



A. Mengarelli¹
W. Arcese²

¹SC Ematologia, Istituto Regina Elena, Roma
²Unità Trapianto di Cellule Staminali, Policlinico Tor Vergata, Roma, Italy

Il rigetto dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche

Introduzione

Per rigetto dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (CSE) si definisce l'assenza di iniziale attecchimento (graft failure primario) o lo sviluppo di pancitopenia nel sangue periferico (SP) ed aplasia del midollo osseo (MO) dopo iniziale attecchimento (graft failure secondario) dovuti a meccanismi immuno-mediati.

L'incidenza è <0,1% tra i riceventi trapianto HLA-identico non T-depleto dopo condizionamento mieloablativo e varia tra il 3 ed il 30% nei riceventi trapianto allogenico differente (HLA-mismatched, T-depleto, non mieloablativo). La diagnosi può essere difficile poiché il fallimento dell'attecchimento può essere causato anche da tossicità farmacologica e alcune infezioni virali. L'individuazione di cellule T del ricevente attraverso la caratterizzazione del chimerismo in caso di fallimento dell'attecchimento può essere interpretata come indicativa di rigetto del trapianto. La prognosi è solitamente infausta. Gli interventi terapeutici possono consistere in un incremento della immunosoppressione, in un incremento dell'alloreattività mediante immunoterapia adottiva (infusione di linfociti del donatore) ed infine in un'addizionale infusione

di CSE del donatore dopo terapia immuno-cito-riduttiva (retrapianto). In particolare, il rinnovato interesse per quest'ultimo tipo di approccio terapeutico, motivato dall'aumentato rischio di rigetto osservato nei trapianti a condizionamento non mieloablativo, ha prodotto negli ultimi anni numerose pubblicazioni relative a casistiche limitate di retrapianti condizionati con regimi non mieloablativi dopo rigetto primario o secondario.¹⁻⁴ Va oltre lo scopo di questa review focalizzare sui dati di immunologia di base ottenuti dal modello murino che hanno consentito di comprendere dettagliatamente molti dei meccanismi molecolari e cellulari alla base del rigetto di allotrapianti sia d'organo e tessuto che di CSE, e che pure rappresentano il background per un futuro impiego razionale nell'uomo dei condizionamenti cosiddetti immunologici, basati sull'infusione dopo terapia non mieloablativa di popolazioni cellulari selezionate. Basti qui ricordare che attualmente l'interesse dei trapiantologi verte sulla applicabilità clinica di terapie cellulari basate sull'infusione di cellule natural killer (NK) del donatore con alloreattività donatore-versus-ricevente,⁵ di cellule staminali mesenchimali del donatore con attività immunosoppressiva,⁶ e di cellule T CD4⁺ CD25⁺ regolatorie del donatore o del ricevente.⁷⁻⁹

Verranno di seguito riassunti i meccanismi cellulari alla base del rigetto nell'uomo ed i fattori di rischio pre- e post-trapianto allogenico di CSE.

Basi cellulari del rigetto nell'uomo

Le popolazioni cellulari coinvolte nel rigetto/attecchimento dopo trapianto allogenico di CSE sono rappresentate da vari subset di linfociti: T del donatore e del ricevente (T CD4⁺ Th1/2, T CD8⁺ Tc1/2, T CD4⁺ CD25⁺ Treg), cellule NK del donatore e del ricevente e CSE del donatore. La risposta alloimmune cellulare T del ricevente verso il trapianto può essere suddivisa in 3 fasi. Una prima fase di attivazione in cui le cellule T CD4⁺ e CD8⁺ residuali dal condizionamento del ricevente riconoscono peptidi non-self presentati loro da cellule presentanti l'antigene (APC) del donatore e del ricevente attraverso molecole di classe II del MHC (per i CD8⁺) e di classe I del MHC (per i CD4⁺). Partecipa a questa prima fase di attivazione un folto gruppo di molecole di superficie cellulare che svolgono il ruolo di molecole di adesione o di co-stimolazione. Segue una seconda fase di espansione della risposta alloimmune cellulare T del ricevente verso il trapianto caratterizzata dall'attivazione di pathways di trasduzione del segnale all'interno delle cellule T che conduce ad una proliferazione autocrina e paracrina delle cellule T del ricevente e ad una differenziazione delle medesime cellule T in cellule effettrici del rigetto. Infine, la terza fase effettrice si caratterizza per l'azione dei linfociti T helper e citotossici sull'infuso linfoemopoietico del donatore con finale apoptosi delle cellule target trapiantate indotta dall'azione di citochine infiammatorie, perforine e FASL-FAS. Che il rigetto nell'uomo sia mediato da cellule T del ricevente è provato da evidenze sperimentali e circostanziali. Nel 1990 è stato possibile docu-

mentare in modo diretto il ruolo dei linfociti T del ricevente nel rigetto dopo allotrapianto di MO mediante l'individuazione del clone cellulare T che riconosceva una singola differenza aminoacidica nell'antigene HLA-B44.¹⁰ Esistono invece evidenze limitate del ruolo nell'uomo delle cellule NK del ricevente come mediatrici del rigetto dopo allotrapianto. Nel 2008 Sobecks RM *et al.*, analizzando i matches tra i genotipi KIR (killer like-immunoglobulin receptor) inibitori dei riceventi e i ligandi HLA/KIR dei donatori in 31 pazienti sottoposti a trapianto non mieloablativo non T-depleto da donatore correlato, hanno costruito un punteggio KIR da 1 a 4 basato sul potenziale numero di KIR inibitori del ricevente che potevano essere ingaggiati dai ligandi HLA/KIR del donatore, dimostrando che i pazienti con punteggio 1 avevano più probabilità di andare incontro a rigetto di quelli con punteggio >1.¹¹ Questi dati del tutto recenti suggeriscono anche per l'uomo come per il modello murino un ruolo delle cellule NK del ricevente come cellule effettrici immuni anti-donatore. Molto più consolidato è invece il ruolo che le cellule NK del donatore possono avere nel promuovere l'attecchimento in trapianti HLA-mismatched con alloreattività donatore-versus-ricevente delle cellule NK.⁵

Fattori di rischio per il rigetto

I fattori di rischio per il rigetto possono essere classificati in pre- e post-trapianto. Tra i primi sono riconosciuti la disparità genetica HLA, l'alloimmunizzazione trasfusionale, l'impiego di regimi di condizionamento non mieloablativi o ad intensità ridotta, un basso numero di cellule T e di CSE nell'inoculo. Tra i fattori di rischio post-trapianto sono identificati bassi livelli di chimerismo cellulare T e NK del donatore precocemente individuati dopo allotrapianto.

Disparità genetica dell'HLA

Geni HLA coinvolti nel rigetto

Nel 2000 è stato pubblicato il più ampio studio da registro su 5246 trapianti di MO da donatore non correlato in cui si dimostrava che un mismatch per gli antigeni HLA-A e B ed un mismatch a livello allelico per il DRB1 correlavano con un rischio statisticamente significativo di graft failure (*Davies SM et al. Blood 2000;96:4096-4102*). Sempre nel 2000 in un altro studio da registro su 1423 trapianti di MO da donatore non correlato in pazienti con leucemia mieloide cronica (LMC) si evidenziava l'aumento del rischio di graft failure in caso di mismatch antigenico per HLA-A, B e DR (*Mc Glave PB et al. Blood 2000;95: 2219-25*). Precedentemente nel 1997 era stato dimostrato in uno studio caso-controllo su 63 pazienti con LMC trapiantati di MO da donatore non correlato che un mismatch allelico per il locus HLA-C comportava un rischio di graft failure aumentato (*Petersdorf EW et al. Blood 1997;89:1818-23*). Questa osservazione sul ruolo del mismatch allelico per il locus HLA-C era stata riportata per la prima volta nel 1996 su 30 pazienti trapiantati di MO da donatore non correlato (*Nagler A et al. Bone Marrow Transplant 1996;18:891-7*). Nel 2001 in uno studio da registro su 471 pazienti con LMC trapiantati di MO non T-depleto da donatore non correlato veniva confermato il ruolo del mismatch antigenico per ciascuno degli antigeni HLA di classe I (A, B e C) nell'aumentare il rischio di rigetto.¹²

Infine nel 2006 è stato dimostrato in uno studio caso-controllo su 72 pazienti con beta talassemia trapiantati da donatore non correlato che un mismatch allelico non permissivo sul locus HLA-DPB1 in direzione ricevente-versus-donatore correla con un più alto rischio di rigetto.¹³

Effetti quantitativi dei mismatches HLA sul rischio di rigetto

Per effetto quantitativo della disparità HLA si intende l'associazione del rischio di rigetto con il numero totale di disparità HLA. Nel 1998 veniva dimostrato in uno studio da registro su 300 trapianti di MO per LMC da donatore non correlato come, rispetto ad un trapianto matched, la presenza di un singolo mismatch allelico HLA per la classe I e II non comportasse un aumentato rischio di rigetto, mentre la presenza di >1 mismatch allelico sulla classe I o di un duplice mismatch allelico sulla classe I e II si associasse ad un aumentato rischio di rigetto. La presenza di >1 mismatch allelico sulla classe II non era correlata con il rischio di rigetto (*Petersdorf EW et al. Blood 1998;92:3515-20*). Nel 2001 Petersdorf EW et al. nel già citato studio pubblicato sul *N Engl J Med* su 471 pazienti con LMC trapiantati di MO non T-depleto da donatore non correlato dimostrarono che, in riceventi eterozigoti, il rischio di rigetto per singolo mismatch allelico sulla classe I non era significativamente aumentato rispetto ai riceventi full-matched, mentre il rischio aumentava significativamente in caso di singolo mismatch antigenico sulla classe I, in caso di >1 mismatch allelico sulla classe I ed in caso di mismatch allelico + antigenico sempre sulla classe I.¹² Nel 2002 da uno studio da registro su 1298 trapianti di MO da donatore non correlato risultava che un singolo mismatch allelico sulla classe I o II (DR/DQ) non correlava con il rischio di rigetto in confronto ai pazienti full-matched, mentre un duplice mismatch allelico HLA-A/B + C o A/B + DR/DQ era significativamente associato ad un aumentato rischio di rigetto, rischio non identificabile in caso di mismatch allelico C + DR/DQ (*Morishima Y et al. Blood 2002;99:4200-6*). Infine, nel 2005 veniva confermato in uno studio da registro su 341

pazienti trapiantati con condizionamento ad intensità ridotta da donatore correlato che un singolo mismatch allelico sulla classe I e II non influenzava il rischio di rigetto, mentre un mismatch allelico per 2 o 3 loci aumentava significativamente il rischio in confronto ai pazienti full-matched (*Teshima T et al. Br J Haematol 2005;130:575-87*).

Effetti qualitativi dei mismatches HLA sul rischio di rigetto

Per effetti qualitativi della disparità HLA sul rischio di rigetto si intendono almeno 4 differenti aspetti clinico-biologici:

Accresciuto rischio di rigetto in caso di singolo mismatch antigenico sulla classe I, non in caso di singolo mismatch allelico sulla classe I. La collocazione ed il numero delle differenze aminoacidiche nella molecola antigenica HLA di classe I definiscono il rischio di rigetto, poiché disparità coinvolgenti aminoacidi direttamente coinvolti nel legame con i peptidi e nel contatto col TCR possono giocare un ruolo nell'evocare la risposta cellulare T del ricevente responsabile del rigetto.¹² Recentemente Flomenberg et al. hanno confermato su 1874 trapianti di MO da donatore non correlato l'assenza di correlazione di un mismatch allelico, sia ad alta che a bassa risoluzione, sui loci HLA-A, B, DRB1, DQ, DP ed il rischio di rigetto, dimostrando un impatto solo per un mismatch allelico sul locus HLA-C ad alta o bassa risoluzione;¹⁴

omozigosi del ricevente sul locus HLA di classe I mismatched accresce il rischio di rigetto in confronto a riceventi eterozigoti, poiché la disparità nei riceventi omozigoti può evocare una risposta cellulare T anti-donatore da parte delle cellule T del ricevente;¹²

una incompatibilità allelica ad alta risoluzione per i loci HLA di classe I e II non correla con il rischio di rigetto, mentre un mismatch allelico a bassa risoluzione sul locus HLA-C, ma non un mismatched alta risoluzione, si

associa significativamente col rischio di rigetto.¹⁴ Questo terzo aspetto di un'assenza di beneficio da una tipizzazione ad alta risoluzione dei loci HLA-A e B sulla valutazione del rischio di rigetto rispetto ad una tipizzazione a bassa risoluzione dei medesimi loci è stato recentemente confermato in uno studio retrospettivo su 65 trapianti da sangue di cordone ombelicale (*Liao C et al. Bone Marrow Transplant 2007;40:201-8*);

un quarto effetto qualitativo della disparità HLA sul rischio di rigetto è stato dimostrato nel 2004 e consiste nella diversa immunogenicità degli alleli HLA-DPB1, i quali possono essere suddivisi in alleli fortemente immunogeni, mediamente immunogeni e scarsamente immunogeni.¹⁵ Questi 3 gruppi di alleli possono presentarsi in 6 differenti combinazioni nelle cellule diploidi. Nell'ambito di coppie donatore-ricevente è possibile classificare quindi i mismatches per il locus HLA-DPB1 come permissivi o non permissivi in direzione graft-versus-host e host-versus-graft. Nel 2006 Fleischhauer K et al. hanno dimostrato in pazienti con β talassemia trapiantati da donatore non correlato come il rischio di rigetto fosse correlato esattamente con una disparità non permissiva sul locus HLA-DBP1 nella direzione ricevente-versus-donatore in confronto alle coppie matched permissive.¹³

Omozigosità dei ligandi HLA di classe I dei KIR in riceventi talassemici

Nel 2007 è stato documentato in 45 pazienti beta talassemici trapiantati di MO da donatore non correlato HLA-identico come l'omozigosità C1/C1 o C2/C2 dei ligandi HLA di classe I dei KIR inibitori nei pazienti fosse correlata al rischio di rigetto primario o secondario (*Nasa G et al. Biol Blood Marrow Transplant 2007;13:1358-68*).

Alloimmunizzazione trasfusionale

Può verificarsi in caso di antigeni trapianto in comune tra i donatori di sangue ed il donatore di CSE. È possibile individuare questo tipo di alloimmunizzazione mediante la ricerca nel ricevente di anticorpi anti-HLA del donatore. Il rigetto in questi casi è mediato da cellule T memoria del ricevente che sopravvivono al condizionamento e da anticorpi diretti verso antigeni di superficie delle cellule infuse del donatore. Storicamente il ruolo della alloimmunizzazione trasfusionale pre-trapianto nel rigetto è stato identificato da Storb R *et al.* nel 1983 in trapianti di MO HLA-identici in pazienti con anemia aplastica severa (SAA).

Condizionamenti ad intensità ridotta

In caso di condizionamenti ad intensità ridotta un più ampio numero di cellule T del ricevente sopravvive alla terapia. Numerose sono le pubblicazioni che hanno dimostrato un più alto rischio di rigetto con l'avvento di questi regimi. Già sul finire degli anni '80 fu evidente che una esposizione a più alte dosi di TBI era associata ad un più basso rischio di rigetto. Storb *et al.* nel 1983 avevano documentato un più alto rischio di rigetto in pazienti con SAA condizionati con sola ciclofosfamida rispetto ai pazienti affetti da malattie oncoematologiche condizionati con combinazioni di chemioterapici spesso includenti la TBI. Altri Autori hanno dimostrato a partire dai primi anni del 2000 un più alto rischio di rigetto in pazienti condizionati con regimi non mieloablativi (Mc Sweeney PA *et al.* *Blood* 2001;97:3390-400. Maris MB *et al.* *Blood* 2003;102:3447-54).

Il numero di cellule T nell'inoculo

La deplezione di cellule T nell'inoculo si associa ad un più alto rischio di rigetto che varia tra il 10 ed il 30% in caso di riceventi MO HLA-identico (Kernan NA *et al.* *Blood* 1989; 74: 2227-2236). Una T deplezione parziale si associa ad un rischio minore di rigetto se paragonata ad una T deplezione totale (Lowenberg B *et al.* *Bone Marrow Transplant* 1986;1:133-40. Shattenberg A *et al.* *Blood* 1990;75:1356-63. Verdonck CF *et al.* *Blood* 1994;83:3090-6). Infine, un numero di cellule CD3⁺ ≤0,2x10⁶/kg nell'inoculo è il più critico fattore predittivo di rigetto dopo trapianto di CSE mobilizzate da SP con G-CSF e T-depletate mediante selezione positiva delle cellule CD34⁺ da donatore sibling HLA-identico (Urbano-Ispizua A *et al.* *Blood* 2001;97:383-7).

Il numero di CSE nell'inoculo

Il numero di CSE infuse è particolarmente importante quando viene impiegato MO T-depleto poiché la manipolazione può determinare una indesiderata perdita cellulare. L'uso di CSE mobilizzate mediante G-CSF permette di superare questo ostacolo. Dati di trapianto di SCO dimostrano che il numero di CSE è cruciale per la probabilità di ripresa leucocitaria sia in pazienti pediatriche che adulti. Tanto il numero delle cellule nucleate (≤2x10⁷/kg), quanto quello delle cellule CD34⁺ (≤1,7x10⁵/kg) che delle cellule formanti colonie granulocito-macrofagiche (>2x10⁴/kg) è stato riconosciuto influenzare l'attecchimento (Gluckman E *et al.* *Exp Hematol* 2004;32:397-407. Wagner JE *et al.* *Blood* 2002;100:1611-8. Iori AP *et al.* *Bone Marrow Transplant* 2004;33:1097, rispettivamente). Infine, è stato dimostrato come sia possibile trapiantare con

successo da MO attraverso la barriera dell'HLA incompatibilità incrementando il numero delle cellule infuse. In particolare, le CSE CD34⁺ possono bloccare la funzione delle cellule T residuali del ricevente attraverso un effetto "veto" che conduce all'apoptosi delle cellule T del ricevente reattive verso il donatore. Nei trapianti aploidentici T depleti le CSE CD34⁺ del donatore sono la principale sorgente di cellule NK favorevoli l'attecchimento (Reisner Y and Martelli MF. *Immunol Today* 1995;16:437-40).

I livelli di chimerismo cellulare T E NK del donatore

È fondamentale ottenere la tolleranza di cellule T del donatore da parte del ricevente al fine di stabilire una emopoiesi a lungo termine nel trapianto non mieloablato. Childs R *et al.* (*Blood* 1999;94:3234-41) e Baron F *et al.* (*Blood* 2004;104:2254-62) hanno dimostrato che i riceventi che non raggiungono precocemente dopo trapianto un elevato grado di chimerismo cellulare T del donatore sono a rischio di rigetto. In particolare, il livello di chimerismo cellulare T del donatore >50% al g+14 dal trapianto risultava significativamente associato ad un più basso rischio di rigetto. Lo stato immune del ricevente e la composizione dell'inoculo emergevano come i fattori influenzanti l'attecchimento dopo trapianto non mieloablato. Le medesime osservazioni sul ruolo del precoce livello di chimerismo cellulare T del donatore come fattore predittivo di rigetto sono state fatte anche da Matthes-Martin S *et al.* (*Leukemia* 2003;17:1934-42) in un lavoro che dimostrava come il livello di chimerismo cellulare T al g+28 correlasse col rischio di rigetto tardivo in pazienti pediatrici dopo condizionamento ad intensità ridotta, e da Fernandez-Aviles F *et al.* (*Leukemia* 2003;17:613-20), che rilevavano come un chimeri-

simo cellulare T del donatore <70% si associasse a rigetto dopo trapianto di cellule CD34⁺ mobilizzate con G-CSF. Gli stessi Baron F *et al.* e Matthes-Martin S *et al.* hanno inoltre documentato il ruolo di bassi livelli di chimerismo cellulare NK del donatore come fattore predittivo di rigetto. Il primo dimostrava che al g+14 livelli di chimerismo cellulare NK del donatore <50% erano significativamente associati al rischio di rigetto dopo condizionamento non mieloablato, mentre il secondo dimostrava che livelli bassi di chimerismo cellulare NK del donatore al g +28 erano significativamente associati con rigetto tardivo in pazienti pediatrici dopo condizionamento ad intensità ridotta.

Bibliografia

1. Jabbour E, Rondon G, Anderlini P, et al. Treatment of donor graft failure with nonmyeloablative conditioning of fludarabine, antithymocyte globulin and a second allogeneic hematopoietic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:431-5.
2. Heinzlmann F, Lang PJ, Ottinger H, et al. Immunosuppressive total lymphoid irradiation-based reconditioning regimens enable engraftment after graft rejection or graft failure in patients treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;70:523-8.
3. Byrne BJ, Horwitz M, Long GD, et al. Outcomes of a second nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation following graft rejection. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:39-43.
4. Masmas TN, Petersen SL, Madsen HO, et al. Graft rejection after hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Am J Hematol* 2008;83:563-9.
5. Velardi A, Ruggeri L, Capanni M, et al. Natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplantation. *Hematology (Am Soc Educ Program)* 2004;337-41.
6. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007;21:1733-8.
7. Gregori S, Bacchetta R, Hauben E, et al. Regulatory T cells: prospective for clinical application in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2005;12:451-6.
8. Nguyen VH, Zeise R, Negrin RS. Role of naturally arising regulatory T cells in hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:995-1009.
9. Shaffer J, Villard J, Means TK, et al. Regulatory T-cell recovery in recipients of haploidentical nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation with a humanized anti-CD2 mAb, MEDI-507, with or without fludarabine. *Exp Hematol* 2007;35:1140-52.

10. Fleischhauer K, Kernan NA, O'Relley R, et al. Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. *N Engl J Med* 1990;323:1818-22.
11. Sobecks RM, Bail EJ, Askar M, et al. Influence of killer immunoglobulin-like receptor / HLA ligand matching on achievement of T-cell complete donor chimerism in related donor nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:709-14.
12. Petersdorf EW, Hansen JA, Martin PJ, et al. Major-Histocompatibility-Complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2001;345:1794-800.
13. Fleischhauer K, Locatelli F, Zecca M, et al. Graft rejection after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia is associated with nonpermissive HLA-DPB1 disparity in host-versus-graft direction. *Blood* 2006;107:2984-92.
14. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplant outcome. *Blood* 2004;104:1923-30.
15. Zino E, Frumento G, Marktel S, et al. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation. *Blood* 2004;103:1417-24.