

TRATTAMENTO MULTIMODALE PER IL RIGETTO ACUTO ANTICORPO-MEDIATO NEL TRAPIANTO DI RENE: TERAPIA DI SALVATAGGIO CON PLASMAFERESI, FOTOAFERESI E IMMUNOGLOBULINE ENDOVENOSE

Quirino Lai¹, Renzo Pretagostini¹, Maria Gozzer², Paola Cinti³, Donatella Meo², Fabiana Vita², Manas Shafii Bafti², Luca Poli¹, Gilnardo Novelli¹, Massimo Rossi¹, Gabriella Girelli², Pasquale B. Berloco¹

¹U.O.C. di Chirurgia Generale e Trapianti d'Organo, Sapienza Università di Roma, Roma

²U.O.C. di Immunematologia e Medicina TrASFusionale, Sapienza Università di Roma, Roma

³Laboratorio di Immunologia dei Trapianti d'Organo, Sapienza Università di Roma, Roma

Multimodal treatment for acute antibody-mediated renal transplant rejection: successful rescue therapy with combined plasmapheresis, photopheresis and intravenous immunoglobulin

The fundamental role of antibodies in the development of acute graft rejection has been established recently. Antibody-mediated acute rejection may develop at any time during the post-transplant period. Several therapeutic approaches have been proposed in the last decades. However, there is no standardized therapy. The aim of this study is to report the Sapienza University experience of combined plasma treatment and high-dose intravenous immunoglobulin ± extracorporeal photopheresis.

From January 2006 to September 2009, 6 patients were treated at Sapienza University. In 5 cases (83%) complete regression of the acute rejection was observed, followed by stable renal function (median creatinine value at 1-year follow-up: 1.5 mg/dL). No adverse events were reported.

Our approach seems to give good results in terms of graft survival and procedure safety. Further studies on a larger number of patients will be needed to confirm the validity of these findings. Moreover, comparison between our protocol and other treatments is necessary.

Conflict of interest: None

Financial support: No financial support has been received for the preparation of this article.

KEY WORDS:

Graft function,
Graft loss,
Cellular rejection

PAROLE CHIAVE:

Funzione del
graft,
Perdita del graft,
Rigetto cellulare

Indirizzo degli Autori:

Dr. Quirino Lai
Dipartimento di Chirurgia Generale e
Trapianti d'Organo
Sapienza Università di Roma
Viale del Policlinico 155
00161 Roma
e-mail: lai.quirino@libero.it

INTRODUZIONE

I linfociti T svolgono un ruolo fondamentale nel rigetto del trapianto d'organo. Infatti, in modelli animali o in esseri umani privi di tali cellule, gli organi trapiantati non vengono rigettati. I farmaci immunosoppressivi attualmente in commercio, agendo quasi esclusivamente su questa tipologia di cellule, hanno permesso una significativa riduzione dell'incidenza del rigetto cellulare (1). Recenti studi hanno evidenziato che anche gli anticorpi svolgono un ruolo importante nel rigetto d'organo, dimostrando la presenza di anticorpi circolanti

anti-HLA del donatore (2) e della componente C4d (3). Il rigetto acuto anticorpo-mediato (RAAM) si manifesta in circa il 7% dei pazienti trapiantati (4), potendosi presentare in qualsiasi spazio temporale dopo il trapianto (da giorni ad anni). La sua diagnosi è posta sulla presenza contemporanea di segni clinici, sierologici, istologici e immunoistochimici (5). Numerosi approcci terapeutici sono stati proposti per il trattamento di questo tipo di rigetto che risulta spesso resistente alle comuni terapie farmacologiche. In particolare, il *plasma exchange* (PE) o il plasma-trattamento (PT) (6), solitamente associati alla somministrazione di

immunoglobuline per via endovenosa (IGEV) (7), hanno evidenziato buoni risultati. Allo stesso modo, la fotoferesi (FCE) è stata proposta come terapia nel rigetto dei trapianti di organo solido (8). Attualmente, non sono riportati in letteratura studi prospettici o multicentrici su tali trattamenti e l'associazione tra procedure aferetiche, IGEV e FCE non è mai stata documentata.

Obiettivo di questo studio è quello di descrivere l'esperienza monocentrica della Sapienza Università di Roma nel trattamento del RAAM, valutando l'efficacia dell'approccio combinato con PT + IGEV + FCE in termini di sopravvivenza del paziente e dell'organo trapiantato e in termini di sicurezza a breve e a medio termine.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Un'analisi retrospettiva è stata effettuata su una coorte di 144 pazienti sottoposti a trapianto di rene da donatore cadavere tra il Gennaio 2006 e il Settembre 2009 presso il Centro Trapianti d'Organo della Sapienza Università di Roma. In 6 casi (4.2%), è stato osservato un RAAM: questi pazienti sono stati selezionati per l'ulteriore analisi.

Studi sugli anticorpi

Campioni sequenziali di sieri sono stati raccolti nel periodo pre-trapianto in tutti i pazienti per effettuare il *Panel Reactive Antibody* (PRA) e la ricerca della specificità degli anticorpi anti-HLA. In tutti i casi, prima del trapianto, il *crossmatch* diretto donatore-ricevente è risultato negativo. Il *crossmatch* è stato effettuato tramite citotossicità, utilizzando linfociti T e B provenienti dal donatore, oppure tramite citometria di flusso, utilizzando anticorpi murini anti-CD3 e anti-CD19 umani, per definire, rispettivamente, i linfociti T e i linfociti B. I sieri post-trapianto sono stati ottenuti in presenza di sospetto clinico di RAAM e a intervalli di 15 e 30 giorni e 3, 6 e 12 mesi dal trapianto.

Immunosoppressione

Tutti i pazienti hanno ricevuto una terapia di induzione con basiliximab 20 mg al momento del trapianto e in quarta giornata post-operatoria. La terapia immunosoppressiva è consistita in un inibitore della calcineurina, in acido micofenolico e in steroidi. La dose iniziale di ciclosporina è stata di 7 mg/kg due volte al giorno, adeguando la dose per mantenere un dosaggio ematico di 700-1200 ng/mL nel primo mese e, successivamente, tra i 400 e i 600 ng/mL. La dose iniziale di

tacrolimus è stata di 0.15 mg/kg due volte al giorno, adeguando la posologia per mantenere un dosaggio ematico di 8-10 ng/mL nel primo mese e, successivamente, tra 4 e 8 ng/mL. L'acido micofenolico è stato somministrato sotto forma di mofetile micofenolato (1 gr 2 volte al giorno) o di micofenolato sodico (720 mg 2 volte al giorno). Il dosaggio è stato modificato in base alla conta dei globuli bianchi. Gli steroidi sono stati progressivamente scalati fino alla dose di 5-10 mg/die a 30 giorni dal trapianto.

Protocolli di trattamento

In caso di diagnosi di RAAM, boli da 1 gr di steroidi sono stati somministrati per 3 giorni consecutivi.

Inoltre, tutti i pazienti sono stati sottoposti a 3 procedure consecutive di PT seguite da un trattamento a giorni alterni fino alla negativizzazione del *crossmatch*. I pazienti sono stati valutati durante e dopo i trattamenti per l'eventuale comparsa di eventi avversi. Dopo i primi tre trattamenti e, successivamente, una volta alla settimana fino alla sospensione del PT si è eseguita una lenta infusione di IGEV al dosaggio di 400 mg/kg.

Dal Giugno 2008, questo protocollo è stato modificato con l'aggiunta della FCE: durante le prime 2 settimane di trattamento sono state effettuate, dopo 3 procedure di PT, 2 FCE consecutive. Altre due sedute consecutive di FCE sono state effettuate ogni 15 giorni per 3 volte (consolidamento) e, infine, altre 2 procedure sono state effettuate ogni mese per 3 mesi (mantenimento).

Durante la procedura di FCE, le cellule mononucleate del sangue periferico del ricevente sono state raccolte mediante un separatore a flusso continuo e, al termine della procedura, sono state trattate con l'8-mettossipsoralene (8-MOP), esposte a luce ultravioletta-A (UVA, 315-400 nm) e reinfuse al paziente.

Esame istologico

La biopsia è stata effettuata al momento della diagnosi clinica di rigetto. La presenza di un RAAM è stata diagnosticata in accordo con i criteri di Banff: presenza di anticorpi circolanti specifici per il donatore, positività per il C4d all'immunoistochimica e segni istologici quali presenza di severa vasculite, danno endoteliale, trombosi, marginazione di cellule infiammatorie nei capillari e glomerulite (5).

RISULTATI

Sei pazienti (4.2% dell'intera coorte analizzata) hanno presentato la comparsa di rigetto anticorpo-

TABELLA I - VARIABILI DEL RICEVENTE, DEL DONATORE E DEL TRAPIANTO. LE VARIABILI CATEGORICHE SONO STATE RAPPRESENTATE IN NUMERI DI CASI E PERCENTUALI; LE VARIABILI CONTINUE IN VALORI MEDIANI E RANGES

Età del ricevente (anni)	40.5 (23-47)
Sesso del ricevente (M/F) (%)	2/4 (33/67)
Razza del ricevente (%)	
caucasica	4 (67)
asiatica	2 (33)
Positività del PRA al trapianto ($\geq 10\%$) (%)	2 (33%)
Picco storico di PRA I classe	20 (0-60)
Picco storico di PRA II classe	15 (0-58)
Mismatch HLA	3 (3-4)
Età del donatore (anni)	46.5 (20-63)
Sesso del donatore (M/F) (%)	1/5 (17/83)
Ischemia fredda (ore)	13 (12-15)
Terapia con ciclosporina/tacrolimus (%)	3/3 (50/50)
Livelli di ciclosporina prima del RAAM*	860 (640-1125)
Livelli di tacrolimus prima del RAAM*	8.8 (8.3-10.4)
Dialisi entro la prima settimana dal trapianto (%)	0 (-)
Giorni tra trapianto e RAAM	10 (8-729)
RAAM tardivo	2 (33%)
Crossmatch T all'inizio del RAAM	100 (60-100)
Crossmatch B all'inizio del RAAM	85 (80-100)
Positività alla biopsia per il C4d	2(+) [2(+)-3(+)]
Creatinina al momento del RAAM (mg/mL)	4.2 (3.1-5.2)
Numero di trattamenti con PT	5.5 (3-10)
Numero di trattamenti con FCE*	4 (2-7)
Periodo di trattamento con PT	14.5 (3-27)
Giorni per la negativizzazione del crossmatch**	30 (6-35)
Infezioni maggiori nel periodo del trattamento (%)	2 (33)
Positivizzazione CMV nel periodo del trattamento (%)	3 (50)
Perdita del graft per il RAAM	1 (17)
Creatinina a 3 mesi (mg/mL)**	1.9 (1.1-2.7)
Creatinina a 1 anno (mg/mL)**	1.5 (1.0-2.5)

* 3 pazienti; ** 5 pazienti

Abbreviazioni: PRA: panel reactive antibody; HLA: human leucocyte antigen; RAAM: rigetto acuto anticorpo-mediato; PT: plasma-trattamento; FCE: fotoaferesi; CMV: citomegalovirus.

mediato. Il periodo mediano di *follow-up* è stato di 37.5 mesi (23-56) dal trapianto, e di 23.5 mesi (18-56) dal RAAM.

I dati demografici di ricevente e donatore e i risultati ottenuti sono riportati nella Tabella I.

L'età mediana dei riceventi è stata di 40.5 anni, con una prevalenza del sesso femminile (67%). Il numero di *missmatches* è stato di 3-4.

In 3 pazienti (50%) si è evidenziato un PRA positivo su siero storico (70, 40 e 58%, rispettivamente), ma solo in 2 di questi pazienti il siero, al momento del trapianto, è risultato positivo al PRA (60 e 42%).

In tutti i casi si è avuta un'immediata ripresa della funzione del rene trapiantato.

In 4 casi, il rigetto umorale si è manifestato nell'immediato periodo post-operatorio (mediana: 10 giorni). I valori mediani di ciclosporina e di tacrolimus al momento dell'insorgenza del RAAM sono stati rispettivamente pari a 860 e a 8.8 ng/mL. In 2 casi, il RAAM è insorto tardivamente (12 e 24 mesi). La terapia immunosoppressiva era stata sospesa volontariamente dal paziente.

All'insorgenza del rigetto, il *crossmatch* diretto donatore-ricevente è risultato sempre positivo, con un valore mediano del 100% per i linfociti T e dell'85% per i linfociti B. Alla biopsia, il C4d è sempre risultato positivo. La creatinina sierica mediana era di 4.2 mg/dL e la diuresi, seppur ridotta, era conservata.

Il paziente che, al momento del trapianto, presentava una positività al PRA del 60% ha avuto la perdita dell'organo (17%). Negli altri 5 pazienti, dopo 14.5 giorni di trattamento con PT, il *crossmatch* si è negativizzato con progressivo ripristino della funzione renale (1.9 mg/dL a 3 mesi e 1.5 mg/dL a 1 anno dal trattamento).

Due pazienti (33%) hanno avuto una complicanza infettiva: 1 caso di gastrite fungina e 1 caso di polmonite batterica, entrambi risolti con terapia medica. In 3 casi (50%) si è osservata una positivizzazione del CMV, con un picco mediano di 15.000 gen/mL alla PCR. In nessun caso si è osservata una malattia citomegalica.

DISCUSSIONE

Il RAAM rappresenta una grave complicanza nel trapianto di rene, risultando frequentemente resistente alla terapia cortisonica ed evolvendo verso la perdita dell'organo.

Nell'ultimo decennio, sono stati adottati vari schemi terapeutici. La combinazione di procedure di aferesi con IGEV (9) somministrate a vari dosaggi (10, 11) o l'impiego dell'inibitore del CD-20 (rituximab) (12) han-

no fornito risultati incoraggianti, ma non esiste ancora una terapia riconosciuta universalmente.

Nella maggior parte dei protocolli, l'aferesi rappresenta il cardine terapeutico. Essa, se effettuata precocemente, consente una rapida ed efficace rimozione delle immunoglobuline, permettendo di interrompere l'attivazione del complemento e di ridurre il danno da esso provocato.

A riprova di tale fatto, nella nostra esperienza, l'effettuazione dell'aferesi è sempre avvenuta quando il paziente presentava ancora una diuresi conservata, non avendo, quindi, ancora sviluppato un danno renale difficilmente reversibile.

In letteratura, sono stati adottati vari tipi di aferesi. Il PE presenta il vantaggio di essere poco costoso, ma è gravato da un maggiore numero di complicanze, soprattutto infettive, e necessita della somministrazione di emoderivati (albumina), con un potenziale rischio aggiuntivo di infezione. Inoltre, il PE può associarsi anche a una perdita di proteine plasmatiche come i fattori della coagulazione.

Il PT, anche se più costoso, non richiede la supplementazione con albumina e presenta minori rischi infettivi ed ematologici: attualmente, esso rappresenta l'approccio terapeutico da noi utilizzato.

In una nostra precedente esperienza (9), l'aferesi era effettuata tramite immunoassorbimento con proteina A. Quest'ultimo consente una rimozione selettiva delle IgG, riducendo al minimo i rischi di infezione. Tuttavia, i costi molto elevati della procedura ne hanno determinato la dismissione nella nostra pratica clinica.

La base dell'utilizzo delle IGEV risiede nella loro capacità di ridurre la produzione degli anticorpi coinvolti nel trapianto attraverso un meccanismo di *feed-back* negativo.

Vari Autori hanno riportato il ruolo della FCE nel trattamento dei rigetti acuti refrattari nei trapianti d'organo (8, 13, 14). La FCE rappresenta un trattamento non citotossico immunomodulante; tramite la sua azione, specifici linfociti patogenici vengono inattivati, arrestando la produzione di nuovi anticorpi circolanti e agendo in contemporanea anche su un'eventuale concomitante componente cellulo-mediata del rigetto.

Nella nostra esperienza, la combinazione di FCE con PT e IGEV appare un approccio innovativo.

I risultati riportati dimostrano la validità e la sicurezza di questa combinazione terapeutica con l'83% di regressione del rigetto. Non si sono osservati eventi avversi legati alla procedura. In nessun paziente è stata documentata una malattia citomegalica, nonostante, nel 50% dei casi, si sia evidenziata una sua positivizzazione sierica.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti tramite questo protocollo evidenziano, nonostante gli alti costi, buoni risultati in termini di sopravvivenza. Lo studio rappresenta una piccola esperienza monocentrica. La letteratura in questa area è limitata. Sono necessari nuovi studi prospettici, sia per validare l'approccio combinato PT + FCE + IGEV, sia per valutare l'eventuale comparsa di eventi avversi a lungo termine.

RIASSUNTO

Nel trapianto di rene, recenti evidenze hanno mostrato come gli anticorpi svolgano un ruolo fondamentale nella comparsa del rigetto acuto anticorpo-mediato (RAAM). Tuttavia, ancora non esiste una terapia standardizzata. Procedure aferetiche, in combinazione con la somministrazione di immunoglobuline endovenose (IGEV), hanno dato buoni risultati in termini di sopravvivenza dell'organo trapiantato. Allo stesso modo, la fotoaferesi ha evidenziato una buona efficacia contro il rigetto. Obiettivo di questo studio è quello di descrivere l'esperienza monocentrica di La Sapienza Università di Roma riguardo all'utilizzo combinato di plasma-trattamento, fotoaferesi e IGEV. Sei pazienti sono stati trattati tra il Gennaio 2006 e il Settembre 2009. In 5 casi (83%) si è assistito alla regressione del rigetto con un ripristino stabile della funzione renale a distanza (valore mediano di creatinina a 1 anno: 1.5 mg/dL). Non si sono osservati eventi avversi legati alla procedura. In nessun paziente è stata documentata una malattia citomegalica, sebbene, nel 50% dei casi, si sia evidenziata una sua positivizzazione sierica. Pur considerando la retrospettività dello studio e l'esiguo numero della popolazione arruolata, la combinazione terapeutica descritta sembra essere un valido approccio per il controllo del RAAM. Riteniamo necessari ulteriori studi per confermare la validità di questo approccio terapeutico.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

CONTRIBUTI ECONOMICI AGLI AUTORI

Nessun contributo economico è stato fornito per la realizzazione di questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

1. Colvin RB, Smith RN. Antibody mediated organ allograft rejection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 807-17.
2. Cinti P, Pretagostini R, Lai Q, et al. Alloantibodies and outcomes of deceased donor kidney allografts. *Hum Immunol* 2009; 70: 651-4.
3. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2208-14.
4. Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, et al. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 1033-41.
5. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, et al. Antibody-mediated rejection criteria – an addition to the Banff'97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; 3: 708-14.
6. Singha N, Pirscha J, Samaniegob M. Antibody-mediated rejection: treatment alternatives and outcomes. *Transpl Rev* 2009; 23: 34-46.
7. Rocha PN, Butterly DW, Greenberg A, et al. Beneficial effect of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin on renal allograft survival of patients with acute humoral rejection. *Transplantation* 2003; 75: 1490-5.
8. Kumlien G, Genberg H, Shanwell A, Tydén G. Photopheresis for the treatment of refractory renal graft rejection. *Transplantation* 2005; 79: 123-5.
9. Pretagostini R, Berloco P, Poli L, et al. Immunoabsorption with protein A in humoral rejection of kidney transplants. *ASAIO J* 1996; 42: M645-8.
10. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation* 2001; 71: 652-8.
11. Jordan SC, Quartel AW, Czer LSC, et al. Posttransplant therapy using high-dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control acute humoral rejection in renal and cardiac allograft recipients and potential mechanism of action. *Transplantation* 1998; 66: 800-5.
12. Becker YT, Becker BN, Pirsch JD, Sollinger H. Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant* 2004; 4: 996-1001.
13. Genberg H, Kumlien G, Shanwell A, Tydén G. Refractory acute renal allograft rejection successfully treated with photopheresis. *Transplant Proc* 2005; 37: 3288-9.
14. Jardine MJ, Bhandari S, Wyburn KR, Misra AK, McKenzie PR, Eris JM. Photopheresis therapy for problematic renal allograft rejection. *J Clin Apher* 2009; 24: 161-9.