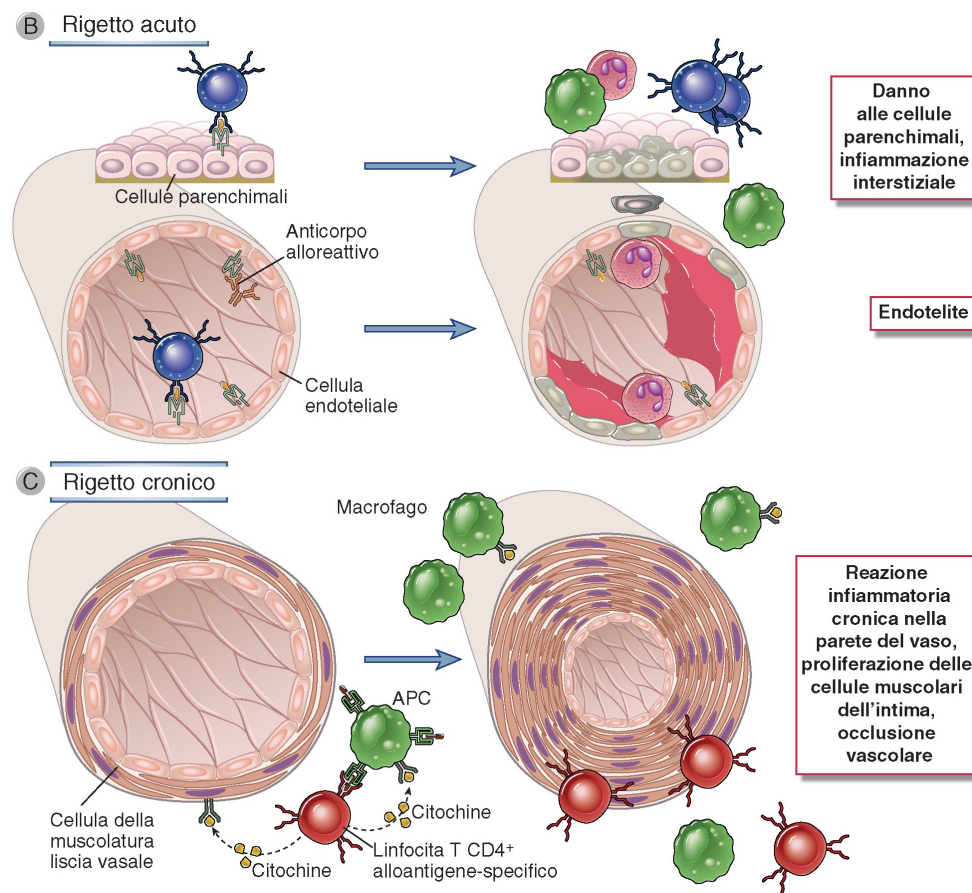


# Meccanismi del rigetto del trapianto mediato dai linfociti T

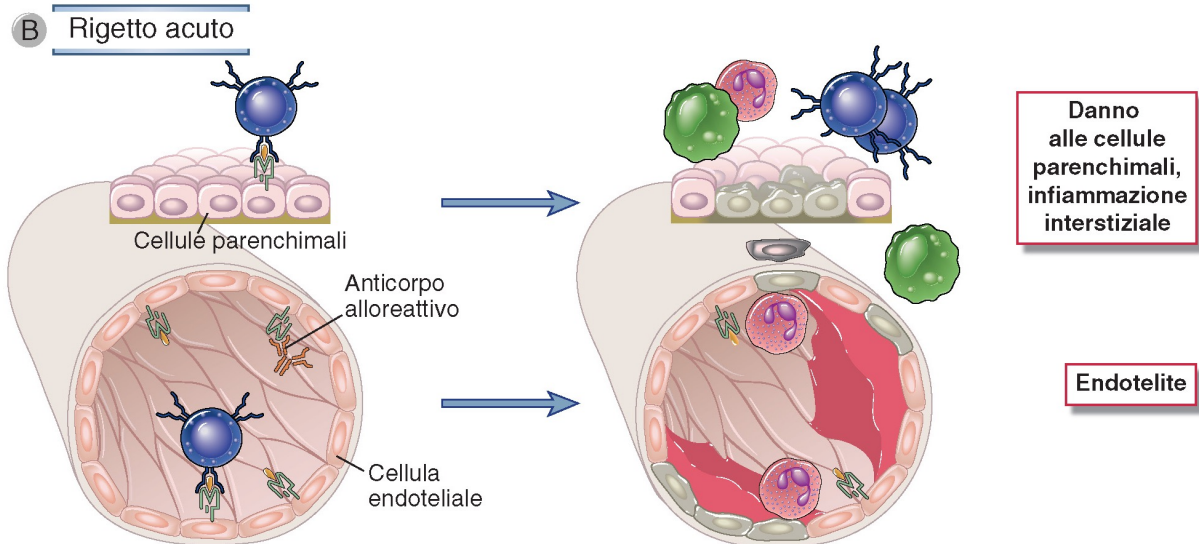
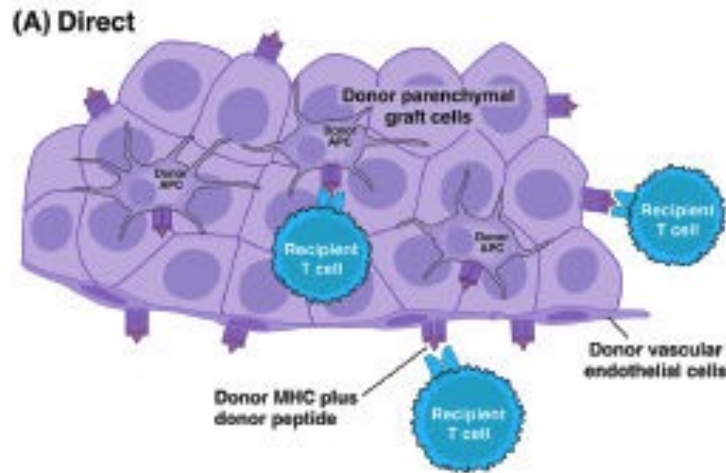


Il rigetto del trapianto mediato dai linfociti T viene classificato in base alle caratteristiche istopatologiche o all'intervallo di tempo che intercorre fra il trapianto e il rigetto.

**Il rigetto acuto** si manifesta generalmente non prima di una settimana dal trapianto ed è la manifestazione di un processo di danno vascolare e parenchimale. Questo rigetto è caratterizzato da infiltrazione leucocitaria del trapianto.

**Il rigetto cronico** è caratterizzato dall'occlusione delle arterie come conseguenza della proliferazione delle cellule muscolari lisce vasali. Questo rigetto si manifesta nei 6-12 mesi successivi al trapianto.

## Meccanismi cellulari del rigetto acuto: ruolo dei linfociti T CD8+ attivati per via diretta



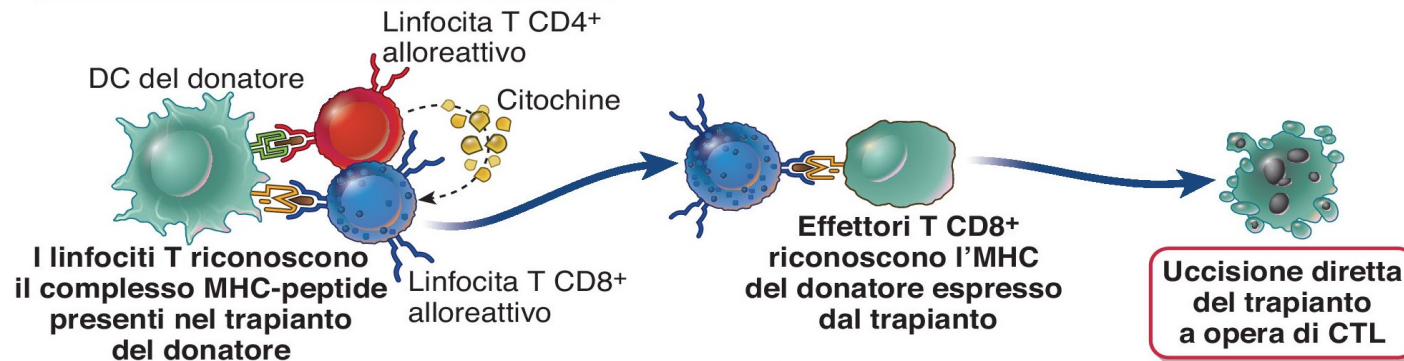
I linfociti T CD8+ alloreattivi che riconoscono in maniera diretta molecole MHC allogeniche svolgono un ruolo primario nel rigetto del trapianto acuto. I linfociti T CD8+ lisano direttamente le cellule endoteliali e parenchimali dell'organo trapiantato. La lisi delle cellule endoteliali si manifesta come endotelite e infiammazione perivascolare.

L'infiltrato cellulare che caratterizza questo tipo di rigetto è arricchito in linfociti T CD8+.

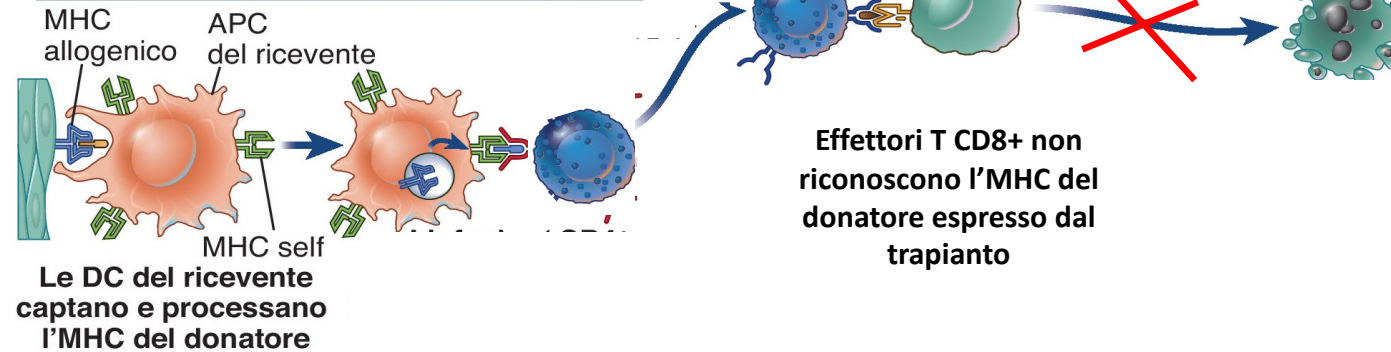
L'eliminazione delle cellule del trapianto da parte dei linfociti T CD8+ avviene principalmente attraverso il rilascio dei mediatori di citotossicità come le perforine granzimi o FasL che causano la lisi delle cellule bersaglio o attraverso la secrezione di IFN- $\gamma$ .

# I linfociti T CD8+ attivati per via diretta sono principalmente responsabili del rigetto acuto del trapianto di organo

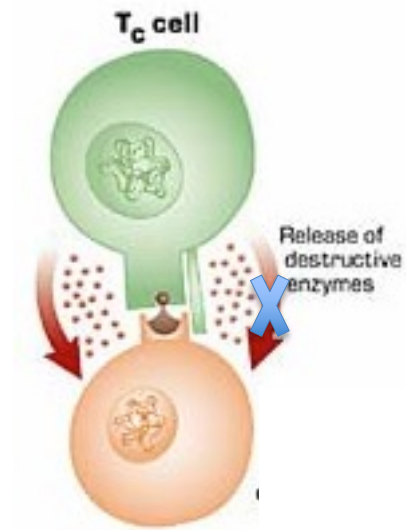
## A Riconoscimento diretto dell'alloantigene



## B Riconoscimento indiretto dell'alloantigene



## Ruolo dei linfociti T CD8+ attivati per via indiretta nel rigetto acuto del trapianto



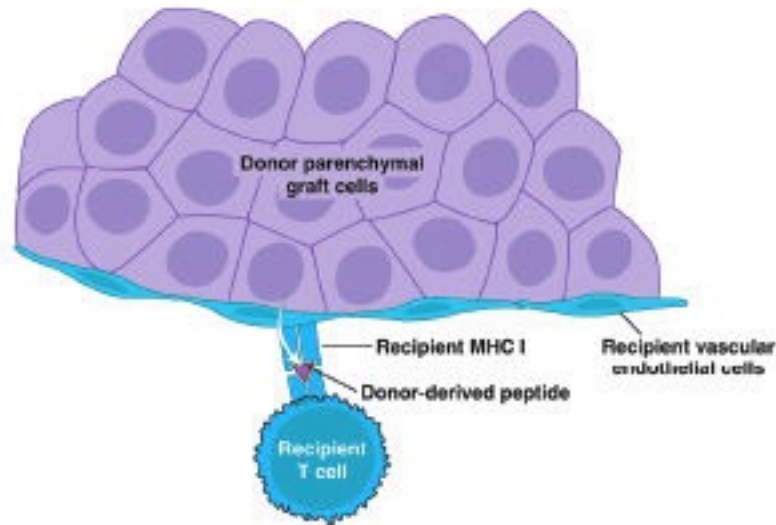
I linfociti T CD8+ alloreattivi che riconoscono gli alloantigeni per via indiretta non saranno in grado di lisare le cellule del parenchima dell'organo trapiantato nel caso in cui il donatore e ricevente esprimano alleli HLA di classe I diversi.

Graft parenchyma



## Ruolo dei linfociti T CD8+ indirettamente attivati nel rigetto acuto del trapianto

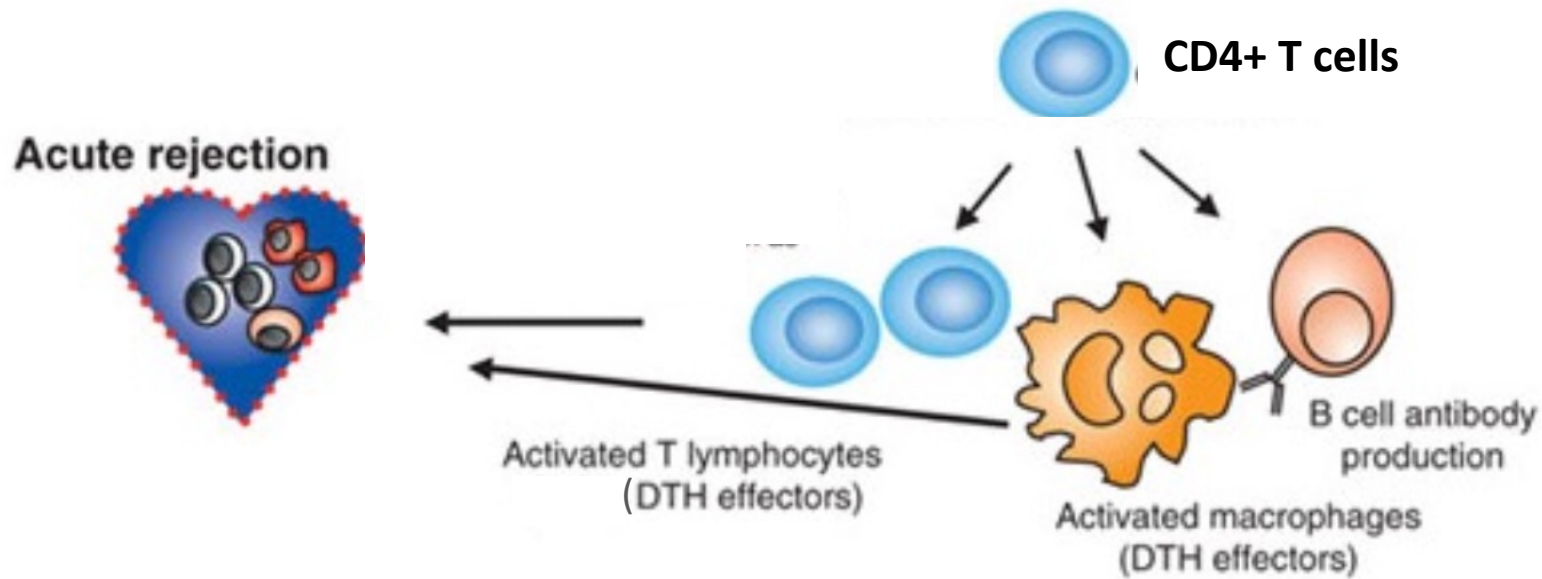
(B) Indirect (endothelial target)



Nel modello del trapianto di pelle è possibile che cellule endoteliali dei vasi che irrorano il trapianto e derivate dal ricevente siano il bersaglio delle risposte immuni indirette mediate dai linfociti T CD8+. Tali cellule mediano il rigetto lisando le cellule endoteliali dei vasi che irrorano il trapianto.

Nel trapianto di pelle è stato dimostrato che i linfociti T CD8+ attivati per via indiretta causano rigetto del trapianto distruggendo le cellule endoteliali dei vasi che lo irrorano. la distruzione dell'organo trapiantato è causata dal danno ischemico.

# Ruolo dei linfociti T CD4+ attivati per via diretta nel rigetto acuto del trapianto



- I linfociti T CD4+ attivati per via diretta possono mediare il rigetto acuto del trapianto attraverso la produzione di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  causando una infiammazione che danneggia l'organo trapiantato.
- I linfociti T CD4+ attivati per via diretta contribuiscono al rigetto acuto del trapianto favorendo l'attivazione dei linfociti T CD8+ alloreattivi.

## Ruolo dei linfociti T CD4+ nel rigetto acuto del trapianto

Alcuni studi hanno dimostrato che i linfociti T CD4 possono mediare il rigetto acuto del trapianto:

Il trasferimento adottivo di cellule CD4+ alloreattive induce rigetto acuto del trapianto.

I topi KO dei linfociti T CD8+ presentano rigetto acuto del trapianto.

In assenza di anticorpi e cellule T CD8+ i linfociti T CD4+ sono in grado di mediare il rigetto acuto di trapianti di cuore e tale rigetto richiedeva l'espressione delle molecole MHC del donatore. Questo suggeriva un ruolo dei linfociti T CD4+ attivati per via diretta nel mediare il rigetto acuto di trapianto di cuore.

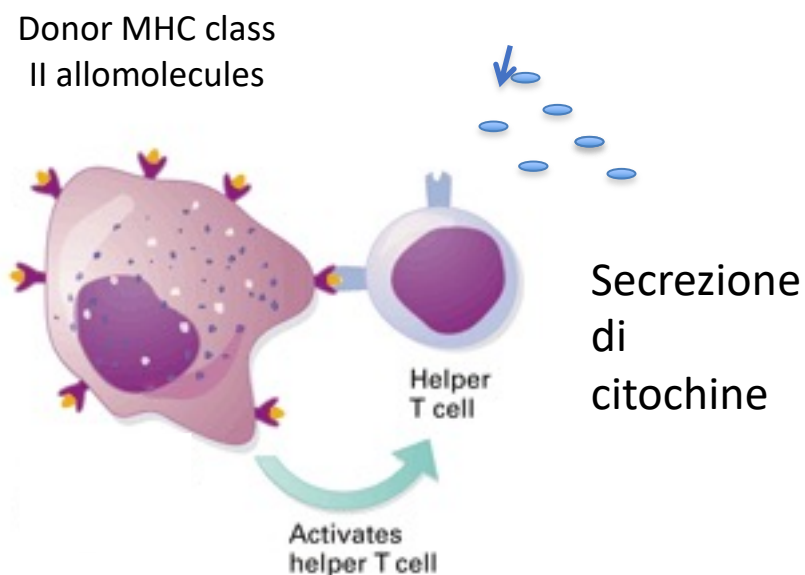
Nel caso del rigetto acuto mediato dai linfociti T CD4+ l'eliminazione delle cellule del trapianto dipende dalla presenza del recettore dell' IFN- $\gamma$ .

I linfociti T CD4+ attivati per via diretta possono mediare il rigetto acuto del trapianto attraverso la produzione di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  causando una infiammazione che danneggia l'organo trapiantato. I linfociti T CD4+ per esplicare le funzioni effettrici necessitano di riconoscere gli antigeni ristretti dalle molecole MHC di classe II.

Le molecole MHC di classe II sono espresse costitutivamente dalle cellule dendritiche, e dai macrofagi. Le cellule del parenchima e dell'endotelio dell'organo trapiantato possono diventare potenziali bersagli delle cellule T CD4+ alloreattive attivate per via diretta in seguito alla up-regolazione delle molecole MHC di classe II. Nel rigetto acuto mediato dai linfociti T CD4+ l'eliminazione delle cellule del trapianto dipende dalla presenza di IFN- $\gamma$ , del contatto cellula-cellula e di mediatori di citotossicità come FasL.

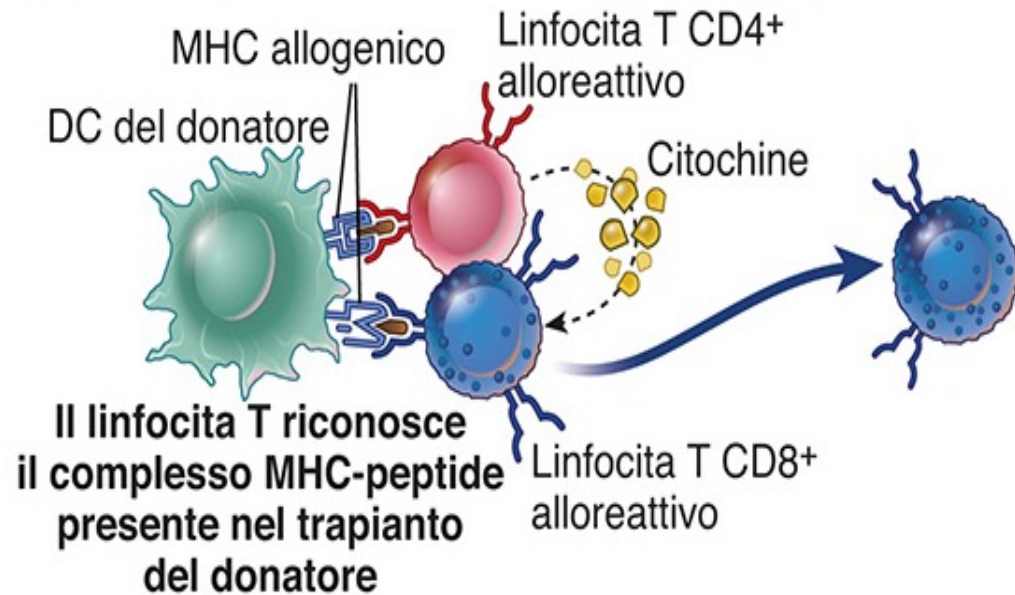
E' stato ipotizzato che l'IFN- $\gamma$

- up-regoli l'espressione delle molecole MHC di classe II sul trapianto.
- Eserciti una azione citopatica diretta sul trapianto.



## I linfociti T CD4+ attivati per via diretta contribuiscono al rigetto acuto del trapianto favorendo l'attivazione dei linfociti T CD8+ alloreattivi

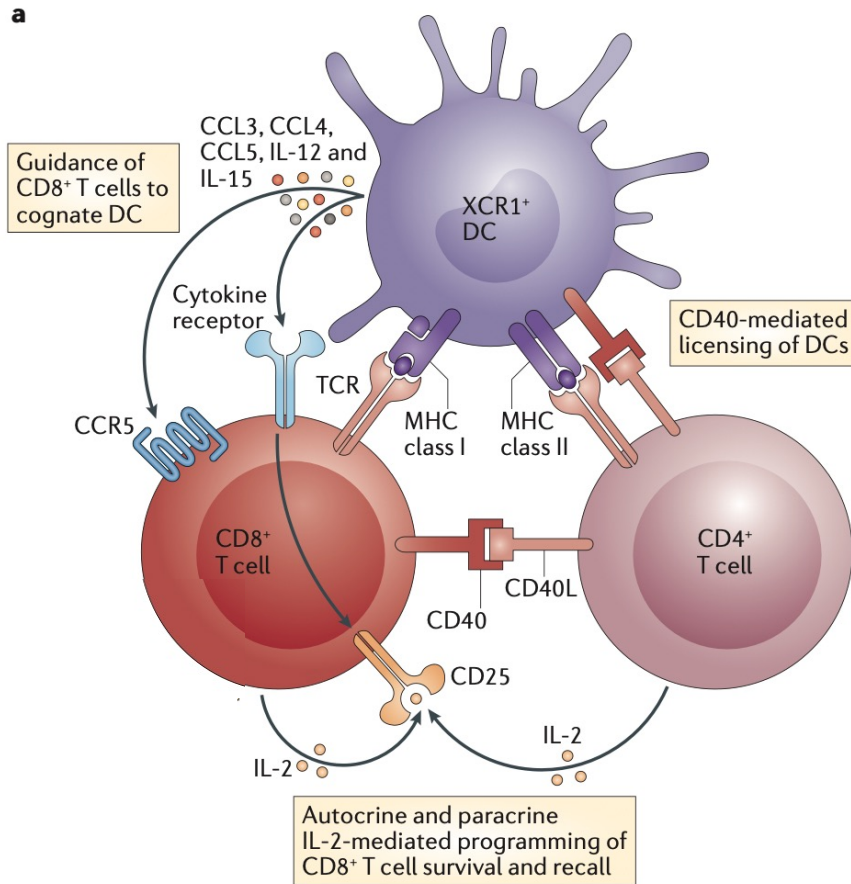
### A Riconoscimento diretto degli alloantigeni



I linfociti T CD4+ generalmente non hanno una azione citotossica e anche se possono mediare il rigetto acuto del trapianto, il ruolo principale di queste cellule nel rigetto acuto del trapianto è di promuovere l'attivazione e il differenziamento dei linfociti T CD8+.

I linfociti T CD8+ mediano poi l'eliminazione delle cellule del parenchima e dei vasi dell'organo trapiantato.

## I linfociti T CD4+ attivati per via diretta sono necessari nell'induzione della risposta T CD8+ alloreattive



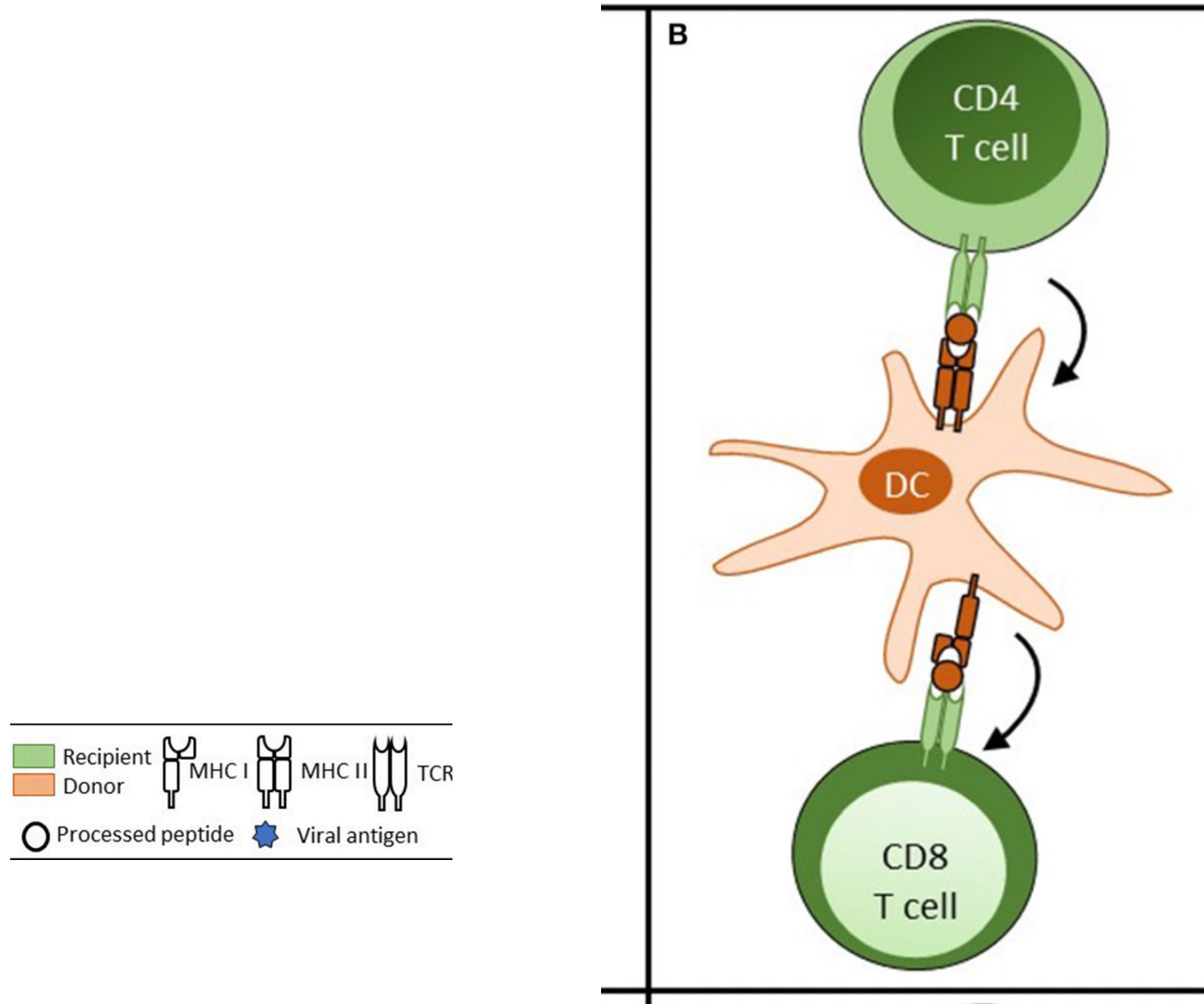
Nel corso della risposta primaria ad un antigene che stimola i linfociti T CD8+, i linfociti T CD4+ sono necessari affinché si sviluppi una robusta risposta T CD8+ in termini di numero e di funzionalità.

I linfociti T CD4+ aiutano la risposta T CD8+ facilitando:

- La maturazione delle cellule dendritiche che in seguito all'interazione con i Th aumentano la loro capacità di cellule presentanti l'antigene e di stimolare i T CD8+. Questa maturazione delle DC è mediata dalla interazione CD40-CD40L
- La produzione di chemochine da parte delle DC mature che facilitano l'avvicinamento dei T CD8+ alle DC stesse .
- La produzione di IL-12 che induce l'espressione del recettore ad alta affinità per l'IL-2 e di IL-15 che aumenta la sopravvivenza dei T CD8+.

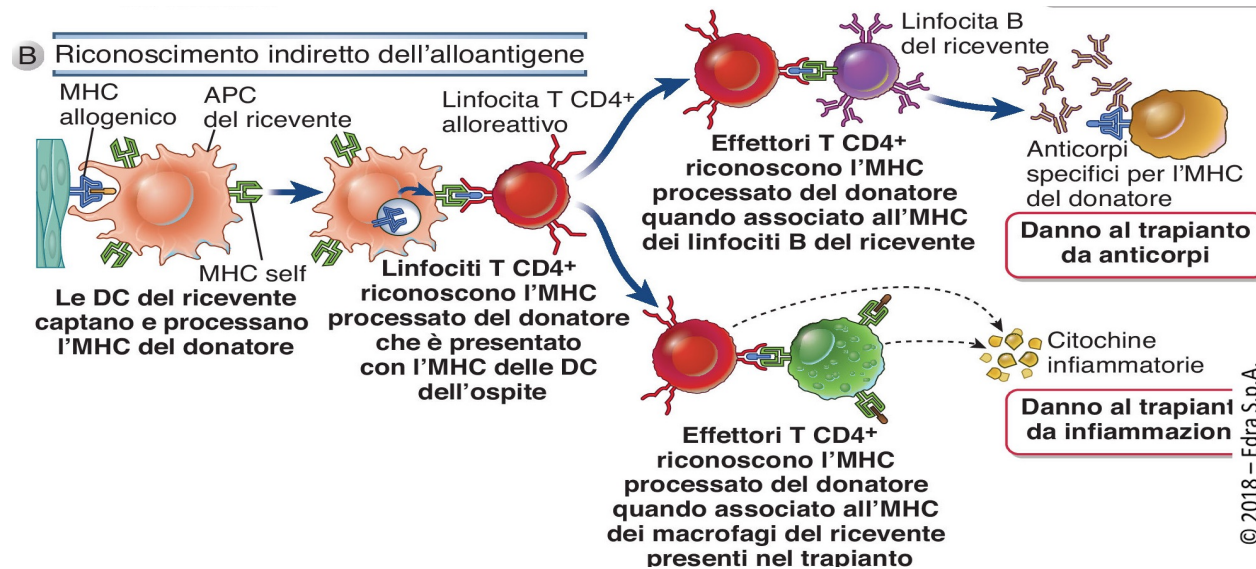


**Complesso a tre cellule attraverso il quale i linfociti T CD4+ inducono la maturazione delle DC favorendo l'attivazione dei linfociti T CD8+**



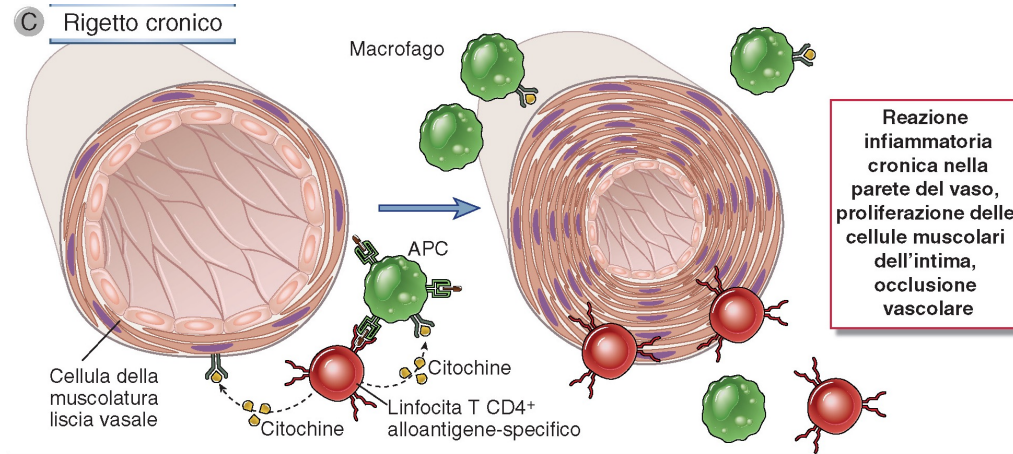
# Ruolo dei linfociti T CD4+ attivati per via indiretta nel rigetto acuto del trapianto di organo

I linfociti T CD4+ attivati per via indiretta contribuiscono al rigetto acuto del trapianto:



- favorendo la produzione di anticorpi allospecifici
- causando una infiammazione cronica nell'organo trapiantato dovuta alla infiltrazione di cellule presentanti l'antigene del ricevente che presentano i peptidi del donatore.

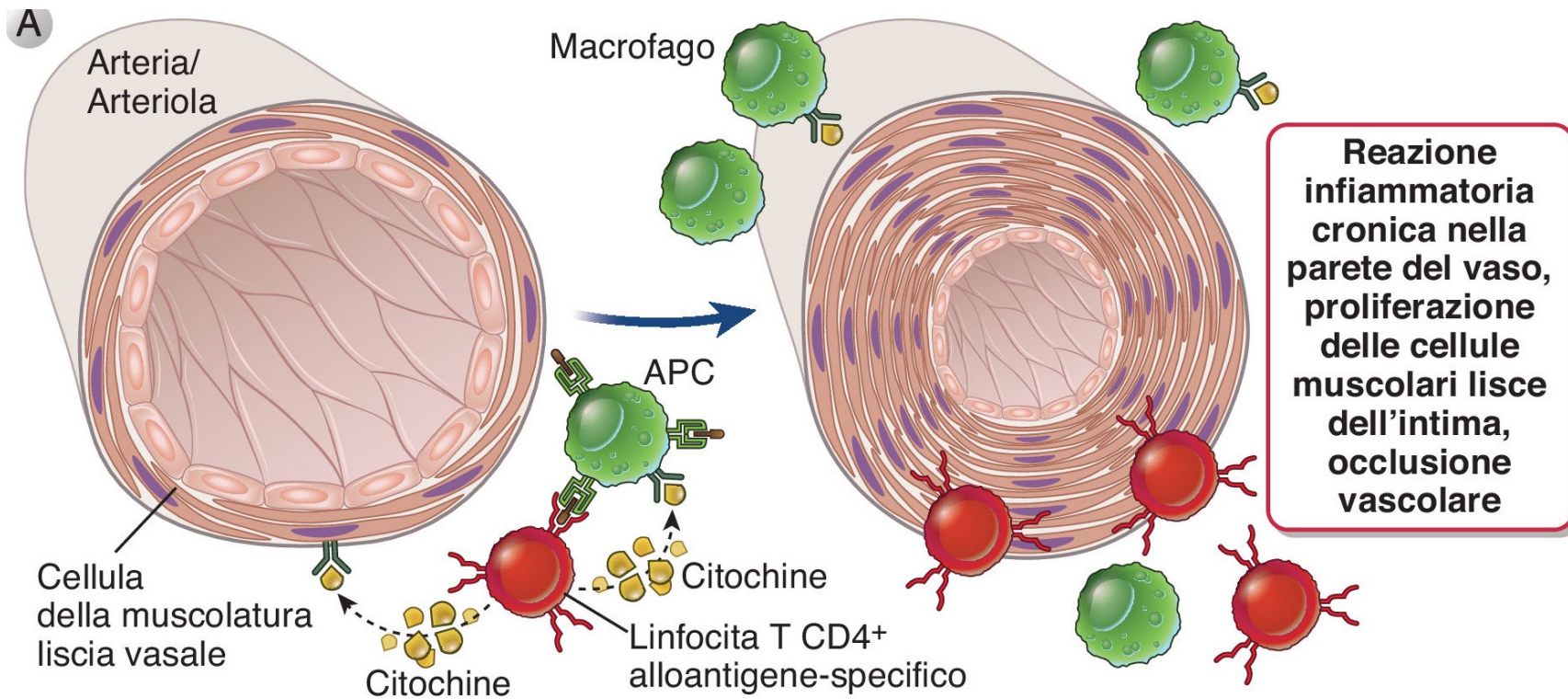
# Meccanismi cellulari del rigetto cronico: ruolo dei linfociti T CD4+



La longevità della via di presentazione diretta e indiretta degli alloantigeni rappresenta probabilmente il fattore critico che determina il contributo di questi due pathway nello sviluppo del rigetto cronico.

Poiché le cellule dendritiche del donatore sono eliminate in tempi rapidi dopo il trapianto, si ritiene che solo le risposte T CD4+ alloreattive indirette possano avvenire in tempi tardivi dopo il trapianto.

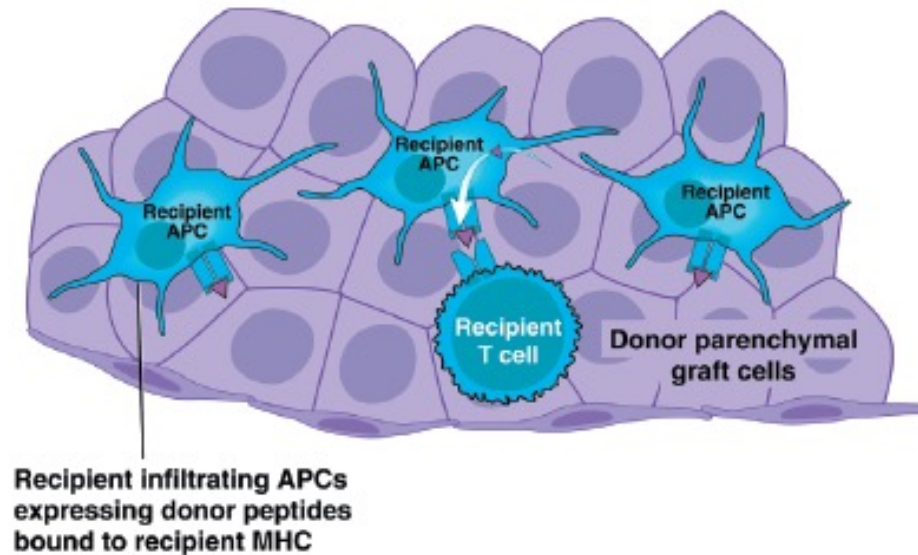
La principale lesione che caratterizza il rigetto cronico del trapianto è la vasculopatia che determina la costrizione dei vasi che irrorano il trapianto. L'occlusione dei vasi è dovuta alla proliferazione delle cellule muscolari lisce dell'intima vasale. Proliferazione dovuta alla produzione di fattori di crescita per le cellule muscolari lisce da parte dei linfociti T. Alla patogenesi delle lesioni contribuisce la reazione DTH mediata dai linfociti T alloreattivi secernenti IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .





## Ruolo dei linfociti T CD4 attivati per via indiretta nel rigetto cronico del trapianto

**(C) Indirect (intragraft target)**



La via indiretta di riconoscimento delle molecole allogeniche sembra avere un ruolo fondamentale nel rigetto cronico del trapianto.

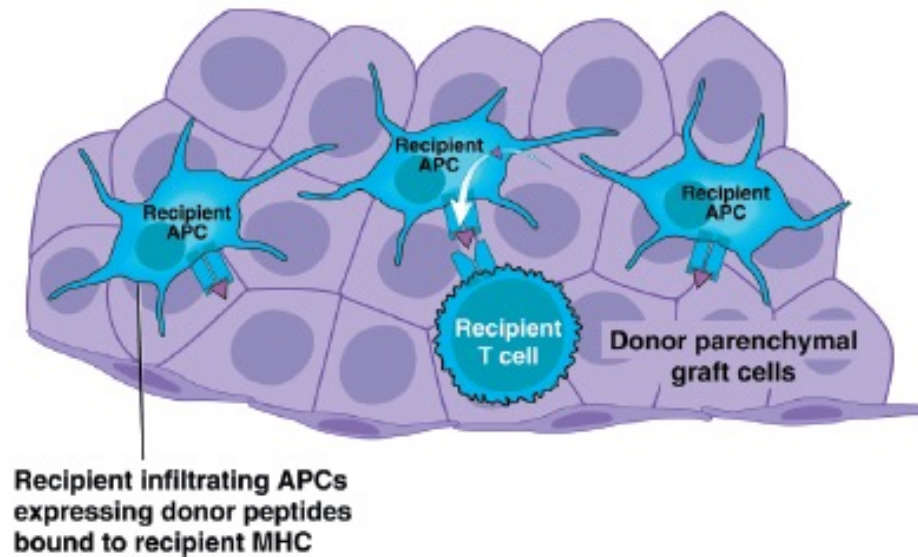
Poiché le cellule dendritiche del donatore dovrebbero essere eliminate dopo il trapianto, si ritiene che il pathway indiretto di presentazione degli allo-antigeni è responsabile del del rigetto cronico.

I monociti e i macrofagi del ricevente infiltrano l'organo trapiantato e possono presentare i peptidi del donatore in associazione alle molecole MHC del ricevente alle cellule T del ricevente. Il meccanismo principale di questo rigetto è attraverso la secrezione di citochine da parte dei linfociti T CD4+ in grado di stimolare la proliferazione delle cellule endoteliali e muscolari dei vasi.

L'occlusione dei vasi limita l'irrorazione dell'organo e il parenchima viene sostituito da tessuto fibroso.



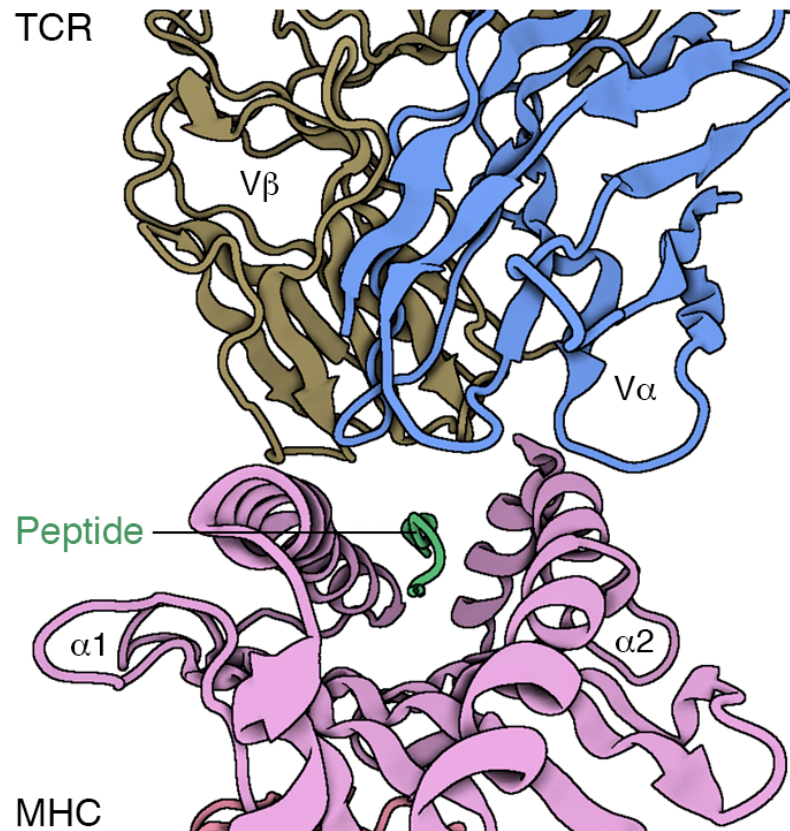
**(C) Indirect (intragraft target)**



I linfociti T CD4+ indirettamente attivati sono in grado di mediare le reazioni DTH (delayed type hypersensitivity) e quindi di attivare i macrofagi favorendo il rilascio di mediatori solubili proinfiammatori quali l'ossido nitrico, TNF- $\alpha$ , specie reattive dell'ossigeno in grado di danneggiare il tessuto.

## Interazione fra TCR e complesso fra MHC allogenico e peptide

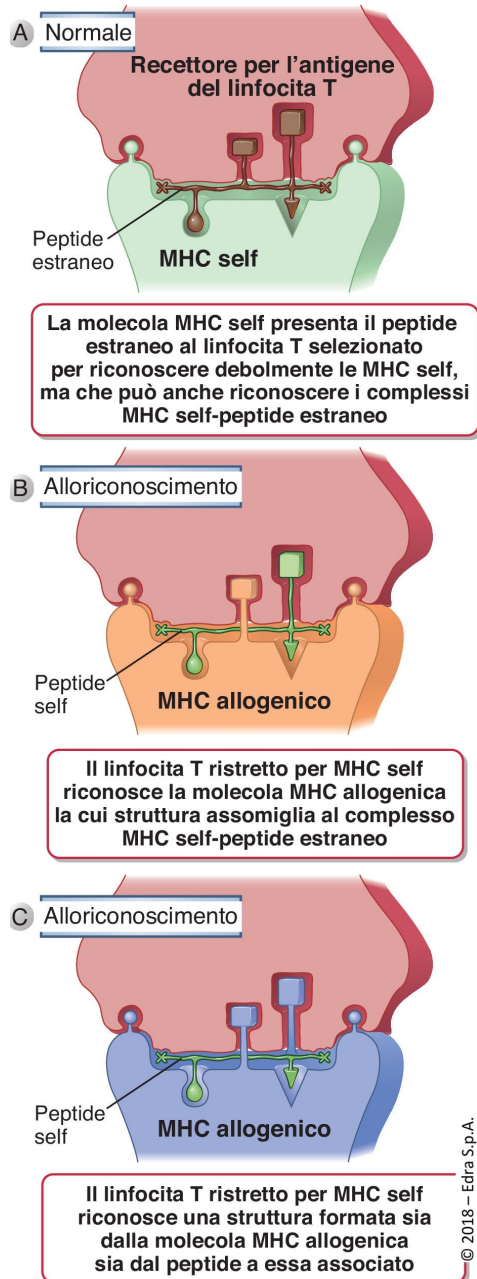
**B**



L'analisi cristallografica del complesso TCR con MHC allogenico+peptide ha dimostrato che il TCR interagisce con residui aminoacidici presenti sulla molecola MHC allogenica e sul peptide associato.

Nel riconoscimento diretto delle molecole MHC allogeniche il peptide è generalmente un peptide autologo presentato da molecole MHC non autologhe.

## Basi molecolari del riconoscimento diretto delle molecole MHC allojeniche



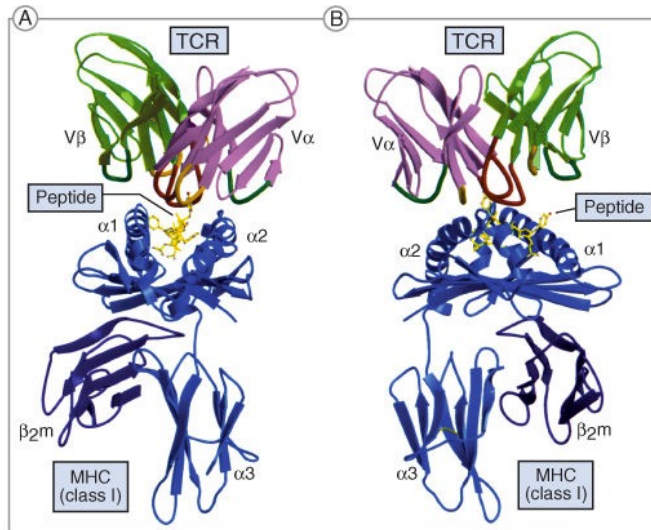
L'analisi cristallografica del complesso TCR con MHC allojenico +peptide ha dimostrato che questa interazione è per lo più identica all'interazione fra TCR con l'MHC autologo+peptide non autologo.

I peptidi legati alle molecole MHC allojeniche possono essere coinvolti nel riconoscimento da parte dei linfociti alloreattivi in modo diverso.

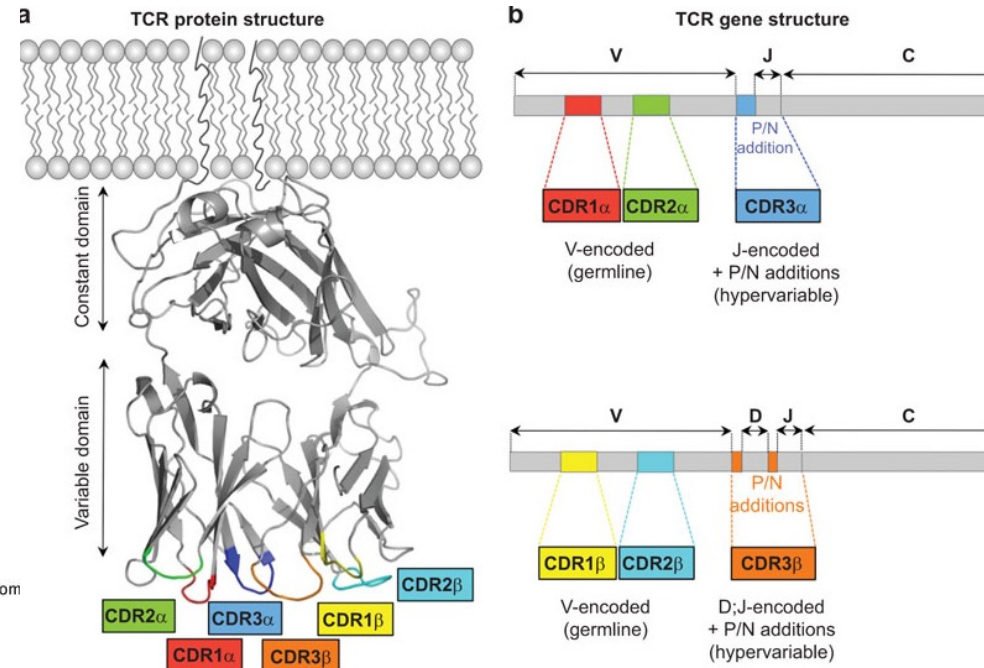
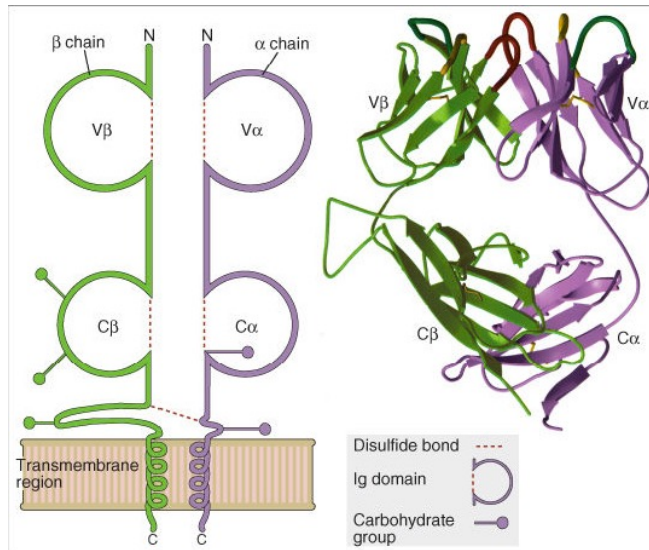
Per certi cloni T è la molecola MHC allojenica da sola del complesso MHC+peptide ad essere il bersaglio maggiore dell'alloriconoscimento (high density model)

Per altri cloni è il complesso MHC+peptide ad essere il bersaglio dell'alloriconoscimento (multiple binary complex model) .

# Interazione TCR-MHC+peptide



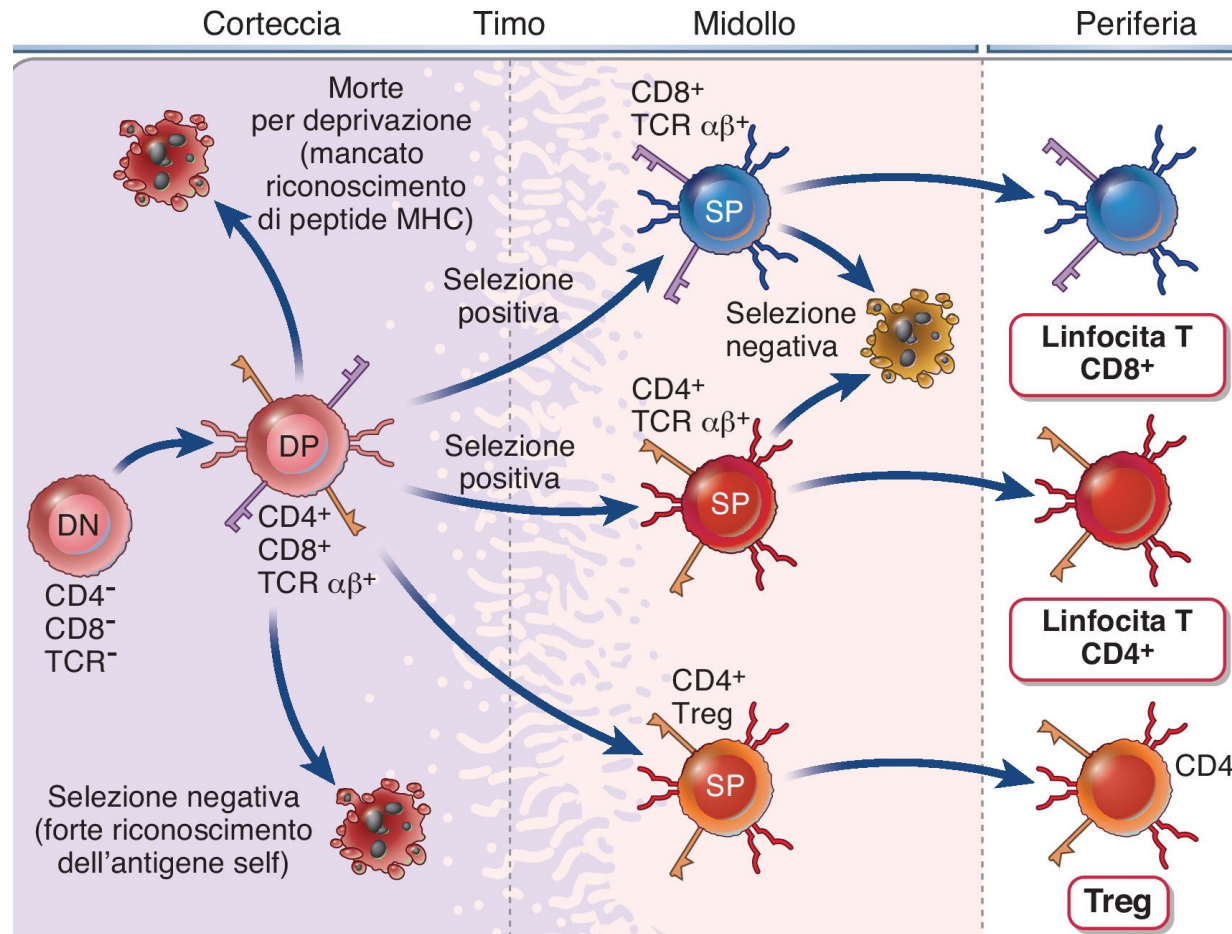
© Elsevier 2005. Abbas & Lichtman: Cellular and Molecular Immunology 5e www.studentconsult.com



Nel riconoscimento classico il sito di legame del complesso MHC+peptide è una superficie planare formata dalle CDR della catena  $\alpha$  e della catena  $\beta$  del TCR. Il CDR1 e 2 contattano l'MHC il CDR3 il peptide.



## I processi di selezione positiva e negativa nel timo permettono lo sviluppo dei linfociti T i cui TCR legano con bassa affinità l'MHC self



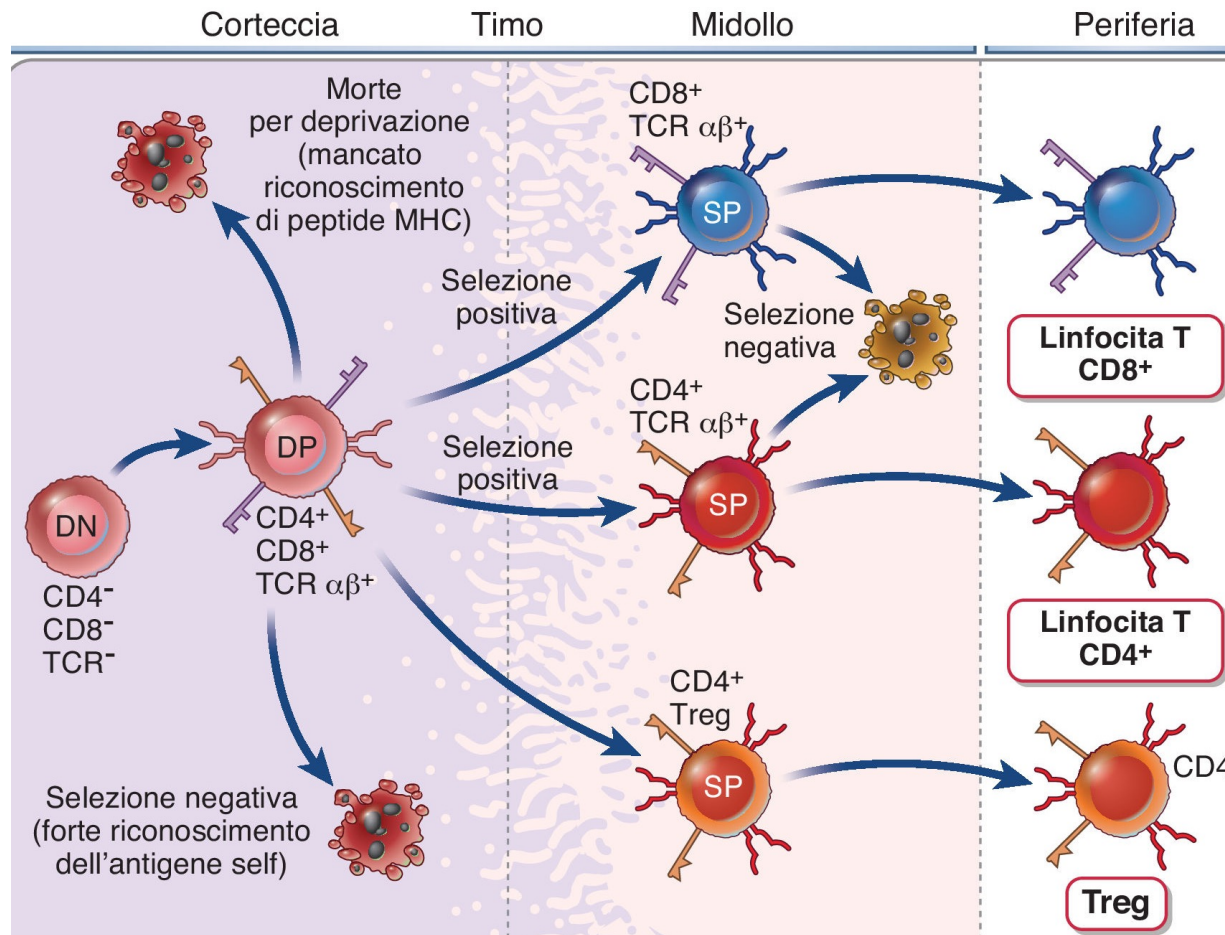
Perché il nostro repertorio T presenta linfociti T alloreattivi?

I timociti doppi positivi CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, TCR $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> vanno incontro a **selezione positiva** nella zona corticale del timo. Questo processo garantisce la progressione nello sviluppo dei timociti che riconoscono con affinità intermedia il complesso MHC autologo + peptide.

In base alla affinità del riconoscimento del complesso MHC self + peptide espresso dalle cellule epiteliali della corticale timica.



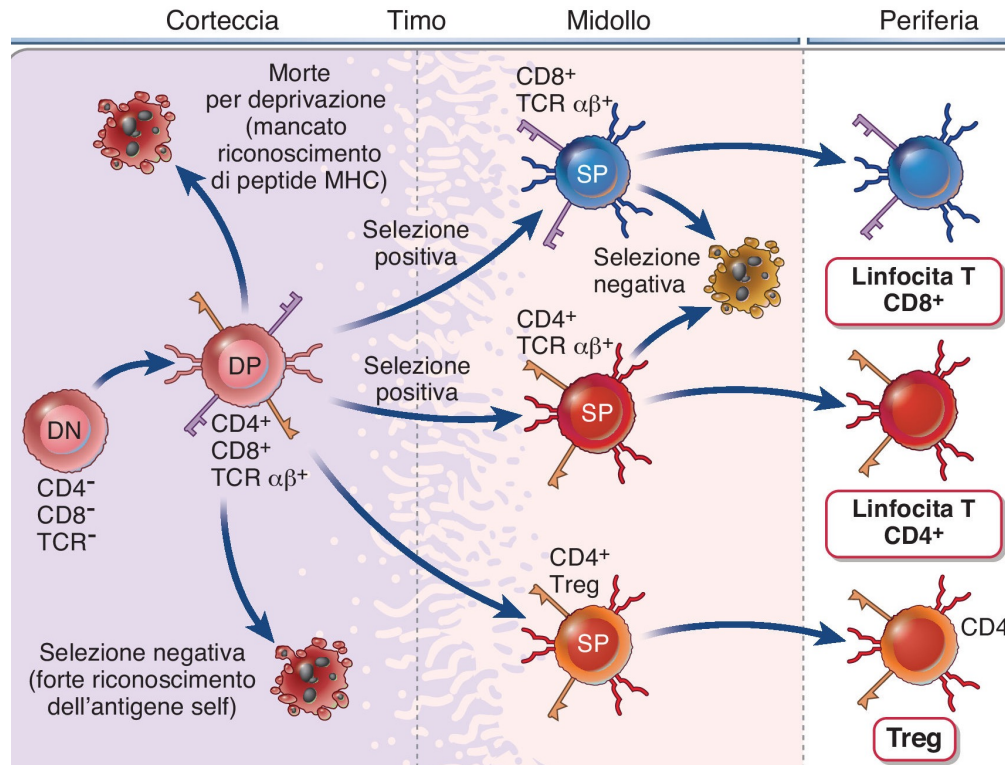
## I processi di selezione positiva e negativa nel timo permettono lo sviluppo dei linfociti T i cui TCR legano con bassa affinità l'MHC self



I timociti il cui TCR:

- **non riconosce l'MHC+peptide moriranno** per deprivazione del segnale;
- **riconosce l'MHC+peptide con alta affinità moriranno.**
- **riconosce l'MHC+peptide con bassa affinità sopravviveranno e proseguiranno la loro maturazione.**

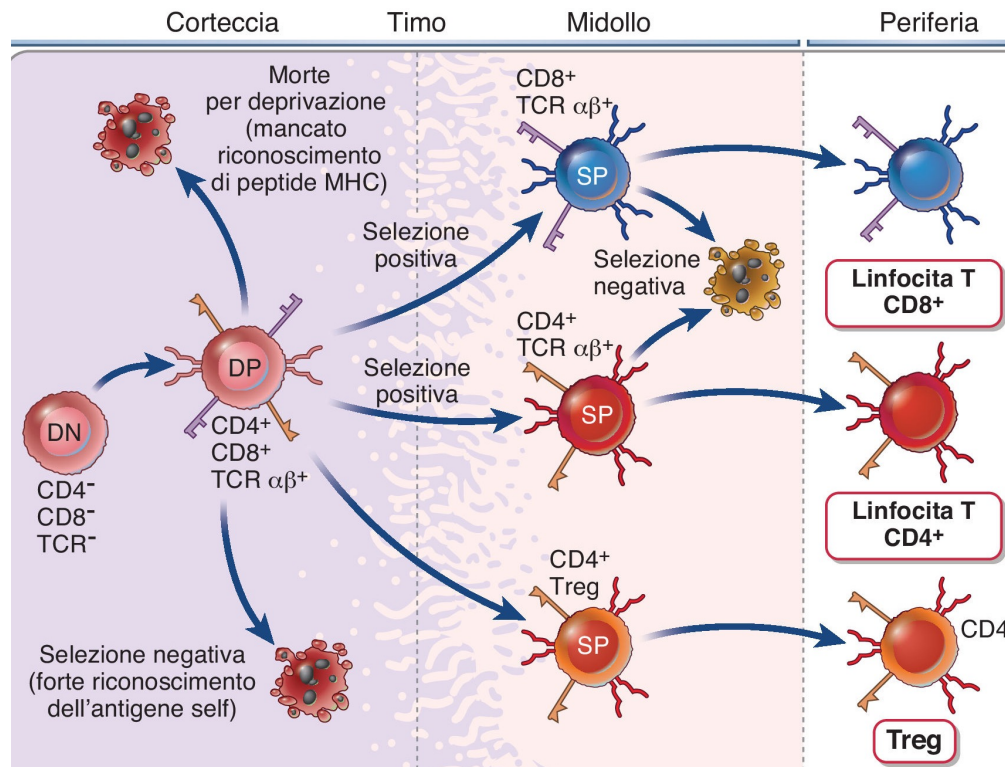
## I processi di selezione positiva e negativa nel timo permettono lo sviluppo dei linfociti T i cui TCR legano con bassa affinità l'MHC self



Nella midollare timica i timociti singoli positivi andranno incontro a selezione negativa.

A questo stadio i timociti che riconoscono con alta affinità il complesso MHC+peptide espresso dalle cellule epiteliali, dalle cellule dendritiche o dai macrofagi andranno incontro a morte.

## I processi di selezione positiva e negativa nel timo permettono lo sviluppo dei linfociti T i cui TCR legano con bassa affinità l'MHC self



Perché il nostro repertorio T presenta linfociti T alloreattivi?

- I TCR selezionati per riconoscere il complesso MHC autologo+peptide a bassa affinità hanno la potenzialità di riconoscere MHC-allo con alta affinità.
- I TCR alloreattivi non sono sottoposti a selezione negativa nel timo.
- L'alloreattività del TCR riflette la predisposizione di tale recettore a interagire con le molecole MHC

## Caratteristiche della risposta T alloreattiva

La frequenza di linfociti T specifici per un complesso MHC+peptide microbico  
 $1/10^5$ -  $1/10^6$

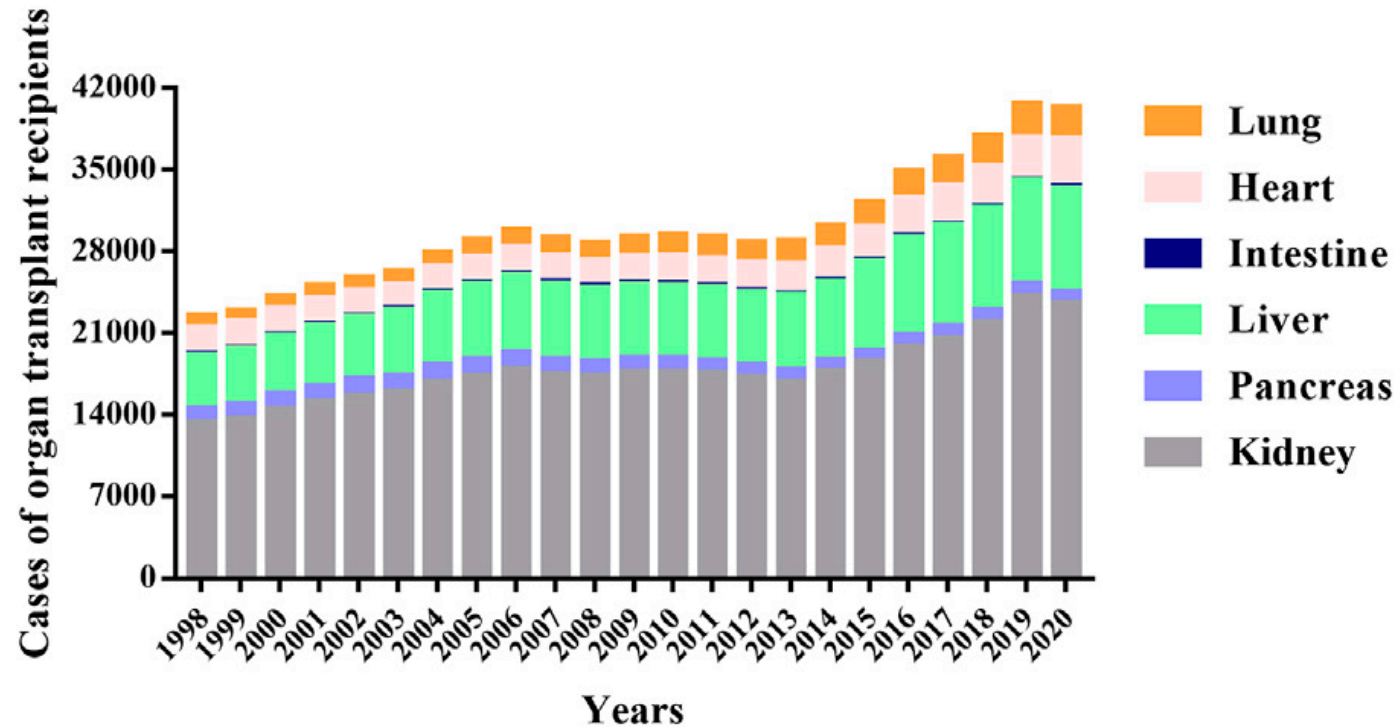
frequenza di linfociti T specifici per un complesso allogenico MHC+peptide  
 $1/10^2$ - $1/10^3$

- Alto livello di cross-reattività del TCR. Un TCR può riconoscere molte combinazioni MHC+peptide.
- Molti linfociti T alloreattivi sono linfociti della memoria generati nelle risposte verso agenti infettivi incontrati dall'organismo.
- I linfociti T alloreattivi non sono selezionati negativamente nel timo.

Il primo trapianto di reni è stato effettuato con successo a Boston nel 1954 fra due gemelli. Da allora avanzamenti nella tipizzazione HLA e nella terapia immunosoppressiva hanno reso possibile il trapianto di rene a numerosi individui. Il trapianto di rene è stato il trapianto pioniere nella clinica per due ragioni principali. 1) I pazienti con danni ai reni possono sopravvivere grazie alla dialisi e anche in caso di insuccesso del trapianto 2) la possibilità di vivere con un solo rene permette il trapianto fra individui della stessa famiglia.



## Numero di trapianti di organi solidi negli Stati Uniti.

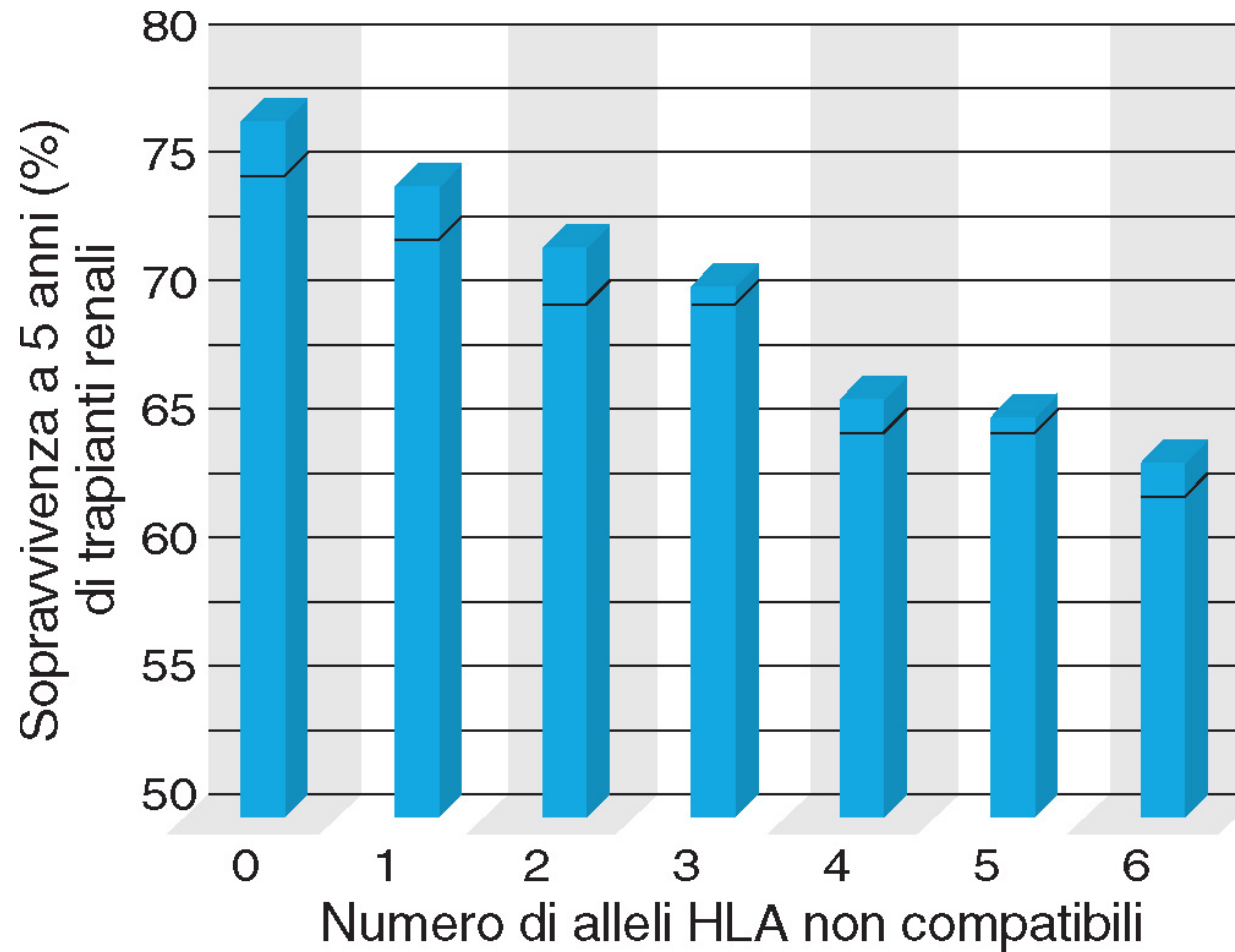


**FIGURE 1** | Total cases of different organ transplants per year from 1998 to 2020. The data were obtained from the Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR) website (<https://srtr.transplant.hrsa.gov/>), which provides the current status of solid organ transplantation in the United States for researchers interested in studying all aspects of solid organ transplantation.

Il trapianto di organo solido rappresenta un trattamento salva-vita. Più di 100.000 persone l'anno ricevono un trapianto di organo solido nel mondo.

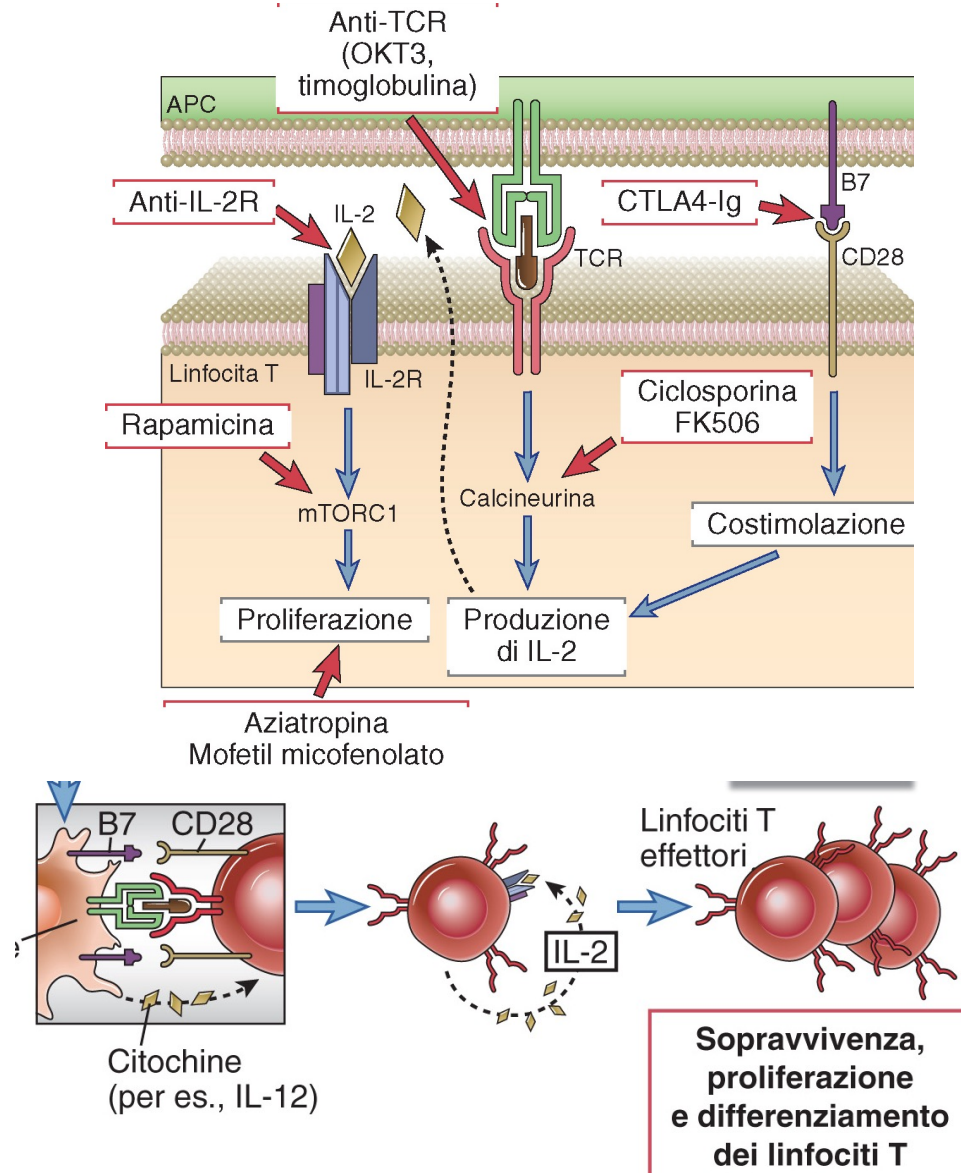
Il registro dei riceventi il trapianto (SRTR) dimostra un generale aumento costante dei trapianti di organo solido negli ultimi 10 anni con una flessione nel 2020 probabilmente legata all'infezione da SARS-CoV2.

**Più è alto il numero di alleli HLA in comune fra il donatore e il ricevente, maggiore è l'attecchimento del trapianto e la sopravvivenza del ricevente.**



L'analisi dell'esito del trapianto in membri della famiglia HLA identici o non ha permesso di dimostrare che maggiore è il numero di alleli in comune fra il donatore e il ricevente maggiore è la probabilità di attecchimento del trapianto. L'esperienza clinica ha dimostrato che fra tutti i loci di MHC di classe I e II il grado di compatibilità per l'HLA-A, -B e -DR è importante per predire l'esito del trapianto.

# Immunosoppressione nel trattamento del rigetto del trapianto



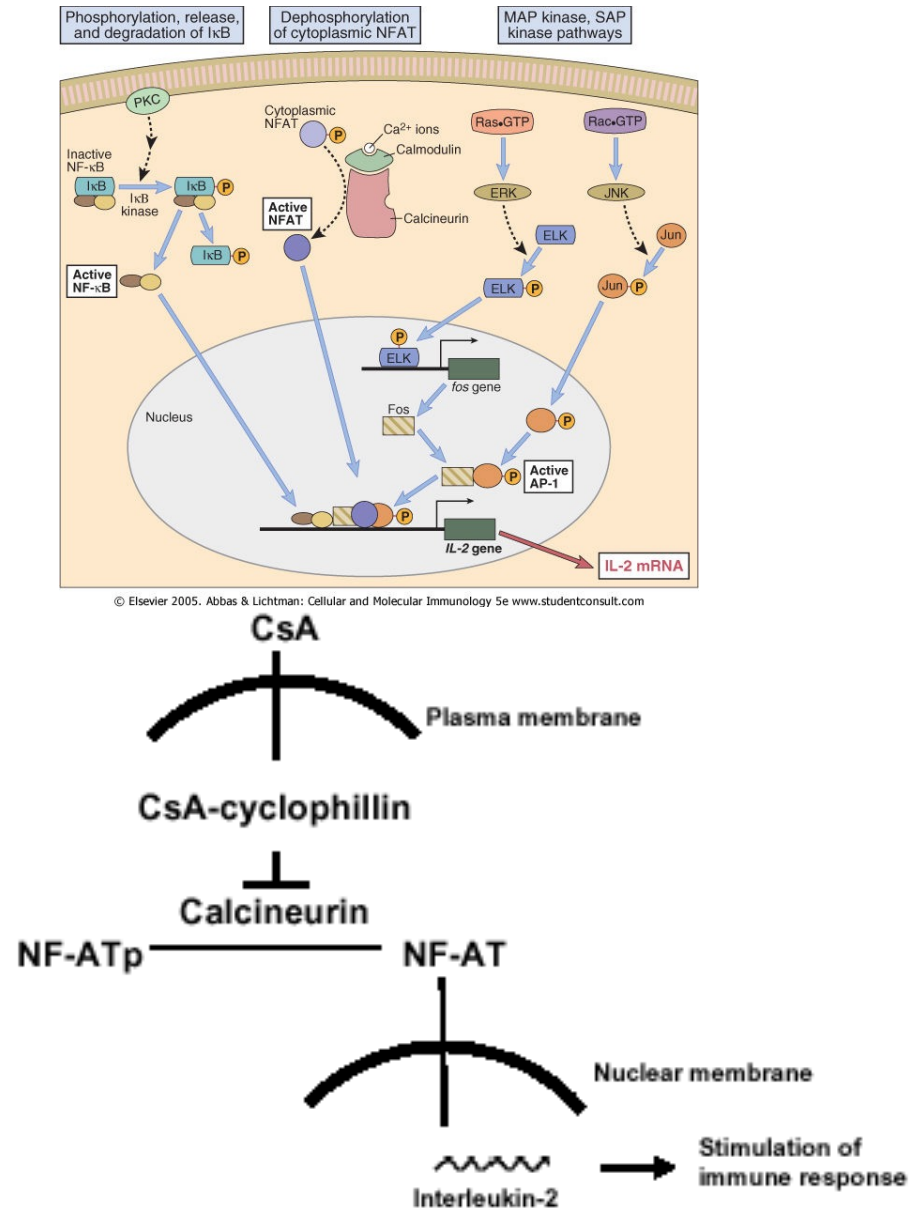
Il trapianto allogenico è reso possibile dall'uso di farmaci immunosoppressivi. La limitatezza della disponibilità di organi e la diversità delle molecole HLA fa sì che la maggior parte dei pazienti riceve trapianti che differiscono per uno o più loci HLA.

Per sopprimere le risposte alloreattive che potrebbero causare rigetto del trapianto vengono utilizzati farmaci immunosoppressivi.

Questi farmaci possono essere di tre tipi:

- 1) Prodotti microbici che inibiscono la via di segnalazione dei linfociti T attivati
- 2) Farmaci citotossici (interferiscono con la replicazione del DNA, uccidendo i linfociti).
- 3) Corticosteroidi (anti-infiammatori)

# Ciclosporina

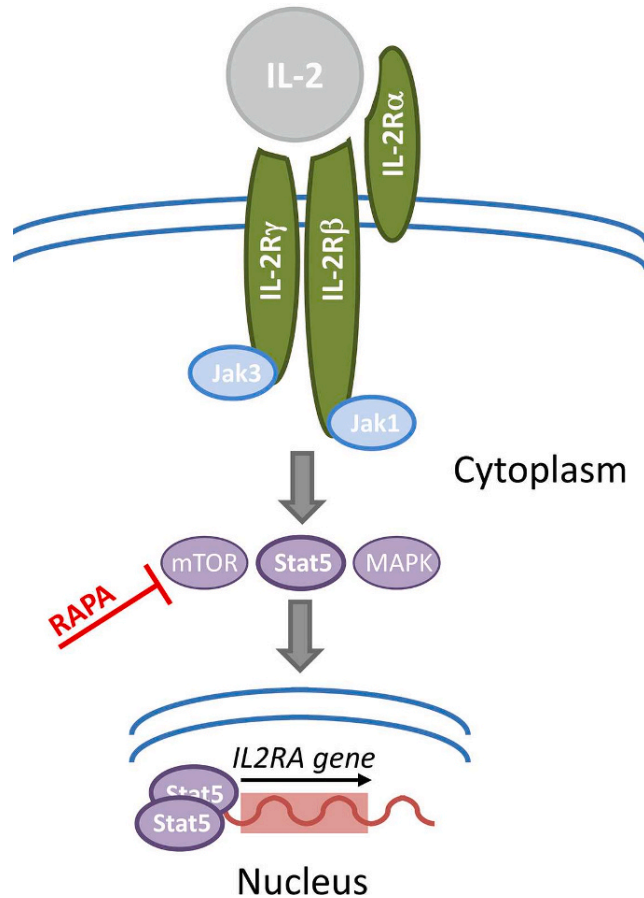


## Azione della ciclosporina

La ciclosporina è un peptide ciclico di derivazione fungina che blocca la trascrizione dei geni per l'IL-2.

**La ciclosporina (CsA)** si lega con alta affinità alla ciclofilina e questo complesso si lega alla calcineurina. La calcineurina è una fosfatasi Calcio-calmodulina dipendente che defosforila il fattore trascrizionale NF-AT. NF-AT nei linfociti T attivati è necessario per la trascrizione dell'IL-2.

**FK-506 (Tacrolimus)**, metabolita fungino lega la proteina FK-506BP bloccando la calcineurina.



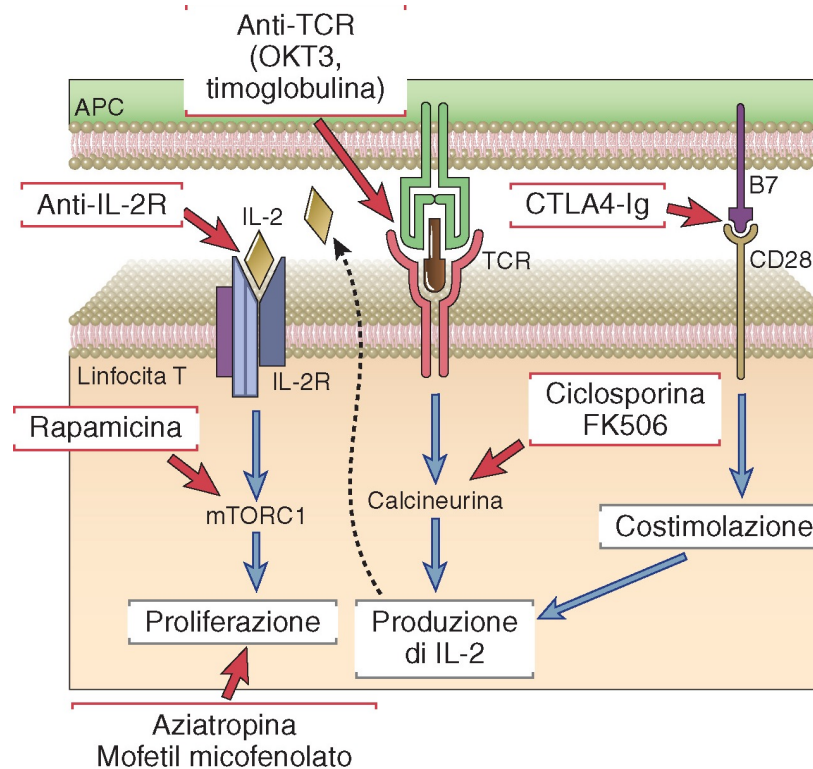
**Rapamicina**= composto naturale che inibisce la proliferazione dei linfociti T. Si lega alla molecola FK-506BP ma non inibisce la calcineurina bensì la molecola mTOR. La rapamicina inibisce la trasduzione del segnale indotta dall'IL-2 bloccando i linfociti nella fase G1-S del ciclo cellulare.

mTOR è una serin treonin chinasi necessaria per la traduzione delle proteine coinvolte nella sopravvivenza e nella proliferazione cellulare. Nelle cellule l'azione di mTOR è inibita dal complesso tuberо-sclerosi 1 (TSC1-TSC2). Il recettore dell'IL-2 attiva mTOR attraverso l'attivazione del complesso PI3K-AKT che fosforilando il complesso TSC1-TSC2 lo inattivano.

**Mofetil micofenolato**= farmaco sintetico che uccide le cellule proliferanti. Tale composto è metabolizzato a acido micofenolico che blocca una isoforma specificamente espressa dai linfociti T della deidrogenasi dell'inosina monofosfato (sintesi dei nucleotidi che contengono la guanina).



## Anticorpi monoclonali diretti verso il CD3 o il CD25.

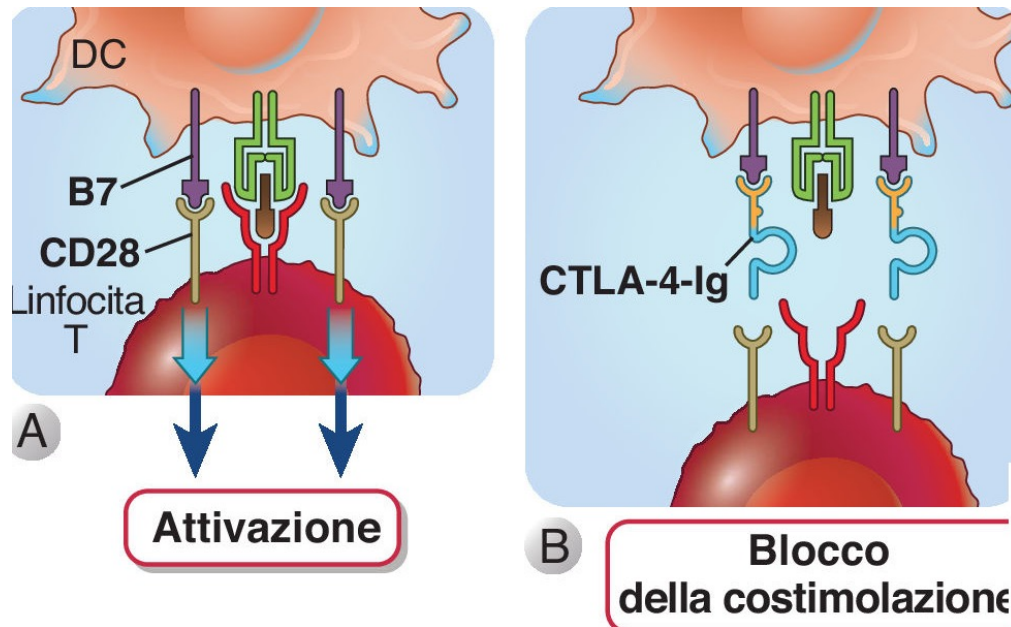


L'OKT3 è stato il primo anticorpo usato in pazienti trapiantati.

Questo agisce depletando i linfociti T o attivando il complemento o attraverso l'opsonizzazione da parte dell'immunoglobuline e rimozione da parte dei fagociti.

L'anticorpo anti-CD25 riconosce il recettore ad alta affinità per l'IL-2 bloccando la proliferazione dei linfociti T.

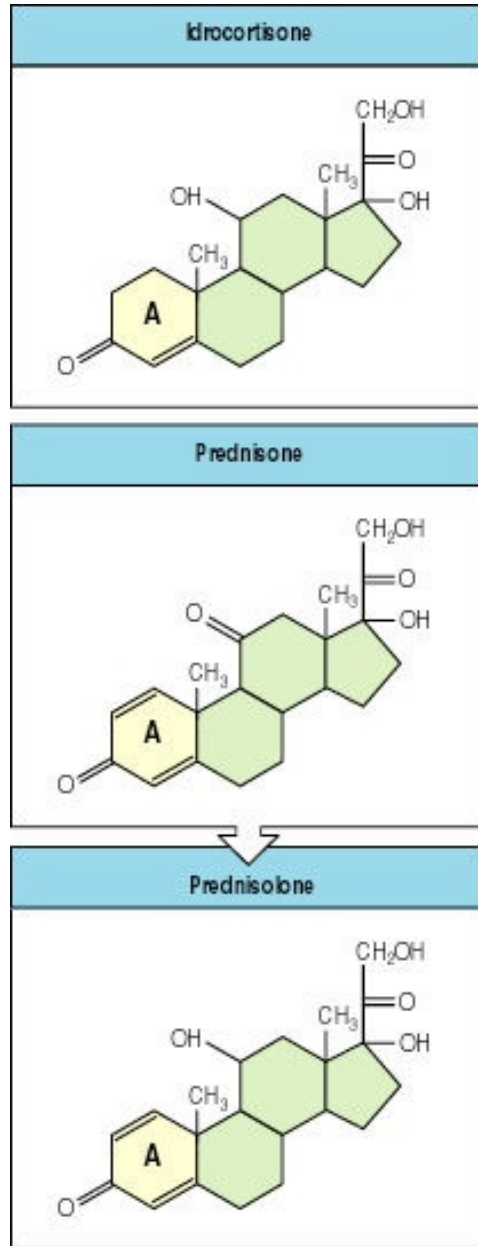
## Blocco delle molecole costimolatorie



La proteina ricombinante CTLA4-Ig composta dalla porzione extracellulare di CTLA4 fusa al dominio Fc dell'IgG è utilizzata per il trattamento del rigetto del trapianto.

Questa molecola si lega alle molecole B7 sulle APC e previene l'interazione fra CD28 e B7. Il Belatacept è efficace quanto la ciclosporina nel prevenire il rigetto acuto di trapianto.

# Corticosteroidi

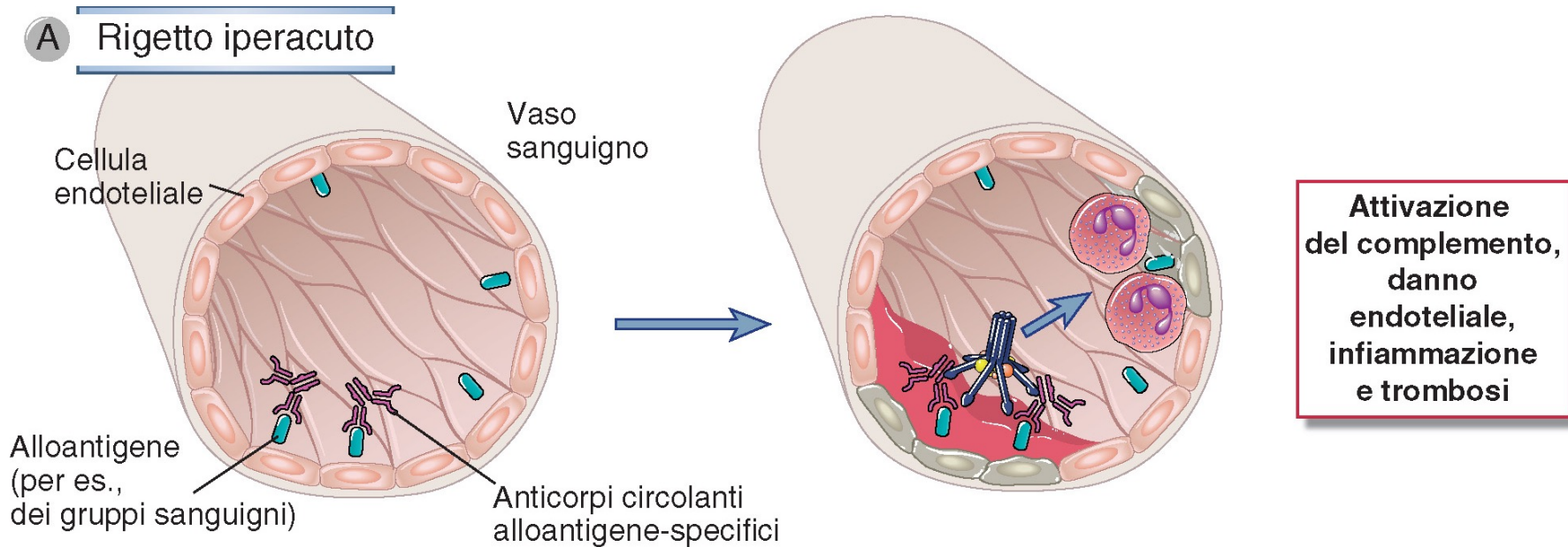


I corticosteroidi sono steroidi con proprietà antiinfiammatorie. I corticosteroidi hanno una azione anti-infiammatoria perché bloccano la sintesi di diverse citochine quali IL-1, TNF- $\alpha$ , e mediatori dell'infiammazione. Agiscono inibendo diversi fattori trascrizionali coinvolti nella espressione delle citochine. Questi sono stati i primi farmaci ad essere utilizzati per l'immunosoppressione nei trapianti.

Terapia corticosteroidica	
Azione	Effetto
↓ IL-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF ↓ IL-3, IL-4, IL-5, IL-8	↓ Infiammazione causata dalle citochine
↓ NOS	↓ NO
↓ Fosfolipasi A <sub>2</sub> ↓ Ciclo-ossigenasi di tipo 2 ↑ Lipocortina-1	↓ Prostaglandine ↓ Leucotrieni
↓ Molecole di adesione	Ridotta migrazione dei leucociti dai vasi
Induzione delle endonucleasi	Induzione dell'apoptosi nei linfociti e negli eosinofili

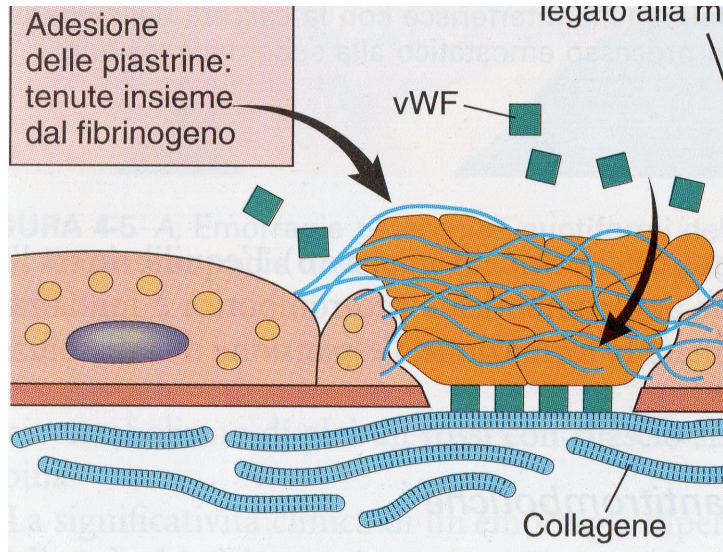
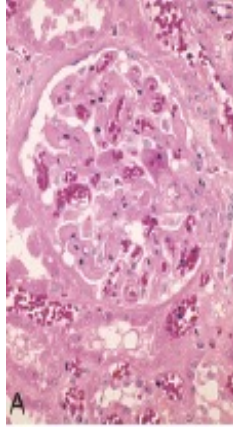
I corticosteroidi agiscono bloccando la sintesi e la secrezione di citochine quali l'IL-1 e il TNF- $\alpha$  da parte dei macrofagi riducendo il processo flogistico. Possono anche bloccare la produzione di prostaglandine di intermedi reattivi dell'ossigeno e di ossido nitrico

# Rigetto iperacuto



Il rigetto iperacuto è mediato dagli anticorpi preesistenti in circolo che riconoscono antigeni espressi dalle cellule endoteliali del donatore quali gli antigeni di gruppo sanguigno ABO. Il rigetto iperacuto si manifesta **nel giro di pochi minuti o di ore** dal momento in cui i vasi del ricevente sono anastomizzati a quelli del donatore. Il rigetto iperacuto è caratterizzato da emorragia e occlusione trombotica della vascolatura del trapianto.

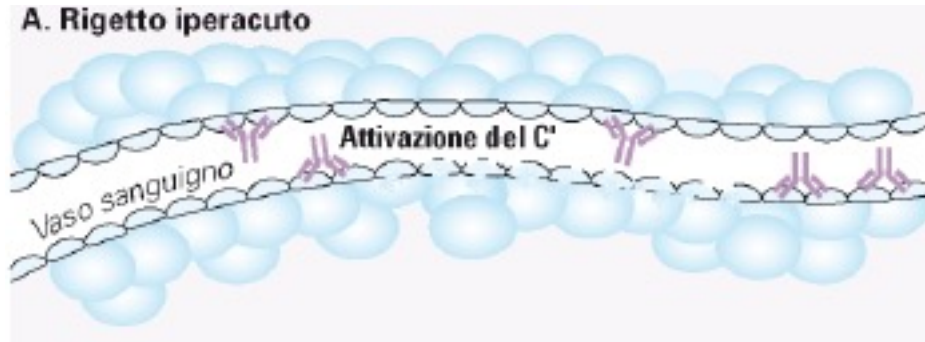




L'attivazione del complemento porta ad un danno dell'endotelio attraverso la formazione del MAC e all'esposizione di proteine della membrana basale subendoteliale che attiva le piastrine.

Le cellule endoteliali producono forme ad alto peso molecolare del fattore di von Willebrand che mediano l'adesione e l'aggregazione piastrinica. Il danno endoteliale porta alla liberazione di particelle lipidiche che avviano la coagulazione.

## Antigeni responsabili del rigetto iperacuto del trapianto



Il rigetto iperacuto può essere causato dall'incompatibilità fra antigeni di gruppo sanguigno ABO fra donatore e ricevente. Le molecole del gruppo sanguigno ABO sono espresse sulle cellule endoteliali. Per evitarlo si selezionano i donatori in modo che esprimano antigeni ABO compatibili con quelli del donatore. Il rigetto iperacuto può essere innescato da anticorpi IgG presenti nel ricevente che riconoscono le molecole MHC allogeniche (politrasfusi, gravidanze).

# Meccanismi immunopatologici del rigetto del trapianto

