cellule presentanti l'antigene e sono molto efficienti nel dare inizio alla GVHD.

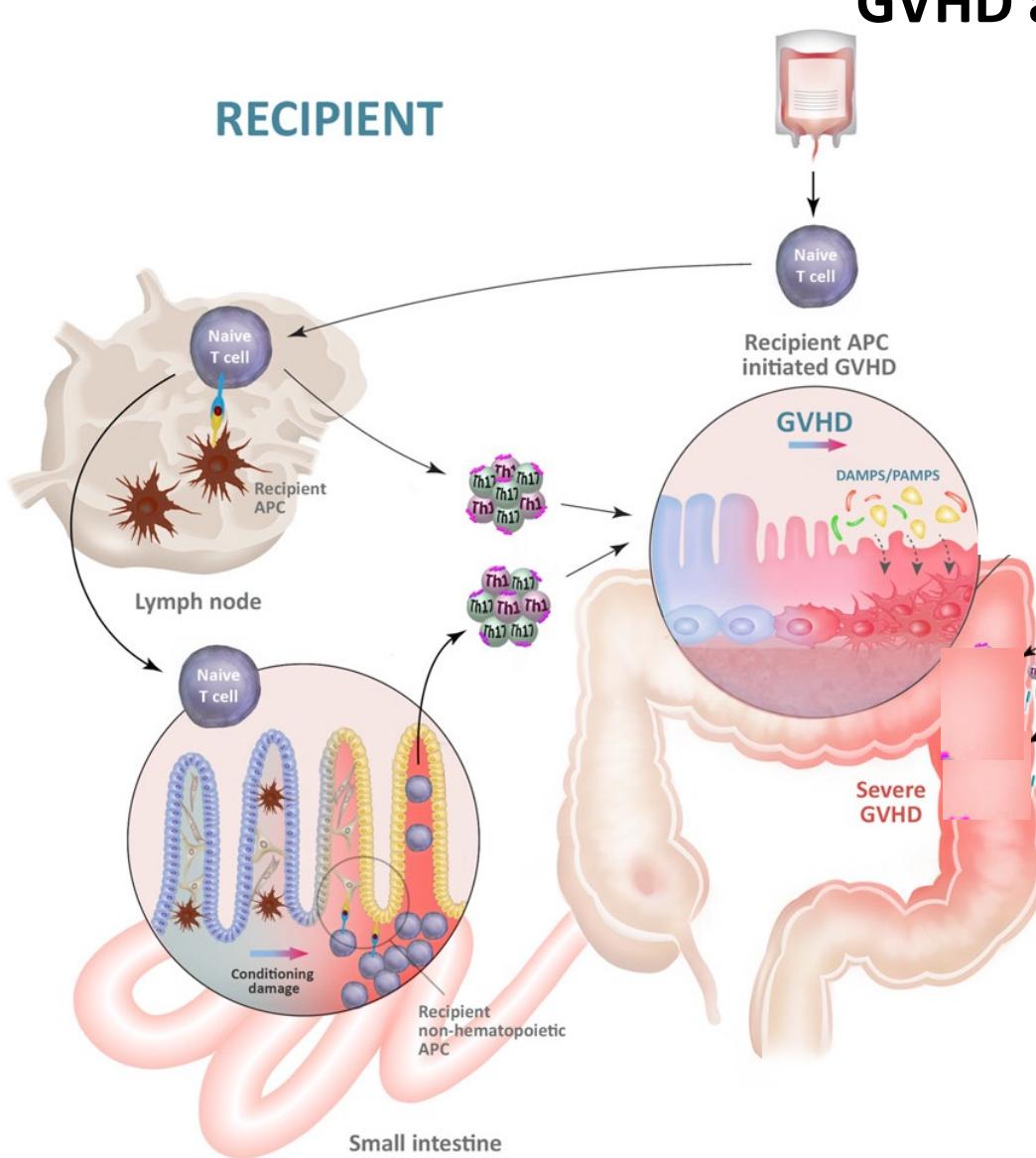
Il condizionamento induce l'espressione delle molecole costimolatorie e delle molecole MHC di classe II nelle cellule di origine non ematopoietica es: . nelle cellule epiteliali l'IFN- $\gamma$  induce l'espressione di MHC di classe II.

# Cellule presentanti l'antigene nel GVHD



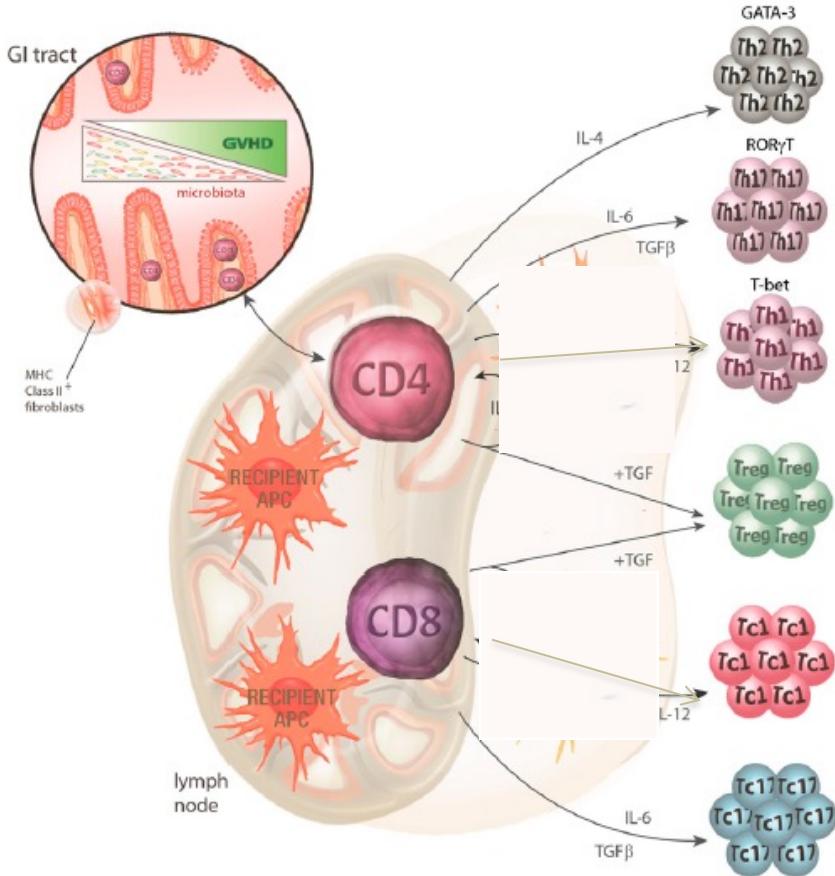
I linfociti T alloreattivi nei linfonodi differenziano in Th1 e nell'intestino proliferano grazie all'interazione con i fibroblasti e le cellule epiteliali che acquisiscono l'espressione delle molecole MHC di classe II. Il GVHD mediato dai linfociti T CD4+ necessita della presentazione dell'antigene da parte di cellule presentanti l'antigene del ricevente di origine non hematopoietica.

# Attivazione delle risposte T CD4+ alloreattive e inizio del GVHD acuto



I linfociti T CD4+ naive che contaminano il trapianto di cellule staminali migrano negli organi linfoidi del ricevente e/o negli organi bersaglio del GVHD, in particolare nell'intestino. I linfociti T incontrano gli alloantigeni presentati dalle APC del ricevente nei linfonodi o dalle APC del ricevente che non hanno origine ematopoietica nel tessuto. Quindi i linfociti T CD4+ proliferano e differenziano in Th1 e in Th17 e inducono GVHD nell'organo.

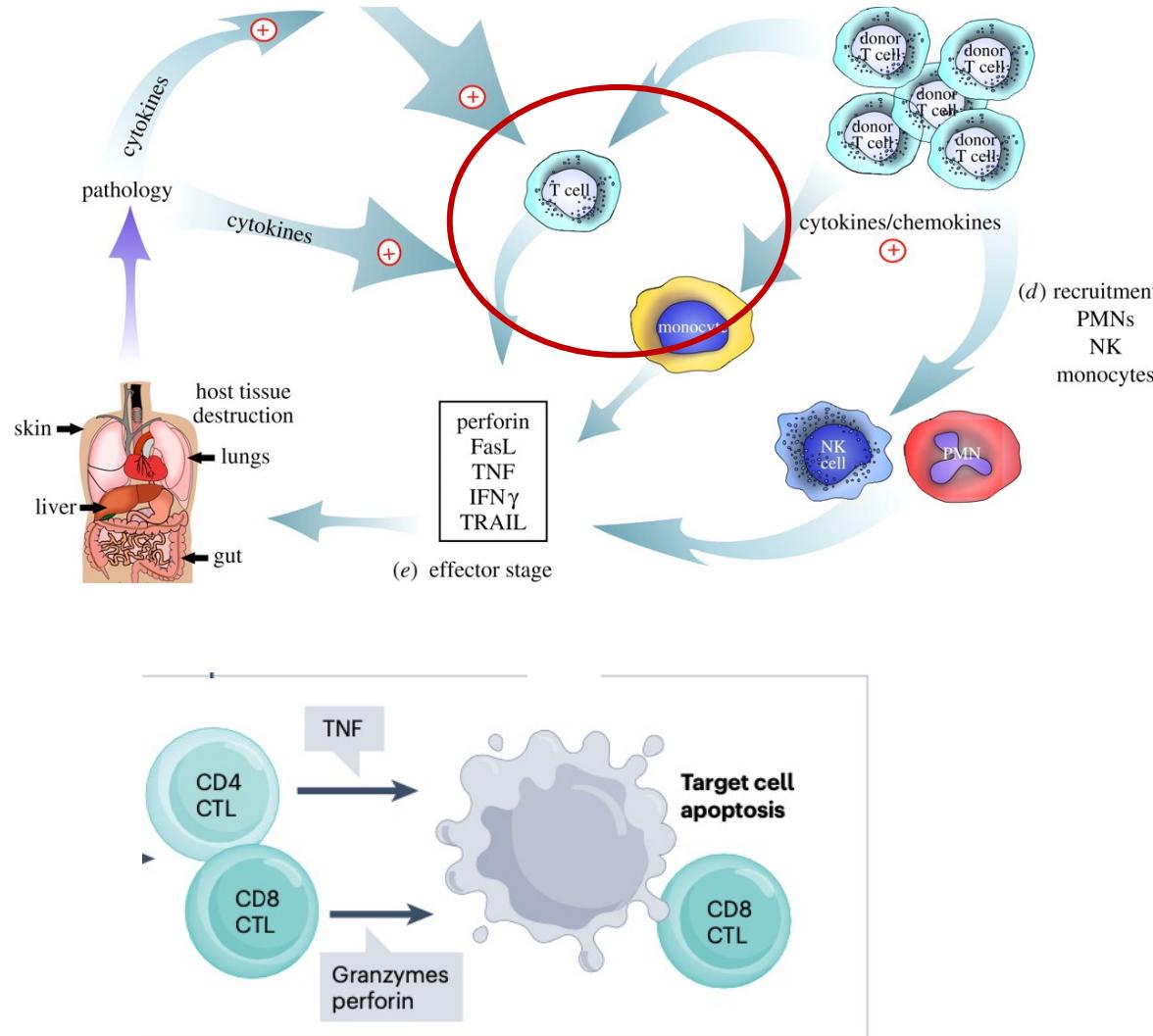
## Fase 2 Espansione e proliferazione delle cellule T del donatore



L'attivazione e il differenziamento delle cellule T naive del donatore mediano la reazione di GVHD acuta.

La reazione GVHD acuta che interessa il tratto gastrointestinale è mediata dai linfociti T CD8+, dai linfociti Th1 e dalle classiche citochine prodotte da queste cellule (IFN $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ).

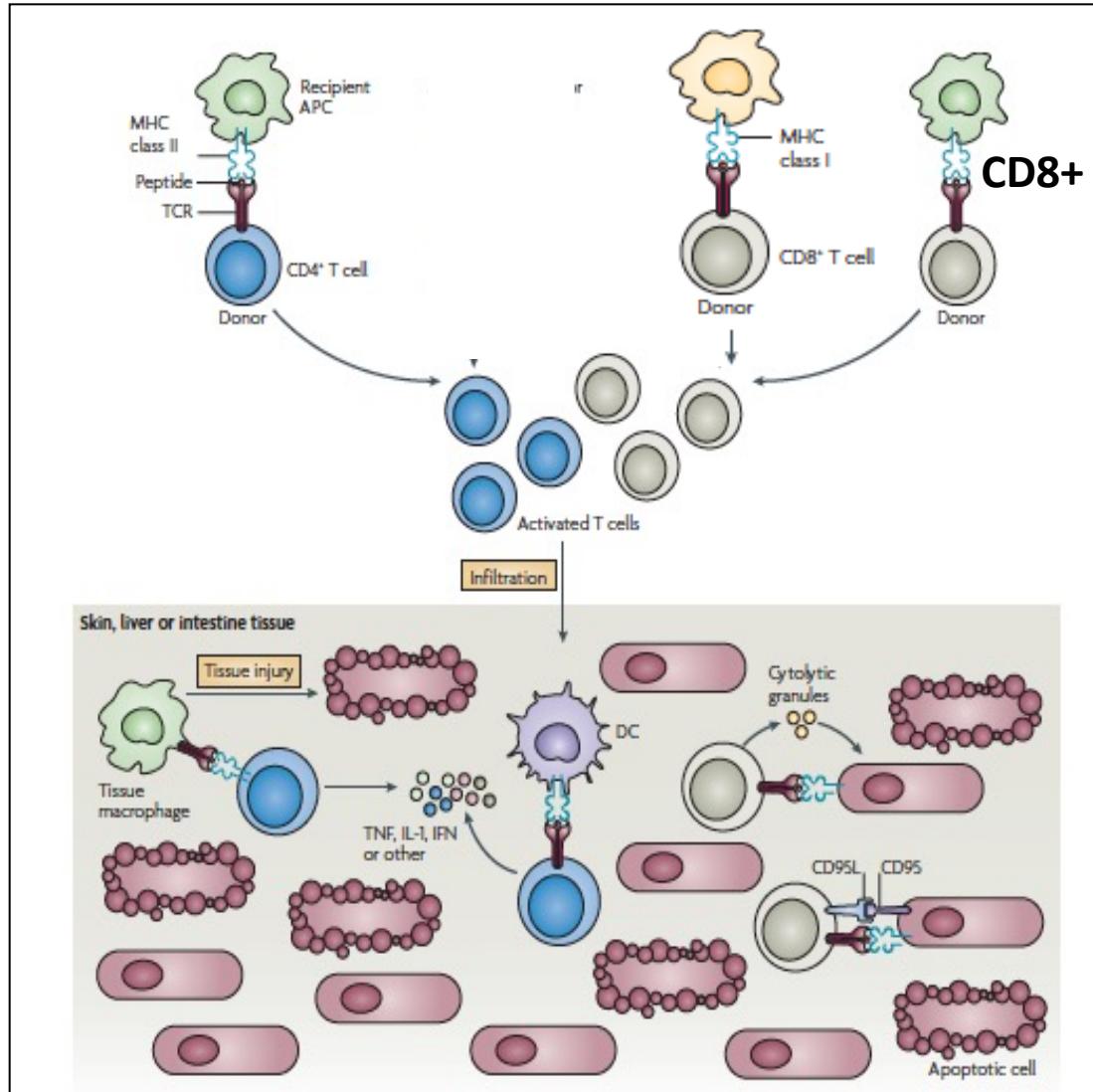
## Fase 3: Fase effettrice



La risposta immune nell' aGVHD è caratterizzata dall'azione citolitica dei linfociti T e delle cellule NK e delle citochine infiammatorie. Il danno tissutale mediato dai linfociti T CD8+ richiede il riconoscimento delle molecole MHC+peptide espresse dal tessuto.

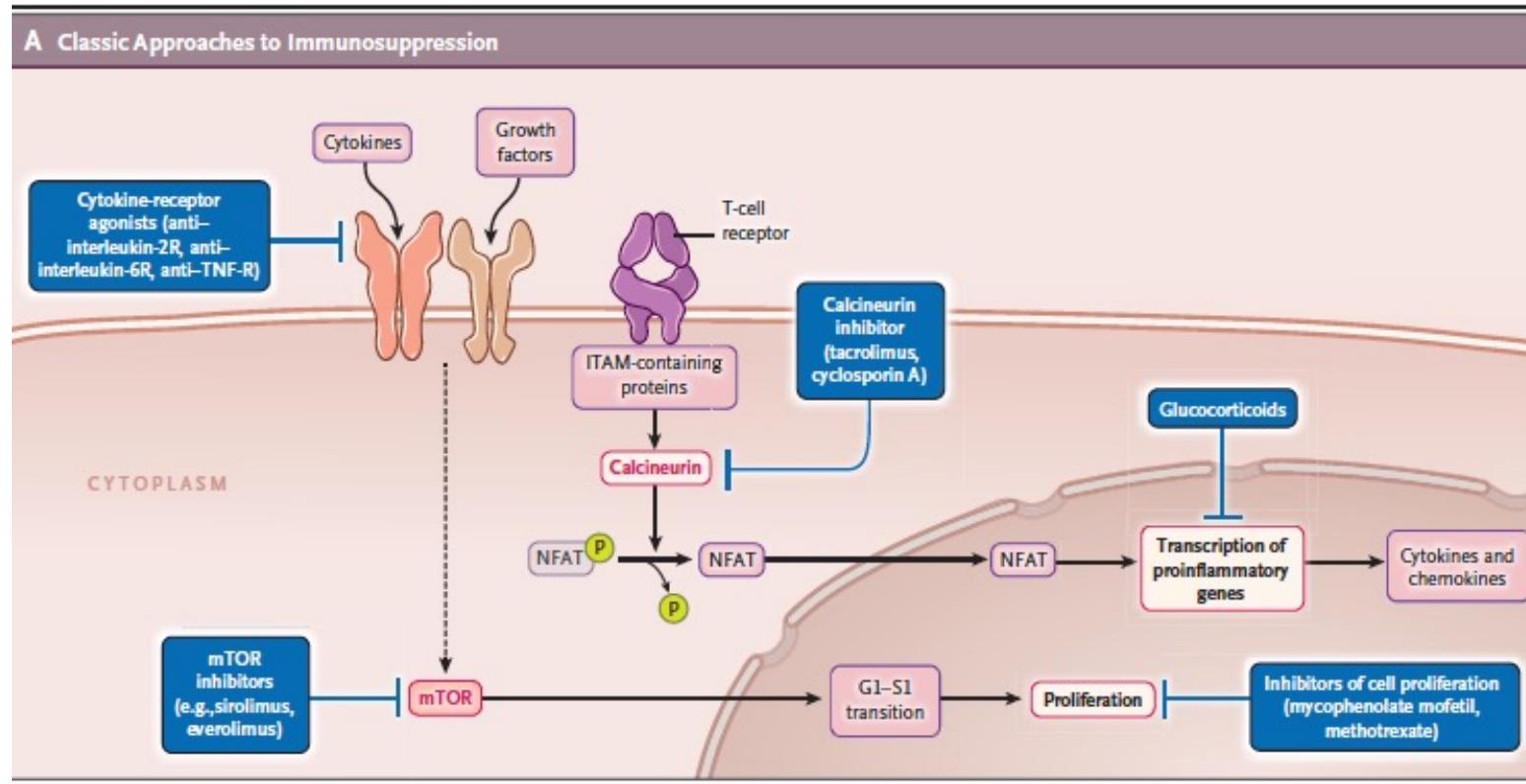
Le citochine prodotte dai linfociti T CD4+ (TNF- $\alpha$  e IL-1) possono indurre la morte delle cellule bersaglio.

## Meccanismi di danno mediati dai linfociti T CD8+ e T CD4+



L'eliminazione delle cellule dei tessuti è mediata dal rilascio di perforine e granzimi o del TNF- $\alpha$  o dall'interazione Fas-FasL da parte dei linfociti T CD8+ che devono riconoscere le molecole MHC del tessuto. I linfociti T CD4+ mediano il danno tissutale attraverso la produzione di TNF- $\alpha$  e IL-1. I linfociti T CD8+ insieme ai linfociti T CD4+ mediano il GVHD.

# Approcci immunosoppressivi nella prevenzione e trattamento del GVHD acuto



## Prevenzione del GVHD

Tra il 1980 e il 1990 numerosi studi clinici hanno valutato la deplezione delle cellule T nella profilassi della GVHD attraverso:

- 1) Deplezione di cellule T dal midollo
- 2) Selezione delle cellule CD34+
- 3) Trattamento con anticorpi anti cellule T in vivo

### Trapianto di cellule staminali

vantaggi: elimina l'insorgenza di reazioni GVHD

svantaggi: fallimento nell'attecchimento del trapianto  
perdita dell'effetto graft versus tumor  
ritardo nella ricostituzione del sistema immune