



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
DOTTORATO DI RICERCA IN
RICERCA MULTIDISCIPLINARE AVANZATA NEI TRAPIANTI
Ciclo XXVIII

Dott.ssa CONCETTA FRANCHINA

APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE NELLA DIAGNOSI DI
LABORATORIO DELLE PATOLOGIE GASTROINTESTINALI DEL
SOGGETTO TRAPIANTATO

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore:
Chiar.ma Prof.ssa Stefania Stefani

Tutor:
Chiar.mo Prof. Guido Scalia

TRIENNIO 2012-2015

INDICE

| | |
|--------------------------------------------------|----------------|
| 1. INTRODUZIONE | pag. 3 |
| 2. CANDIDATO AL TRAPIANTO RENALE | pag.6 |
| 3. TRAPIANTO DI RENE | pag. 10 |
| 3.1. Da donatore cadavere | pag. 10 |
| 3.2. Da donatore vivente | pag. 12 |
| 4. TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA | pag. 14 |
| 5. RISPOSTA IMMUNITARIA | pag. 18 |
| 6. PATOLOGIE GASTROINTESTINALI | pag. 21 |
| 6.1. <i>Graft-versus-host disease</i> (GVHD) | pag. 22 |
| 6.1.1. GVHD acuta | pag. 23 |
| 6.1.2. GVHD cronica | pag. 24 |
| 6.2. Da infezioni | pag. 25 |
| 6.3. Iatrogene | pag. 29 |
| 6.4. Simil inflammatory bowel disease | pag. 32 |
| 7. SCOPO DEL LAVORO | pag. 33 |
| 8. MATERIALI E METODI | pag. 34 |
| 8.1. Popolazione | pag. 34 |
| 8.2. Metodi | pag. 35 |
| 8.2.1. Indagini di istologia e immunoistochimica | pag. 35 |
| 8.2.2. Indagini di virologia molecolare | pag. 37 |
| 9. RISULTATI | pag. 40 |
| 10. DISCUSSIONE | pag. 45 |
| 11. BIBLIOGRAFIA | pag. 49 |

1. INTRODUZIONE

La terapia sostitutiva con trapianto d'organo è il trattamento d'elezione per i pazienti con insufficienza renale cronica, in quanto è capace di restituire loro una normale funzionalità renale e permettere alla maggior parte di essi il ritorno a una vita socialmente produttiva e, di conseguenza, una maggiore aspettativa di vita.

Attualmente gli organi o i tessuti provenienti dalla stessa specie, cioè uomo, che possono essere comunemente trapiantati o innestati nell'organismo umano sono venticinque. Questo tipo di trapianto è detto allogenico. In un futuro prossimo sarà possibile eseguire gli xenotrapianti cioè i trapianti di organi provenienti da animali di specie diversa resi transgenici.

Il trapianto di rene, sia da donatore cadavere che da donatore vivente, è il trapianto d'organo più comune al mondo. Dall'effettuazione del primo trapianto, avvenuto a Boston nel 1954, più di 500.000 persone nel mondo sono state sottoposte a questa terapia. L'intervento consiste nel trapiantare un rene sano nella parte anteriore dell'addome a livello della fossa iliaca del paziente. È stato calcolato che nei pazienti trapiantati il tasso di mortalità è inferiore del 50-80% rispetto ai pazienti in lista d'attesa^[1], tuttavia esiste ancora oggi una notevole discrepanza tra numero di pazienti in attesa di trapianto e organi disponibili. I dati provenienti dal Centro Nazionale Trapianti indicano che, nel 2014, in Italia, a fronte di 2985 trapianti circa il 48% sono stati di rene (1439), senza considerare i trapianti multiorgano comprendente il rene^[2]. Si parla d'insufficienza renale quando i reni non sono più in grado di svolgere le loro funzioni. Sono molte le condizioni che portano all'insufficienza renale; alcune possono essere congenite o ereditarie, altre, le più frequenti, acquisite. Tra queste ultime abbiamo il diabete insulino-dipendente (42%), le nefropatie vascolari (25,5%) e le glomerulonefriti (8,4%). L'incidenza di queste nefropatie varia in relazione a sesso, età, razza e condizioni socio-sanitarie^[1].

Il successo nel recupero e nel mantenimento delle funzioni del nuovo rene, oltre al miglioramento delle tecniche chirurgiche, è da attribuire soprattutto alla scoperta dei farmaci immunosoppressivi che hanno sensibilmente diminuito il rigetto cellulare acuto. La terapia antirigetto (o terapia immunosoppressiva) inizia durante l'intervento di trapianto e prosegue per tutta la vita del paziente trapiantato, mediante la combinazione di alcuni farmaci somministrati in dosaggi appropriati, in modo che siano inibite alcune funzioni del sistema immunitario che, altrimenti, riconoscerebbero il nuovo organo come estraneo tendendo al suo rigetto. Le conoscenze scientifiche in questo campo hanno fatto passi avanti molto importanti negli ultimi anni, tanto da ridurre l'incidenza del rigetto acuto dal 50-60% di 10-15 anni fa, all'attuale 15-20% o meno, in alcune casistiche^[3]. La continua ricerca scientifica in questo campo ha inoltre lo scopo di sperimentare terapie sempre più efficaci, con minori effetti collaterali e meglio tollerate dal paziente. Nonostante i progressi realizzati in quest'ambito, le problematiche nella fase post-trapianto risultano numerose e tra le più difficili da affrontare dal punto di vista clinico. Alla progressiva riduzione dell'incidenza del rigetto acuto ha fatto seguito un significativo incremento delle patologie infettive, in particolare delle malattie associate a virus latenti^[4]. Si stima che circa i due terzi dei pazienti trapiantati incorra in almeno un episodio infettivo entro il primo anno dopo il trapianto. La terapia antirigetto, infatti, pur garantendo un'immunosoppressione efficace, facilita l'insorgenza di infezioni che rappresentano la seconda causa di morte nei pazienti trapiantati^[3].

Oltre alle complicanze infettive, immunologiche e chirurgiche, il soggetto trapiantato è a rischio di patologie cardiovascolari, neoplastiche e gastrointestinali. Quest'ultime rappresentano una tra le cause maggiori di morbilità e mortalità.

La causa di un solo recupero parziale della funzione renale può essere ascrivibile a diversi fattori che spesso si sommano fra loro. Distinguiamo lesioni renali preesistenti nel donatore (donatori anziani, donatori con storia di ipertensione o patologia

cardiovascolare e donatori deceduti per cause vascolari cerebrali) e lesioni renali sovrapposte (necrosi tubulare acuta, rigetto acuto e cronico, nefrotossicità da inibitori della calcineurina e altre)^[5].

2. CANDIDATO AL TRAPIANTO RENALE

Il paziente candidato ad un trapianto d'organo è un individuo affetto da patologie che abbiano determinato la disfunzione irreversibile di uno o più organi. Per ogni organo esistono criteri specifici che permettono l'inclusione o l'esclusione di un dato paziente nelle liste d'attesa.

I candidati al trapianto di rene, di cui è stata accertata un'insufficienza renale cronica ed irreversibile, devono sottoporsi ad una serie di esami clinico-strumentali che escludano l'eventuale presenza di malattie che controindichino l'intervento e ad accertamenti immunologici che documentino l'emogruppo ABO e il sistema HLA. Dopo l'esecuzione di tali accertamenti i pazienti dializzati vengono inclusi in una lista d'attesa di trapianto da donatore cadavere e vi permangono per un periodo d'attesa variabile, che dipenderà dalle caratteristiche genetiche ed immunologiche del ricevente e dal numero di reni disponibili. I reni vengono assegnati al ricevente principalmente in base alla tipizzazione tissutale, che prevede la compatibilità del gruppo ABO e del sistema HLA. Il successo del trapiantato, indipendentemente dal tipo di organo trapiantato, da vivente o da cadavere, è legato al grado di similarità genetica tra donatore e ricevente.

Il sistema HLA rappresenta nell'uomo il Complesso Maggiore di Istocompatibilità, costituito da due gruppi di antigeni presenti sulla superficie cellulare. Gli alleli HLA sono polimorfici, ossia ne esistono numerose varianti. Si distinguono in due classi: gli antigeni di classe I (HLA-A e HLA-B), espressi sulla superficie della maggior parte delle cellule nucleate, e quelli di classe II (HLA-DR), espressi sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene e dei linfociti attivati. Ci sono oltre 80 HLA -A, -B e -DR: questo elevato grado di polimorfismo rende difficile trovare due persone non consanguinee con profilo HLA identico. Questi antigeni vengono considerati gli antigeni principale del trapianto e il matching fra donatore e ricevente può essere

compreso fra 0 e 6. Più alto è il numero di mismatch, minore è la compatibilità e più alto è il rischio di rigetto. Infatti il riconoscimento di quest'ultimi come "non self" da parte dell'organismo ricevente rappresenta il principale meccanismo immunologico che sta alla base del rigetto dell'organo trapiantato. La migliore strategia adottata per ridurre il rischio di rigetto consiste nello scegliere il miglior matching HLA, ossia profilo con il maggior numero di alleli condivisi tra donatori e riceventi^[6]. Un ulteriore test importante per la valutazione della compatibilità e quindi per l'inserimento nelle liste d'attesa è il Cross-matching. Si tratta di un test di laboratorio che stabilisce se il potenziale ricevente possiede anticorpi preformati rivolti verso gli antigeni HLA del donatore. Poiché questo test risulta di fondamentale importanza per la buona riuscita dell'intervento, tutti i pazienti in lista d'attesa per il trapianto da cadavere eseguono periodicamente (ogni tre mesi) il test contro i linfociti di un pannello di controllo. Il livello di anticorpi può essere variabile nel tempo, ma una positività costante costituisce un fattore predittivo di elevata probabilità di rigetto, nonostante la compatibilità ABO e HLA^[7].

Nonostante l'insufficienza renale cronica, esistono, seppur poche, condizioni cliniche che rappresentano una controindicazione al trapianto di rene. Distinguiamo due tipi di controindicazioni:

1. Assolute: neoplasie in atto e ad alto potenziale metastatico, infezioni sistemiche sostenute da agenti infettanti per i quali non esistono opzioni terapeutiche sostenibili, sieropositività da HIV, sieropositività contemporanea da HBsAg e HDV, malattie accertate da prioni, gravi patologie extrarenali, non compliance e abuso di stupefacenti;
2. Relative: età avanzata, disabilità psichiche e ossalosi.

Le patologie neoplastiche rappresentano una controindicazione in quanto la terapia immunosoppressiva incrementerebbe il processo di oncogenesi. A tal proposito, in assenza di recidiva le linee guida indicano un periodo di osservazione di almeno 5

anni^[8]. Anche le infezioni croniche, quali le epatiti virali e la tubercolosi, risentono della terapia immunosoppressiva che porterebbe ad una conseguente replicazione dell'agente etiologico^[9]. Altre controindicazioni sono le patologie extrarenali, come le cardiopatie evolutive, l'aterosclerosi in fase diffusa, l'insufficienza respiratoria cronica e il diabete mellito di tipo II^[10].

Nel 2002, il Centro Nazionale Trapianti ha attivato una serie di protocolli e programmi-pilota per regolamentare le procedure nel trapianto di organo solido in favore di soggetti sieropositivi.

Negli ultimi anni, considerando l'aumentata richiesta di organi, è stata introdotta la possibilità di utilizzare donatori HBsAg positivi, HCV positivi e anti-HBc positivi in riceventi affetti dalla stessa patologia o immuni^[11]. L'utilizzo di questa categoria di donatori presuppone una precisa informazione del ricevente mediante un consenso informato sugli eventuali rischi post trapianto.

Infine, un'altra categoria dei pazienti esclusi fino a qualche anno fa dalla pratica di trapianto è rappresentata dai pazienti HIV positivi, che oggi, invece, possono essere trapiantati anche se solo in casi selezionati, ma comunque con risultati soddisfacenti^[12]. Infatti, tra il 2009 e il 2010 il Centro Nazionale Trapianti ha redatto e pubblicato dei protocolli specifici e un programma nazionale, approvato dalla Conferenza Stato-Regioni e dedicato ai trapianti di rene, rene-pancreas, cuore, polmone e fegato nei soggetti con infezione da HIV. Il documento stabilisce, tra l'altro, i criteri di selezione per l'inserimento del paziente nelle liste d'attesa nazionali e quelli di idoneità per il centro trapianti che intende aderire al programma.

L'esito di un trapianto da donatore cadavere dipende da molteplici fattori, legati in parte alle condizioni del ricevente ed in parte alle caratteristiche del donatore.

L'insufficiente reperimento di donatori, il rapporto rischi/benefici attesi con il trapianto e i tempi di ischemia degli organi condizionano modalità e tempi della valutazione di idoneità del potenziale donatore. Nonostante questi limiti e pur

considerando che nella pratica trapiantologia, anche se viene tenuto un comportamento conforme con l'applicazione delle linee guida, il rischio di trasmissione di patologie sia infettive che neoplastiche è sempre presente; qualsiasi organo prelevato a scopo di trapianto deve avere una buona qualità e non deve esporre il ricevente a rischi inaccettabili. Il processo che porta alla valutazione dell'idoneità del donatore di organi è un processo multifasico e multidisciplinare. Per tale motivo, con la revisione del Dgl 91/99 del marzo 2003, sono state elaborate le Linee Guide^[13] che definiscono 5 livelli di rischio accettabili/non accettabili per l'utilizzo degli organi:

1. Rischio inaccettabile: (criteri di esclusione assoluti);
2. Rischio aumentato ma accettabile: rientrano in quest'ambito quei casi in cui il rischio del non trapianto per il ricevente viene valutato sensibilmente superiore rispetto al rischio del trapianto;
3. Rischio calcolato: rientrano in questo livello i casi in cui la presenza di uno specifico agente patogeno o stato sierologico del donatore è compatibile con il trapianto in riceventi che presentino lo stesso agente o stato sierologico, a prescindere dalle condizioni del ricevente;
4. Rischio non valutabile: casi in cui il processo di valutazione non permette un'adeguata valutazione del rischio per mancanza di uno o più elementi di valutazione. In questi casi l'utilizzo del donatore non è precluso a priori;
5. Rischio standard: casi in cui dal processo di valutazione non emergono fattori di rischio per malattie trasmissibili.

Una controindicazione relativa al trapianto renale è rappresentata dall'età avanzata dei candidati donatori^[8]. Negli anni '80 l'età massima per ricevere un trapianto era di 50 anni; oggi, invece, è di 65 anni. Ci possono essere dei casi di trapianto di pazienti di età superiore ai 70 anni, ma si tratta di casi sporadici e con particolari caratteristiche dei candidati.

3. TRAPIANTO DI RENE

Il trapianto di organi è un intervento chirurgico che consiste nella sostituzione di un organo malato e quindi non più funzionante, con uno sano dello stesso tipo proveniente da un altro individuo che viene chiamato donatore.

Vengono normalmente trapiantati i reni, il cuore, il fegato, i polmoni, il pancreas e l'intestino. Di questi il trapianto di cuore, fegato e polmone costituiscono degli interventi salvavita, mentre il trapianto di rene rappresenta una valida alternativa terapeutica per malati che altrimenti dovrebbero sottoporsi a dialisi, una cura efficace ma molto vincolante per la quale ogni paziente deve sottoporsi a diverse sedute settimanali di 3-4 ore ciascuna. La legge 1 aprile 1999, n.91 “Disposizioni in materia di prelievi e di trapianti di organi e tessuti”^[14] vieta il prelievo delle gonadi (ovaie e testicoli) e del cervello e la manipolazione genetica degli embrioni anche ai fini del trapianto di organo. Negli ultimi dieci anni si è registrato un numero sempre crescente di trapianti effettuati sul territorio nazionale; tuttavia i pazienti in lista d'attesa sono ancora molti e il tempo medio di attesa è alto.

Per la maggior parte degli organi e per i trapianti multiorgano (due o più organi) il prelievo avviene da donatore cadavere, nel caso invece di trapianto di un rene o di una parte del fegato il donatore può essere vivente.

3.1. Trapianto di rene da donatore cadavere

Nel caso in cui il donatore sia deceduto per morte traumatica o per cause cerebrovascolari e abbia espresso in vita la volontà (per iscritto o ai familiari) di donare gli organi dopo la morte (o se non si è espresso ma i familiari non si oppongono) il prelievo degli organi sarà possibile solo dopo l'accertamento di morte e in tempi brevi, in modo da assicurare la funzionalità degli organi da trapiantare. I criteri di accertamento della morte cerebrale sono prestabiliti nel DM 582/94^[15], che prevede

un periodo di osservazione di almeno 6 ore (per gli adulti e i bambini di età maggiore ai 5 anni) da parte di un'equipe formata da tre medici.

Valutata la morte cerebrale e ricevuto l'assenso alla donazione si procede all'espianto dell'organo e alla sua conservazione in uno speciale liquido a bassa temperatura fino al momento in cui verrà portato a temperatura ambiente per essere impiantato. Tale periodo, definito tempo di ischemia fredda, è di circa 18-24h e, naturalmente, più si riduce, migliore e più rapida sarà la sua ripresa funzionale.

Contestualmente all'espianto vengono compiute le procedure d'identificazione del ricevente compatibile. A questo punto viene richiamato il potenziale ricevente per effettuare gli ultimi esami ematochimici e strumentali ed eventualmente l'ultima seduta di dialisi.

Il rene trapiantato viene posizionato in una sede anatomica diversa da quella del rene nativo e precisamente in una delle due fosse iliache, senza ledere il peritoneo (sede extraperitoneale). L'arteria renale è anastomizzata all'arteria iliaca, mentre la vena renale alla vena iliaca esterna del ricevente. In tal modo il sangue riprende a circolare regolarmente all'interno del rene. L'intervento procede con la ricostruzione della via urinaria, mediante tecnica di reimpianto dell'uretere del donatore nella vescica del ricevente oppure con l'impiego dell'uretere del ricevente se idoneo. La sede extraperitoneale facilita sia il controllo post-operatorio del rene sia l'esecuzione di eventuali terapie.

In rari casi, in seguito alle anastomosi vascolari, si verifica il fenomeno della "non funzionalità iniziale del rene", che prende il nome di necrosi tubulare. Questo fenomeno indica un danno subito dall'organo o durante la fase di prelievo o durante la fase di conservazione del rene in soluzione fredda.

Nella maggior parte dei casi, i reni nativi non vengono rimossi, a meno che non si ritenga che possano essere causa di complicazioni cliniche successive. La nefrectomia, infatti, è controindicata in quanto aumenta significativamente la

morbilità e la mortalità; è indicata soltanto nei pazienti affetti da malattia policistica nei quali i reni possono raggiungere dimensioni tali da comprimere gli organi adiacenti oppure limitare lo spazio per l'impianto. Alcuni pazienti possono essere sottoposti al trapianto di due reni e questo si verifica nel caso in cui gli organi derivino da donatori non ideali in relazione all'età (>60 anni) oppure in quei casi in cui la creatininemia risulti superiore a 2,5 mg/dl^[16].

Nel 2014 in Italia sono stati eseguiti 93 doppi trapianti di rene.

3.2. Trapianto di rene da donatore vivente

Il trapianto tra viventi è una pratica clinica integrativa e non sostitutiva dell'attività di trapianto da donatore cadavere. I risultati rispetto al trapianto da cadavere sono migliori in quanto il tempo di ischemia fredda è pari a zero (riduzione dei rischi di ritardata ripresa della funzionalità renale), vi è una migliore compatibilità genetica ed è possibile programmare il trapianto e lo studio del donatore e del ricevente in modo ottimale. Tale modalità di trapianto offre inoltre numerosi benefici quali:

- incrementare il numero di trapianti;
- evitare, quando possibile, la necessità di dialisi;
- garantire il diritto dell'individuo di disporre di parti del proprio corpo a fini solidaristici;
- ottenere una migliore sopravvivenza del trapianto e del paziente nel medio e nel lungo termine.

Il trapianto da donatore vivente viene effettuato su esplicita e libera richiesta del donatore e del ricevente. È regolato, in deroga all'articolo 5 del Codice Civile, dalla Legge n. 458 del 26 Giugno 1967^[17] che consente di disporre, a titolo gratuito e senza nessuna forma di costrizione, del rene al fine di trapianto. La deroga è consentita ai genitori, ai figli, ai fratelli del paziente maggiorenni, o, in loro assenza, ad altri parenti o a persone unite da legame di legge o affettivo. La donazione di un rene può

essere autorizzata, a condizione che il donatore abbia raggiunto la maggiore età, sia in possesso della capacità di intendere e di volere, sia a conoscenza dei limiti della terapia del trapianto del rene tra viventi e sia consapevole delle conseguenze personali che il suo sacrificio comporta. Secondo gli ultimi dati di letteratura il rischio di mortalità nei donatori viventi è molto raro e si aggira intorno allo 0,02%^[18]. Un magistrato, accertata l'esistenza delle condizioni prime definite e accertato altresì che il donatore si è determinato all'atto della donazione di un rene liberamente e spontaneamente, rilascia la relativa autorizzazione all'intervento.

In molti Centri Trapianto si sta diffondendo sempre più l'utilizzo della tecnica laparoscopica mini-invasiva per prelevare l'organo. Con tale procedura i rischi chirurgici sono più bassi e di conseguenza i donatori sono sempre più invogliati a donare. Pertanto è auspicabile l'incremento di questo tipo di trapianto in modo tale da raggiungere, anche nel nostro Paese, un rapporto di 1:1 tra il trapianto da vivente e quello da cadavere.

4. TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA

Il successo nel recupero e nel mantenimento delle funzioni del nuovo rene è legato alla capacità di prevenire o ridurre la naturale reazione immunitaria nei confronti di antigeni ritenuti estranei all'organismo. Molteplici strategie in grado di interferire con la risposta immunitaria sono state sperimentate fino ad oggi, ma il gold standard è rappresentato dalla terapia immunosoppressiva. Tale terapia inizia durante l'intervento di trapianto e prosegue per tutta la vita del paziente trapiantato e prevede l'assunzione di alcuni farmaci combinati e somministrati in dosaggi appropriati. La continua ricerca scientifica in questo campo ha lo scopo di sperimentare terapie sempre più efficaci, con minori effetti collaterali e meglio tollerate dal paziente. L'obiettivo futuro della terapia del trapianto è quello di raggiungere la "tolleranza immunologica", rendere cioè l'organo trapiantato non riconoscibile dall'organismo che lo ospita. In questo modo il paziente trapiantato non avrebbe problemi di rigetto e potrebbe non assumere la terapia immunosoppressiva migliorando ulteriormente i già brillanti risultati del trapianto.

Non esistono protocolli terapeutici fissi e ben definiti e quindi ogni Centro Trapianto utilizza la propria esperienza cercando, nel rispetto di Linee Guide Internazionali, di personalizzare il trattamento per ogni singolo paziente. I principi di ordine generale a cui bisogna attenersi nel programmare una terapia prevedono di articolare la strategia farmacologica in tre fasi:

1. Induzione: utilizzo di alte dosi di farmaci nelle prime due settimane dal trapianto che ha come obiettivo quello di sopprimere l'immunità cellulo-mediata lasciando intatta quella umorale;
2. Mantenimento: ha come obiettivo evitare l'insorgenza del rigetto acuto in tempi successivi attraverso l'utilizzo di farmaci in differenti combinazioni;
3. Terapia antirigetto: trattamento del rigetto acuto quando questo si instaura.

La terapia d'induzione si basa sull'utilizzo di immunoglobuline con attività immunomodulante sui linfociti e/o fattori che ne inducano la deplezione.

I farmaci impiegati invece nella fase di mantenimento includono:

- **Corticosteroidi:** Prednisone;
- **Inibitori della calcineurina:** Ciclosporina e Tacrolimus;
- **inibitori mTOR:** Sirolimus ed Everolimus,
- **Inibitori della sintesi di DNA:** Mofetil micofenolato e Azatioprina.

Il protocollo di mantenimento più utilizzato si basa spesso su una triplice terapia con steroide, un inibitore della calcineurina (ciclosporina o tacrolimus) e un antiproliferativo (micofenolato). La posologia di questi farmaci vengono monitorate nel tempo e modificate fino al raggiungimento di livelli plasmatici ritenuti ottimali.

L'obiettivo della terapia è quello di mantenere un equilibrio tra immunosoppressione sufficiente a prevenire gli episodi di rigetto e la comparsa di eventi avversi.

I **corticosteroidi** di sintesi chimica sono storicamente considerati il trattamento cardine nel trapianto renale e possono essere utilizzati sia nella fase di induzione della terapia che in quella di mantenimento. Somministrati per via endovenosa e in dosi elevate i corticosteroidi evidenziano un effetto linfocitotossico, mentre a dosi più basse tali farmaci agiscono come immunosoppressori e antinfiammatori, inibendo la sintesi di proteine pro-infiammatorie e immunostimolanti come IL-1, IL-2, IL-6 e IFN- γ . La sospensione di questi farmaci è possibile solo quando si fa uso di protocolli terapeutici con farmaci associati. Viceversa, in caso di rigetto acuto la dose viene notevolmente aumentata. Gli effetti indesiderati principali consistono in alterato metabolismo glucidico (sindrome metabolica e diabete), dislipidemia, osteoporosi, osteonecrosi, ipertensione arteriosa, alterazione del SNC e aumentato rischio d'infezione.

Gli **Inibitori della calcineurina**, come la Ciclosporina e il Tacrolimus, agiscono inibendo la produzione di IL-2, essenziale nell'attivazione e nella proliferazione dei

linfociti T. Vengono inibiti da citocromo P₄₅₀ CYP3A4 ed eliminati per via epatobiliare. Il principale effetto collaterale è la nefrotossicità, causata da una vasocostrizione delle arteriole renali afferenti con conseguente drastica riduzione della frazione di filtrazione. Essendo una nefrotossicità acuta dose-dipendente, risponde alla sospensione o riduzione del dosaggio del farmaco. Per tal motivo è necessario monitorare periodicamente i livelli plasmatici, in modo da riportarli entro valori di sicurezza. A differenza di altri farmaci immunosoppressori, la Ciclosporina offre il grande vantaggio di non provocare alcuna mielosoppressione, in quanto non esplica la sua azione sulle altre cellule del midollo osseo. Tra gli altri effetti collaterali ci sono anche neurotossicità, ipertensione arteriosa, iperglicemia^[18].

Gli **inibitori di m-TOR** (mammalian target of rapamycin) sono farmaci immunosoppressori largamente utilizzati nei pazienti trapiantati di rene. Il meccanismo d'azione di questi farmaci consiste nell'inibizione della protein-chinasi mTOR, coinvolta nella proliferazione linfocitaria, nello sviluppo neurologico e muscolare e nella crescita tumorale. Alla luce delle loro specifiche caratteristiche farmacologiche e della limitata nefrotossicità queste molecole sono una valida alternativa agli inibitori della calcineurina nella terapia di mantenimento post-trapianto, in particolare nei pazienti in cui è presente un danno cronico del graft^{[19] [20]}.

Tra gli inibitori mTOR abbiamo il Sirolimus e l'Everolimus. Il Sirolimus (Rapamune) è stato il primo m-TOR approvato come farmaco immunosoppressore nei pazienti trapiantati di rene. Prodotto da *Streptomyces hygroscopicus*, è un analogo strutturale del Tacrolimus ma con un meccanismo d'azione diverso. Blocca la proliferazione e l'attivazione dei linfociti B e T in uno stadio successivo rispetto a quello del Tacrolimus, inibendo la trasduzione del segnale da IL-2R al nucleo. Agisce in maniera sinergica con altri farmaci e spesso viene utilizzato quando altre terapie non hanno dato risultati aspettati o quando si vuole procedere con una strategia terapeutica priva di cortisone. L'Everolimus, registrato come Certican, è stato

approvato solo successivamente ed ha una struttura chimica simile a quella del Sirolimus. Oltre ad inibire la proliferazione dei linfociti T e B, inibisce anche la proliferazione di fibroblasti e cellule endoteliali. Viene spesso associato con la Ciclosporina e i Corticosteroidi^[21].

Tra i farmaci inibitori della sintesi del DNA troviamo:

- ✓ Micofenolato Mofetile (MMF): derivato dal *Penicillium stoloniferum*, blocca la sintesi *de novo* delle purine, inibendo l'enzima IMP-deidrogenasi. È un farmaco citostatico, cioè che agisce inibendo la moltiplicazione di tutte le cellule del midollo osseo. La sua tossicità è prevalentemente di tipo midollare, come neutropenia, trombocitopenia e anemia. Determina inoltre disturbi gastrointestinali come diarrea, gastriti e coliti^[22]. Tale farmaco è utilizzato spesso nello schema che prevede la combinazione di tre farmaci immunosoppressori tra cui un inibitore della calcineurina e uno steroide.
- ✓ Azatriopina: analogo purinico, interferisce con la sintesi di DNA ed RNA dei linfociti T e B, inibendone conseguentemente la proliferazione e la differenziazione nel torrente circolatorio. A causa dei gravi effetti collaterali (neoplasie, danni epatocellulari e mielosoppressione) è poco utilizzato nei nuovi protocolli terapeutici^[23].

5. RISPOSTA IMMUNITARIA

Un trapianto d'organo tra individui geneticamente diversi appartenenti alla stessa specie (allograpianto) evolve inevitabilmente verso il rigetto dopo un periodo di tempo abbastanza breve (circa 4-8 giorni). Il processo di rigetto dell'organo è analogo alla risposta immunitaria fisiologica contro gli antigeni "non self" che si manifesta in corso di infezioni o di tumori. La catena degli eventi immunitari alla base del rigetto si fonda sulle molecole del Sistema Maggiore di Istocompatibilità HLA. Ciascun soggetto presenta linfociti circolanti in grado di riconoscere le molecole HLA di un altro individuo (allogene) interagendo con loro come se si trattasse di un HLA self associato ad un peptide estraneo; questi linfociti sono responsabili dell'allogriconoscimento, il processo che scatena il rigetto acuto. I farmaci soppressori modificano l'attivazione linfocitaria che fa seguito all'allogriconoscimento^[6].

Il rischio di andare incontro ad un episodio di rigetto è maggiore nei primi giorni dopo il trapianto, ma persiste, sebbene con probabilità progressivamente minore, anche nei mesi post-trapianto. Tuttavia l'utilizzo di farmaci più efficaci e selettivi e di nuove strategie farmacologiche ha ridotto notevolmente il rischio di rigetto, per cui si assiste ad una percentuale di successo e di sopravvivenza ad un anno dal trapianto che si aggira intorno al 85-90% nei trapianti da cadavere e al 90-95% nei trapianti da vivente^[24].

Il rigetto è classificato in iperacuto, acuto e cronico sulla base di caratteristiche cliniche e istopatologiche. Questa classificazione, storicamente prodotta dai clinici, ha retto bene alla prova del tempo; inoltre, è ormai evidente che ogni tipo di rigetto è mediato da un particolare tipo di risposta immunitaria^[6].

Il rigetto iperacuto si verifica entro minuti/ore dall'anastomosi dei vasi del donatore e del ricevente. È mediato da anticorpi preformati che si legano all'endotelio dei vasi del rene trapiantato, attivando il sistema del complemento. Si osserva una rapida

occlusione trombotica dei vasi che può portare così alla distruzione dell'organo. Tuttavia lo studio di compatibilità prima del trapianto (test Cross-matching) lo rende un'evenienza eccezionale.

Il rigetto acuto insorge entro i primi tre mesi dal trapianto, anche se nel 20-30% dei trapiantati ha un picco tra la 1^a e la 3^a settimana post-trapianto. È considerato un fattore prognostico sfavorevole della sopravvivenza a lungo termine e del mantenimento della funzionalità dell'organo, in quanto precede, nella maggior parte dei casi la *chronic allograft nephropathy*, responsabile a sua volta della maggior parte delle cause di disfunzione renale dopo il primo anno^[25]. I linfociti T CD8+ reagiscono con gli allo-antigeni delle cellule endoteliali e parenchimali del trapianto, causandone la necrosi (anche gli anticorpi possono contribuire al danno vascolare). Tutto ciò determina un'insufficienza renale acuta potenzialmente reversibile. La diagnosi si basa sull'esame istologico da prelievo bioptico, anche se alcuni studiosi, per la diagnosi delle complicanze parenchimali del rene, stanno valutando l'utilizzo di tecniche più moderne e meno invasive come un appropriato monitoraggio immunologico e l'eco-color-doppler^[25]. Il trattamento è rappresentato dall'utilizzo di farmaci steroidei ad alte dosi e, nei casi refrattari, dalla somministrazione di anticorpi monoclonali anti-linfociti.

Il rigetto cronico è una condizione caratterizzata da un danno multifattoriale a carico delle arterie, dei tubuli, dell'interstizio e dei glomeruli renali, con fibrosi e cicatrizzazione dell'organo. L'eziologia non è solo immunologica, ma giocano un ruolo fondamentale anche l'infiammazione e l'ischemia.

Il rigetto può essere accompagnato da segni clinici quali febbre, malessere generale, oliguria, ipertensione, dolorabilità e tumefazione del rene trapiantato. In alcuni casi potrebbe essere del tutto asintomatico, per cui il sospetto è indotto dalle alterazione di alcuni parametri di laboratorio (proteinuria, aumento della creatinina e presenza di linfociti e cellule tubulari nel sedimento urinario) valutati durante il follow-up. Nel

caso in cui, nonostante l'intensificazione della terapia, si verifichi la perdita dell'organo il paziente torna al trattamento dialitico in attesa di un nuovo trapianto. Se in seguito alla perdita del graft fa seguito la comparsa di ematuria, febbre e rammollimento dell'organo si esegue anche la nefrectomia del rene trapiantato.

6. PATOLOGIE GASTROINTESTINALI

Le complicanze gastrointestinali sono tra le cause maggiori di morbilità e mortalità nei soggetti immunocompromessi^[26]. La sfera digestiva rappresenta, infatti, uno dei bersagli privilegiati delle manifestazioni cliniche nei pazienti con immunodeficienza congenite, in quelli sottoposti terapia immunosoppressiva per trapianto di organo solido o midollo osseo, per neoplasie o per malattie autoimmunitarie.

Nei soggetti trapiantati, l'insorgenza di tali patologie dipende sia da malattie e infezioni presenti prima del trapianto (es. malattia diverticolare del colon, ulcera peptica e diabete) sia da cause proprie del trapianto (il tipo di organo trapiantato, il tempo intercorso dal trapianto, la terapia immunosoppressiva e l'esposizione ad agenti infettivi nosocomiali e non)^[27].

Le patologie gastrointestinali nel trapiantato, per lo più coliti, sono caratterizzate da quadri patogenetici nettamente diversi ma con sintomatologia simile. Possiamo quindi distinguere^[28]:

- *Graft-versus-host disease* (GVHD);
- Patologie gastrointestinali dovute ad infezioni;
- Patologie gastrointestinali iatrogene (da micofenolato mofetile);
- *Simil-inflammatory bowel disease* (IBD).

L'indagine sulle biopsie endoscopiche che si avvale di tecniche istologiche, di immunoistochimica e biomolecolari, sembra in grado di contribuire, unitamente alle valutazioni cliniche, alla diagnosi differenziale delle diverse entità cliniche e quindi di indirizzare il clinico verso un idoneo trattamento terapeutico per una migliore gestione del paziente trapiantato.

6.1. *Graft-versus-host disease* (GVHD)

Il termine *graft-versus-host disease* è stato introdotto nel 1955 da Barnes e Loutit^[29] per descrivere la cosiddetta malattia secondaria caratterizzata da diarrea, rash cutaneo e sindrome da deperimento organico osservata nei topi sottoposti a radioterapia che avevano subito un trapianto allogenico di cellule staminali. Oggi, invece, è riconosciuta come una sindrome clinica che si manifesta nei soggetti sottoposti a trapianto con danni a carico di alcuni organi bersaglio quali pelle, fegato, tratto gastrointestinale e, molto più raramente, altri organi^[30]. È una comune e fatale complicanza del trapianto allogenico di midollo osseo che occorre raramente nei soggetti trapiantati di organo solido, più comunemente fegato (<1% dei trapianti). Anche in questi soggetti i tassi di mortalità sono alti e per il trapianto di fegato si aggirano attorno al 75%. In letteratura sono stati riportati casi di GVHD anche in soggetti trapiantati di piccolo intestino, con un'incidenza del 1-2%, e più raramente di rene^[31]. La patogenesi è dovuta alla reazione dei linfociti T del donatore (presenti nell'organo donato) contro gli allo-antigeni del ricevente e di conseguenza il tasso di GVHD è più elevato negli organi che contengono un più apprezzabile tessuto linfoide (ad esempio la mucosa intestinale) e più basso in quelli che hanno pochi residui di tessuto linfoide (per esempio il cuore). Il rash cutaneo è il segno clinico che si presenta mediamente a circa 33 giorni dal trapianto, mentre la diarrea suggerisce un coinvolgimento del tratto gastrointestinale. Quest'ultima è una frequente complicanza nei trapiantati renali e si manifesta in più di un terzo di pazienti. La mortalità è elevata e la morte giunge per complicanze infettive. La esiguità e la aspecificità dei sintomi non consente un immediato riconoscimento della patologia che, il più delle volte, può essere scambiata per reazione alla terapia o a infezioni varie.

Come inizialmente fu proposto da Billingham^[32] nel 1966, tre sono le condizioni necessarie allo sviluppo di GVHD ossia: 1) la presenza di cellule immunocompetenti nel graft; 2) l'incapacità del ricevente di espletare un'effettiva reazione

immunologica contro il graft; 3) la presenza nel ricevente di allo-antigeni diversi da quelli del donatore.

Il meccanismo patogenetico di GVHD nel trapiantato di organo solido non è del tutto chiaro come quello dei trapiantati di midollo osseo, che può essere suddiviso in tre fasi^[33]:

1. Danno tissutale dovuto al rilascio di citochine pro-infiammatorie, come il TNF α e IL-1, con conseguente aumento dell'espressione di molecole di adesione e del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I). Questo primo cambiamento contribuisce all'attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APC);
2. I linfociti T del donatore, attivati dalle APC, si differenziano e proliferano. Rilasciano altre citochine, IFN γ e IL-2, che stimolano l'espressione di MHC-II su cellule epiteliali e macrofagi, con conseguente stimolazione di altri linfociti T e NK;
3. Danneggiamento dell'organo in seguito ad azione citotossica e citolitica delle cellule protagoniste della reazione immunitaria.

La nuova classificazione del *National Institute of Health*, in vigore dal 2005, distingue due forme di GVHD, acuta e cronica. Sebbene le conoscenze relative alla patogenesi della forma acuta sono ben note, la distinzione clinica e patologica tra le due forme non è ancora chiara, in quanto ben poco si sa della forma cronica.

6.1.1. GVHD acuta

Insorge tra la prima settimana ed il secondo mese dal trapianto.

La caratteristica istologica distintiva della GVHD acuta è l'apoptosi delle cellule epiteliali e, nel caso del tratto gastroenterico, di quelle delle cripte intestinali. La presenza di "microascessi apoptotici" (definiti come cluster di cinque o più corpi apoptotici) può essere utile a differenziare la GVHD da altre entità istologiche simili.

Nella GVHD intestinale è stata osservata la presenza di gruppi di cellule neuroendocrine e di lesioni delle cellule endoteliali.

Altre valutazioni istologiche utili per la diagnosi potrebbero essere l'espressione della caspasi-3, che ben correla con l'attività apoptotica, e l'espressione della CD123. In uno studio di Lin del 2013^[34] la positività alla CD123 è stata reperita nel 65,8% delle biopsie del colon di soggetti con GVHD a fronte del 14,3% delle biopsie del colon di soggetti con colite da CMV, mentre non è stata trovata in nessun paziente trattato con micofenolato mofetile e in nessun paziente trapiantato senza GVHD. Questi dati sono promettenti ma dovranno essere validati da altri studi.

Il sistema di classificazione (a quattro gradi) usato per la GVHD GI si basa sull'apoptosi delle cripte intestinali che, secondo Melson e collaboratori^[35], predice non solo la severità clinica ma anche la resistenza alla terapia con farmaci steroidei. Quadri clinici severi vengono associati ad un'alta percentuale di mortalità per GVHD. Secondo l'esperienza di questi autori la valutazione delle cripte è migliore nel caso di sezioni tagliate tangenzialmente, in cui è più semplice evidenziare il numero di cripte contigue perse; tuttavia numerose domande restano ancora aperte tra cui quelle sul numero di corpi apoptotici e di sezioni da valutare necessari a porre diagnosi di GVHD. A tal proposito le linee guida del *National Institute of Health* suggeriscono di valutare almeno 8 corpi apoptotici e 16-20 sezioni.

6.1.2. GVHD cronica

È tradizionalmente definita come la malattia che si manifesta oltre 100 giorni post-trapianto. Nella pratica reale le distinzioni cliniche e istologiche sono poco chiare per cui le linee guida del NIH hanno proposto una distinzione basata sul criterio temporale.

Le biopsie del tratto gastrointestinale in soggetti con GVHD cronica mostrano caratteristiche simili alla GVHD acuta (apoptosi e atrofia ghiandolare), alla celiachia

(atrofia dei villi e aumento dei linfociti intraepiteliali) e alle malattie infiammatorie dell'intestino (IBD).

6.2. Patologie gastrointestinali dovute ad infezioni

Le complicanze infettive costituiscono un'importante limitazione al successo del trapianto, rappresentando la causa più importante di morbidità e mortalità. L'incidenza varia in relazione a numerosi fattori tra cui il tipo di trapianto, lo stato immune del paziente e l'entità della terapia immunosoppressiva. Si stima che circa l'80% dei soggetti trapiantati sottoposti a terapia immunosoppressiva sviluppi un episodio infettivo dopo il trapianto; in particolare nel 52% si tratta di un'infezione batterica (E.coli, Acinetobacter, Pseudomonas, Gram+ ed Entorococchi), nel 33% virale (CMV, EBV, BKV e JCV) e nel 15% fungina (Candida albicans, Aspergillus, Criptococchi e miceti endemici)^[36].

Negli anni alla progressiva riduzione dell'incidenza del rigetto acuto ha fatto seguito un significativo incremento della patologia infettiva, in particolare delle malattie associate a virus latenti come il Citomegalovirus (CMV).

CMV è il patogeno virale che più comunemente infetta pazienti sottoposti a SOT con conseguenze significative sulla sopravvivenza del graft e dell'individuo stesso. Nel primo anno dopo il trapianto il 50-70% dei pazienti va incontro ad un'infezione primaria, una riattivazione, se determinata dallo stesso ceppo di CMV dell'infezione originale o ad una reinfezione, se determinata da un ceppo distinto^[37].

L'interessamento gastrointestinale in corso d'infezione da CMV viene descritto in circa il 5% dei pazienti sottoposti a SOT e può coinvolgere ogni tratto del tubo digerente. Il virus, infatti, infetta cellule epiteliali e mesenchimali e le distrugge causando ulcerazioni sullo strato epiteliale in differenti organi, tra cui intestino e colon^[38].

Diversi studi hanno evidenziato un'associazione tra IBD e CMV, attribuendo una responsabilità del virus sia in termini di esordio della malattia sia in termini di severità di decorso^{[39][40]}.

Il Citomegalovirus è il 5° membro della famiglia Herpesviridae, sottofamiglia betaherpesvirinae. I virioni maturi hanno forma rotondeggiante e presentano un involucro pericapsidico di origine cellulare, che avvolge un nucleocapside a simmetria icosaedrica. Una struttura amorfa, talvolta asimmetrica, situata tra il capsid e l'involucro prende il nome di tegumento. Il genoma è costituito da una molecola di DNA a doppia elica lineare di circa 240bp. L'organizzazione genomica, simile a quella degli altri herpesvirus, è caratterizzata dalla presenza di 2 segmenti unici ed ognuno di questi è delimitato da brevi sequenze ripetute terminali (TR) e ripetute invertite (IR). Il DNA è grande e codifica per almeno 100 proteine, di cui 35 sono coinvolte nella composizione della particella virale. Numerosi enzimi virus-specifici vengono sintetizzati nella cellula infetta, ma nessun enzima sembra essere incorporato nella particella virale. Nel corso della replicazione l'espressione del genoma viene accuratamente regolata e sequenzialmente ordinata in un processo a cascata. Vengono prima espressi i geni immediatamente precoci (*immediate-early*), con formazione delle proteine α , poi quelli precoci (*early*), che danno origine alle proteine β e infine quelli tardivi (*late*) per la produzione di proteine γ ^[41].

I citomegalovirus sono così denominati per il caratteristico effetto citopatico; le cellule infette si presentano, infatti, ingrossate, con una voluminosa inclusione intranucleare e una o più inclusioni intracitoplasmatiche. Infettano numerosi vertebrati e sono specie-specifici.

Il CMV umano si replica in vitro soltanto nei fibroblasti umani, sebbene venga isolato dalle cellule epiteliali dell'ospite. Si ritiene che gli esseri umani siano l'unico *reservoir* per il CMV umano e che la trasmissione avvenga per contatto interumano diretto e, molto più raramente, indiretto. Le fonti d'infezione sono rappresentate

principalmente da secrezioni oro-faringee, urina, secrezioni vaginali e cervicali, liquido spermatico, latte materno, lacrime, saliva e feci e viene trasportato nei globuli bianchi. Si può avere anche una trasmissione per via transplacentare, per via parenterale e con il trapianto di organi. La propagazione dell'infezione è favorita dalla durata molto prolungata dell'eliminazione del virus e dal fatto che l'infezione decorre spesso in modo asintomatico ed è quindi compatibile con la vita di relazione del soggetto infetto^[42].

Nel corso della vita il 40-80% degli individui dei paesi industrializzati e la quasi totalità di quelli dei paesi in via di sviluppo va incontro ad infezione da CMV che, di norma, evolve in modo asintomatico o pauci-sintomatico e induce latenza in alcune sedi corporee come fibroblasti, monociti, epitelio dei tubuli renali e delle ghiandole salivari^{[43] [44]}. Le infezioni sintomatiche sono appannaggio di determinate categorie di soggetti nei quali il sistema immunitario per motivi fisiologici (anziani e neonati), per motivi farmacologici (immunosoppressi), per motivi genetici o per motivi patologici (soggetti HIV+) non risponde adeguatamente agli stimoli antigenici^[45].

Nel soggetto trapiantato l'infezione da CMV può essere:

- Primaria: derivante da donatore sieropositivo (D+) affetto da infezione latente a ricevente sieronegativo (R-); in questo caso si hanno tassi di mortalità più elevati e talvolta perdita del graft;
- Secondaria: dovuta a riattivazione e/o reinfezione del virus nel ricevente sieropositivo indipendentemente dallo stato sierologico del ricevente (D+o-/R+) o super-infezione nel caso D+/R+: in tal caso il decorso dell'infezione è più benigno.

Le conseguenze cliniche dell'infezione possono essere distinte in effetti diretti o indiretti della replicazione^[46].

Gli effetti diretti, nel corso di infezione attiva con replicazione virale, sfociano in una patologia clinicamente conclamata che si può manifestare come:

1. Sindrome simil-mononucleosica: caratterizzata da segni e sintomi simil-mononucleosici quali febbre, malessere generalizzato, leucopenia e trombocitopenia;
2. Malattia d'organo (*CMV end-organ disease*) quali polmonite, epatite, retinite malattie del tratto gastroenterico ed altre fino ai casi più gravi di insufficienza multiorgano.

Oltre che agli effetti diretti, CMV è associato al rigetto d'organo, al deterioramento progressivo della sua funzione, alle super-infezioni da batteri e funghi che nel complesso sono noti come effetti indiretti da CMV, conseguenti all'azione del virus sul sistema immunitario dell'ospite. Infatti, tali effetti si palesano più comunemente nei periodi di lenta replicazione e rappresentano il risultato della risposta immunitaria dell'ospite al virus modulante^[47].

Esiste una relazione bidirezionale tra il rigetto dell'organo e il CMV: se da un lato il rigetto crea un ambiente pro-infiammatorio che faciliterebbe la riattivazione del virus dall'altro la terapia antirigetto compromette la funzionalità del sistema immunitario che è incapace di controllare la replicazione del virus. Il rigetto dell'organo è fortemente associato con l'insorgenza tardiva di CMV nei soggetti trapiantati di rene o fegato con uno status sierologico del tipo D+/R-^[46]. Uno dei fattori principali nel determinare l'incidenza della malattia citomegalica è la prevalenza di sieropositività nella popolazione in attesa di trapianto, che tende ad aumentare con l'età anagrafica.

L'introduzione della diagnostica molecolare ha permesso di intervenire precocemente sul corso dell'infezione ottenendo un outcome migliore in termini di sopravvivenza. I farmaci correntemente utilizzati nella profilassi e nella terapia delle infezioni da CMV sono: aciclovir, valaciclovir, valganciclovir, foscarnet e cidofovir. Questi possono essere impiegati con tre differenti strategie^[48].

- ✓ in modo terapeutico, allo scopo di trattare la malattia sintomatica;

- ✓ in profilassi, somministrando l'antivirale in tutti i pazienti considerati a rischio subito dopo il trapianto (D+/R-);
- ✓ in modalità “*pre-emptive*”, somministrando l'antivirale nel momento in cui vi è l'evidenza di replicazione virale (sulla base di rilevazioni laboratoristiche di infezione) in modo da prevenire lo sviluppo della malattia sintomatica.

Non esistono solidi dati di letteratura che supportino la terapia profilattica rispetto alla “*pre-emptive*”, per cui la scelta fra le due è a discrezione di ogni singolo centro trapianti.

6.3. Patologie gastrointestinali iatrogene

La diarrea e i conseguenti danni gastrointestinali sono una delle più frequenti complicanze post-trapianto e può comportare discontinuità nella terapia immunosoppressiva. In aggiunta ad altre cause, l'insorgenza può essere determinata anche da farmaci utilizzati nel post-trapianto. Altiparmak e collaboratori riportano un'incidenza di episodi diarroici del 12,6% di cui il 34% secondaria ai farmaci^[49]. Nel corso degli ultimi 5 anni molte conoscenze si sono avute circa le complicanze gastrointestinali causate dal micofenolato mofetile (MMF) e molti studi sono stati avviati per determinare se esistono caratteristiche istologiche che possano permettere la discriminazione tra colite e/o patologie del GI dovute a MMF e GVHD GI.

Il micofenolato mofetile (MMF) è un agente immunosoppressore approvato nel 1995 dal FDA per la profilassi del rigetto d'organo nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di rene o di cuore e nel 2000 per i trapiantati di fegato. L'introduzione di questo farmaco ha portato ad una significativa riduzione dell'incidenza del rigetto acuto^[50]. Il MMF è un derivato dell'acido micofenolico (MPA), un antibiotico estratto dal *Penicillium stoloniferum*. Dopo la somministrazione orale viene assorbito e idrolizzato nel suo metabolita attivo, cioè in MPA. La biodisponibilità dopo somministrazione va dal 80% al 94%. È metabolizzato nel fegato, nel tratto GI e nel

rene attraverso la UDP-gluconiltransferasi in MPGA (acido micofenolico glucuronide). Quest'ultimo metabolita è presente in alte concentrazioni nel plasma rispetto all'MPA, ma è inattivo.

L' MPA è un potente inibitore dell'isoforma di tipo II dell'inosina monofosfato deidrogenasi, un enzima chiave nella sintesi *de novo* delle purine. In particolare esercita il suo effetto citostatico attraverso la deplezione della guanina e dei nucleotidi deossiguanosinici, inibendo la proliferazione dei linfociti T e B e la formazione di anticorpi. Questo è il principale meccanismo dell'immunosoppressione, ma anche altri meccanismi potrebbero contribuire:

- ✓ Induzione dell'apoptosi dei linfociti attivati, in grado di eliminare i cloni di cellule rispondenti a vari stimoli antigenici;
- ✓ Soppressione della glicosilazione e dell'espressione di molecole di adesione, che riducono il reclutamento di linfociti e monociti nel sito d'inflammatione;
- ✓ Esaurimento della tetraidrobiopterina, un cofattore che partecipa alle reazioni di ossido-riduzione.

L'esatto meccanismo con cui il MMF induce cambiamenti della mucosa gastrointestinale è sconosciuto, ma diverse ipotesi sono state avanzate. Ridurrebbe, infatti, la presenza dei linfociti che albergano nel colon e la proliferazione degli enterociti, che sono parzialmente dipendenti dal pathway della sintesi *de novo* delle purine, contribuendo così alla tossicità gastrointestinale, che si manifesta con la diarrea. Inoltre l'MPA, avendo un effetto anti-batterico, potrebbe causare un cambiamento della flora autoctona del tratto GI, che promuoverebbe la crescita di batteri anaerobi responsabili del danno tissutale^[51].

Gli effetti collaterali più comuni sono leucopenia, neutropenia, disturbi gastrointestinali e neurologici. La tossicità del tratto GI si manifesta nei primi sei mesi dall'inizio della terapia, con comparsa di diarrea, nausea e vomito. La colite da MMF è la principale causa di una diarrea acquosa afebrile che si manifesta nel

soggetto trapiantato di rene con un'incidenza del 36%. Nei casi di tossicità severa si sospende il trattamento. Particolare attenzione deve essere posta nelle associazioni tra farmaci, in quanto il Tacrolimus, in vitro, incrementa la concentrazione di MPA potenziando di conseguenza gli effetti gastrointestinali^[22]. In un recente studio di Liapis e collaboratori^[52], condotto su biopsie coliche di soggetti trapiantati renali affetti da diarrea, sono stati definiti i parametri diagnostici da prendere in considerazione nei casi di colite da MMF:

- ✓ atrofia delle cripte valutata come assente, lieve, moderata e severa;
- ✓ distorsione delle cripte, l'ascesso criptico, l'infiltrato infiammatorio e il numero dei eosinofili classificati in base alla severità e all'estensione,
- ✓ numero di eosinofili definito come basso se <40 eosinofili per hpf e alto se >40 eosinofili per hpf;
- ✓ edema, ulcerazione e cripte con epitelio appiattito classificate come assente o presente;

La severità della colite veniva stimata come assente, lieve, moderata e severa sulla base della presenza di eosinofili, ascessi criptici e ulcerazione.

I tutti i casi di colite da MMF sono stati riscontrati: 1) atrofia della cripta irregolare o estesa e soprattutto di grado lieve o moderato; 2) alterazioni delle cripte con ascessi criptici, neutrofili, eosinofili e mucina all'interno del lume della cripta; 3) infiltrati infiammatori di grado lieve, moderato e severo composti principalmente da plasmacellule e in alcuni casi con alta presenza di eosinofili (>40 per hpf); 4) criptite focale e possibile presenza di ulcerazioni ed erosioni.

Il grado della colite era inversamente correlata con la durata della somministrazione del farmaco, per cui al grado moderato e severo erano associati tempi di terapia più lunghi.

Nello studio condotto da Papadimitriou^[53] biopsie coliche di trapiantati renali con diarrea MMF-correlata sono stati comparate con quelle dei pazienti trapiantati con

GVHD, affetti da malattie infiammatorie dell'intestino e da colite da CMV. Le caratteristiche istologiche delle coliti da MMF presentavano aspetti simili a tutte le altre patologie prese in considerazione.

6.4. Simil-inflammatory bowel disease (IBD)

Le malattie infiammatorie croniche dell'intestino note internazionalmente come *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) comprendono il morbo di Crohn, la rettocolite ulcerosa (RCU) e le cosiddette "coliti indeterminate". Nella popolazione normale è stata stimata un'incidenza annua di 7-10/100.000 casi, mentre nei SOT il tasso si alza a circa 206/100.000^[54]. Wörns e collaboratori^[55] hanno valutato 44 pazienti con IBD de novo dopo trapianto di organo solido e hanno riportato che l'86% insorgevano dopo trapianto di fegato, il 9% dopo quello di cuore e solo il 5% dopo quello renale. Lo spettro clinico è estremamente variabile, esprimendosi in forme lievi con scarsità di sintomi. La caratteristica principale è la presenza di un'inflammatione cronica a carico della mucosa di qualsiasi tratto del tubo digerente nel caso del Crohn e del colon nel caso della RCU. In entrambi i casi si tratta di malattie croniche a decorso intermittente, che possono evolvere in forme gravi. L'eziologia di queste malattie rimane misconosciuta, mentre la patogenesi è considerata autoimmune, probabilmente sostenuta da una predisposizione genetica. Le IBD post-trapianto, comuni nel paziente trapiantato di fegato, appaiono molto più aggressive rispetto a quelle che insorgono nella popolazione generale e sono associate a ad un incremento della mortalità e della difficoltà nel management terapeutico, a causa della possibile interazione tra la terapia immunosoppressiva e quella specifica per le IBD. I fattori di rischio associati a loro sviluppo sembrano essere le infezioni acute da CMV nel ricevente negativo^[56], il fumo^[57] e l'uso del Tacrolimus^[58]^[59].

7. SCOPO DEL LAVORO

Scopo di questo lavoro è la definizione di un protocollo diagnostico per la diagnosi differenziale delle patologie gastrointestinali nei soggetti trapiantati di rene, patologie che rappresentano una delle maggiori cause di mortalità e morbilità. Le patologie gastrointestinali sono infatti caratterizzate da quadri patogenetici nettamente diversi pur presentando sintomatologia simile. Possiamo quindi distinguere *graft-versus-host disease*, patologie gastrointestinali dovute a infezioni (tra cui CMV) e ai farmaci e patologie *simil-inflammatory bowel disease*. Tali entità richiedono un trattamento diverso e quindi assume un ruolo fondamentale la diagnosi di ognuna di esse.

In questo scenario sono stati individuati due ambiti disciplinari, anatomo-patologico e virologico, per procedere alla sperimentazione sull'uso e sull'innovazione di alcune metodiche di laboratorio per identificare un nuovo percorso diagnostico in grado di contribuire, unitamente alle valutazioni cliniche, alla diagnosi differenziale delle diverse entità cliniche e quindi di indirizzare il clinico verso un idoneo trattamento terapeutico per una migliore gestione del paziente trapiantato di rene.

Inoltre è stata effettuata una valutazione dell'impatto che le varie entità morbose, comprese le infezioni da CMV, hanno sui soggetti trapiantati di rene.

8. MATERIALI E METODI

8.1. Popolazione

Lo studio è stato condotto presso l'A.O.U Policlinico-Vittorio Emanuele di Catania, P.O. "G. Rodolico", Unità Operative Complesse Laboratorio Analisi-P.I.D. Virologia Clinica, Anatomia Patologica, Chirurgia Vascolare e Centro Trapianti. Grazie al sistema di comunicazione telematica tra il reparto e i laboratori è stato messo appunto un database con cui sono stati raccolti i dati anamnestici e clinici dei pazienti arruolati nello studio. Ogni paziente è stato caratterizzato considerando le seguenti variabili:

- ✓ Sesso
- ✓ Età al trapianto;
- ✓ Status sierologico;
- ✓ Episodi di rigetto;
- ✓ Sintomi clinici;
- ✓ Tipo di terapia immunosoppressiva;
- ✓ Profilassi o pre-emptive.

I soggetti inclusi erano diciassette (12 maschi e 5 femmine, età media 53 ± 15 anni) e tutti erano stati sottoposti al trapianto di rene. Di questi pazienti 7 avevano uno status sierologico del tipo D+/R- mentre i rimanenti 10 erano D+/R+. Per tutti i pazienti si trattava del primo trapianto e solo 4 di essi erano andati incontro ad almeno un episodio di rigetto. Tutti manifestavano una sintomatologia ascrivibile a patologie a carico del tratto gastrointestinale come alterazione dell'alvo, presenza di sangue nelle feci, positività ai test di immunochimica per la ricerca di sangue occulto nelle feci e positività alla calprotectina fecale. La terapia immunosoppressiva di mantenimento era: Tacrolimus+MMF+steroidi in 13/17 pazienti, Ciclosporina A+MMF+steroidi in

2/17 pz, Everolimus+MMF+steroidi in 1/17 pz e Rapamune+MMF+steroidi in 1/17. Tutti i pazienti D+/R- avevano fatto la terapia di profilassi.

I pazienti sono stati sottoposti a colonscopia completa allo scopo di valutare l'aspetto delle pareti intestinali e prelevare frammenti della mucosa del colon e del retto. Laddove possibile sono stati eseguiti più campioni biotici dello stesso paziente che, fissati in formalina, sono stati inviati al Laboratorio di Anatomia Patologica. Un totale di 25 biopsie sono state ottenute e lavorate.

8.2. Metodi

8.2.1. Indagini istologiche e di immunoistochimica

Nel Laboratorio di Anatomia Patologica, una volta terminato il periodo di fissazione, si è proceduto alla disidratazione, chiarificazione, imbibizione con paraffina e inclusione delle biopsie. Per ogni blocchetto sono state tagliate al microtomo, nel modo più sterile possibile, due sezioni dallo spessore di 5 µm, che sono inviate al Laboratorio di Virologia Clinica per l'indagine molecolare, e diverse sezioni da 1,5 µm per le indagini anatomo-patologiche.

Una delle sezioni da 1,5µm è stata colorata con ematossilina-eosina (HE) per l'indagine istologica. Altre 5 sezioni venivano poste su vetrini scelti ad hoc per la metodica di immunoistochimica.

L'immunoistochimica (IHC) è una metodica utilizzata per identificare costituenti cellulari e tissutali in situ. Il principio prevede il riconoscimento di un antigene tramite l'utilizzo di un anticorpo specifico. Il complesso antigene-anticorpo non è però visibile, per cui si rende necessario l'utilizzo di marcatori fluorescenti o enzimatici che, direttamente o indirettamente, possono evidenziarne la formazione. Nella metodica diretta si utilizza un unico anticorpo diretto contro l'antigene che lega il sistema di rivelazione (enzimatico o fluorescente). Nella indiretta si utilizzano due anticorpi di cui il primo diretto contro l'antigene ed il secondo (anti-anticorpo),

coniugato con un marcatore, andrà a legarsi al primo. Oggi al posto degli anti-anticorpi si utilizzano polimeri di destrano, di cui ogni monomero è marcato con un enzima.

La metodica dell'IHC prevede diverse fasi:

1. Sparaffinatura in xilolo e idratazione dei tessuti;
2. Smascheramento degli antigeni tramite trattamento termico (97 °C per 17');;
3. Visualizzazione degli antigeni (sfruttando la reazione antigene-anticorpo);
4. Controcolorazione con ematossilina.

Il protocollo utilizzato in questo studio ha sfruttato la metodica di immunistochemica indiretta con il polimero di destrano EnVision Flex/HRP Dako (complesso rivelatore) e la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) come substrato cromogeno. Il complesso rivelatore, associato con una perossidasi, è in grado di catalizzare l'ossidazione del DAB, portando alla formazione di una molecola complessa, che precipita nel sito di reazione (presentante l'antigene) come pigmento di colore bruno. Per evitare falsi positivi dovuti alla reazione del cromogeno con perossidasi endogene, queste venivano disattivate per sovrasaturazione con H₂O₂ per 5' a temperatura ambiente.

Data la complessità della metodica, per confermare la buona riuscita della tecnica e quindi per la validazione della procedura, è stato inserito nella seduta un controllo positivo.

Gli anticorpi primari utilizzati in questo lavoro erano diretti contro:

- ✓ Ki-67 (Dako-Ab, clone MIB-1, mouse, monoclonale, diluizione 1:100);
- ✓ cromogranina A (Dako-Ab, clone DAK-A3, mouse, monoclonale, diluizione 1:600);
- ✓ antigene Early di CMV (Leica, clone QB1/42, diluizione 1;50);
- ✓ antigene Late di CMV (Leica, clone QB1/06, diluizione 1;50).

Ki-67: è una proteina nucleare espressa in tutte le fasi attive del ciclo cellulare, G1, S, G2 e M, ma assente nelle cellule ferme in fase G0. Durante l'interfase la proteina si

trova nel nucleo, mentre durante la mitosi si trova adesa ai cromosomi. Sembra che non venga espressa durante i processi di riparazione del DNA. Rappresenta un marker di proliferazione dell'epitelio delle cripte.

Cromogranina A: è una proteina acida che in condizione normali è contenuta nei granuli densi delle cellule di origine neuroendocrina. Rappresenta un marker di differenziazione neurologica e gli anticorpi sono utilizzati per l'identificazione di tumori di origine neuroendocrina. Nel nostro studio l'anticorpo anti-cromogranina A è stato utilizzato per evidenziare l'eventuale presenza di cellule neuroendocrine nel preparato istologico.

Antigeni Early e Late di CMV: sono proteine virali espresse nella cellula, in tempi diversi, nel corso dell'infezione da citomegalovirus. Gli antigeni precoci (early) regolano il ciclo produttivo virale e vengono espressi nel nucleo delle cellule infette entro le 3-24 h dall'infezione, prima dell'inizio della replicazione. La loro presenza è indice di infezione precoce da CMV. Gli antigeni cosiddetti tardivi (Late) si riscontrano nel citoplasma dopo le 48-72 h. La loro presenza indica un'infezione non recente.

8.2.2. Indagini di virologia molecolare

In ambito virologico si è proceduto con la ricerca dell'acido nucleico nei pezzi paraffinati presso il Laboratorio di Virologia Clinica.

Per prima cosa si è proceduto con l'estrazione degli acidi nucleici. Prima di procedere con l'estrazione si è provveduto preliminarmente all'eliminazione della paraffina dal tessuto con un procedimento specificatamente standardizzato per l'adeguato mantenimento della qualità degli acidi nucleici da estrarre. Le 2 sezioni, poste in provette eppendorf, venivano preriscaldate a 65° per 1h; seguivano adeguate incubazioni con xilolo per la sparaffinatura e con etanolo per la disidratazione del campione e l'allontanamento dello xilolo. A questo punto i campioni sono stati trattati per l'estrazione del DNA mediante l'utilizzo di un kit commerciale (QIAmp

DNA mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Il principio di estrazione degli acidi nucleici di questo kit si basa sulla capacità del DNA di legarsi a supporti inerti o filtri contenuti in colonnine. Successivamente, gli acidi nucleici legati al filtro venivano eluiti tramite un tampone contenente Tris-HCl. Gli acidi nucleici così eluiti venivano conservati a -80° fino al momento della seduta di amplificazione.

Il rilevamento del DNA del citomegalovirus è stato eseguito tramite Real-time PCR, utilizzando la tecnica Taqman. Per l'amplificazione è stato adoperato il kit commerciale CMV ELITech MGB (ELITechGroup© S.p.a, Milano, Italy), che amplifica la regione dell'esone 4 del gene MIE4 di CMV.

La miscela di reazione del kit presentava due sonde e due coppie di primers, una che riconosceva il gene target virale e l'altra specifica per la regione di un gene housekeeping, rappresentato dal gene della β globina. Il gene housekeeping è di fondamentale importanza in quanto funge da controllo di estrazione.

Nella seduta di amplificazione sono stati inseriti un controllo positivo e uno negativo per la validazione della procedura.

La reazione di amplificazione, allestita in una piastra a 96 pozzetti, avveniva all'interno di un volume di reazione di 40 μ l contenenti 20 μ l di DNA estratto/controllo ed è stata eseguita sullo strumento ABI PRISM 7300 Real Time System (Applied Biosystems, Monza, Italy).

Il profilo termico della reazione è mostrato nella tabella 1.

| FASE | TEMPERATURE | TEMPI |
|--------------------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| Decontaminazione | 50 °C | 2 min. |
| Denaturazione iniziale | 94 °C | 2 min. |
| Amplificazione e rivelazione (45 cicli) | 94 °C | 10 sec. |
| | 60 °C (acquisizione fluorescenza) | 30 sec. |
| | 72 °C | 20 sec. |

Tab. 1: Profilo termico Real .time PCR per CMV

I dati ottenuti venivano analizzati dal software dello strumento fornito dal produttore (Sequence Detection System software, Applied Biosystems). La seduta risultava valida solo se i controlli positivi e negativi rientravano nella norma e ciascun campione risultava idoneo se veniva rilevata la reattività anche per il gene housekeeping; in particolare i risultati venivano considerati accettabili con un Ct (Cycle threshold) della β globina inferiore a 35.

9. RISULTATI

Dei 17 pazienti presi in esame, 7 (41,2%) sono risultati positivi al DNA di CMV in molecolare, per un totale di 11 biopsie; in particolare in un paziente il CMV è stato reperito su tutti e quattro le biopsie analizzate (colon ascendente, colon trasverso, discendente e sigma), in un altro paziente sulle due biopsie e per i rimanenti 5 pazienti il reperimento è avvenuto a livello di altrettante biopsie.

Tutti i pazienti positivi in molecolare sono stati confermati con l'esame immunohistochimico per CMV, che ha presentato una positività sia all'anticorpo Early, presente nei vacuoli del secreto ghiandolare (Fig. 1), sia all'anticorpo Late presente a livello citoplasmatico.

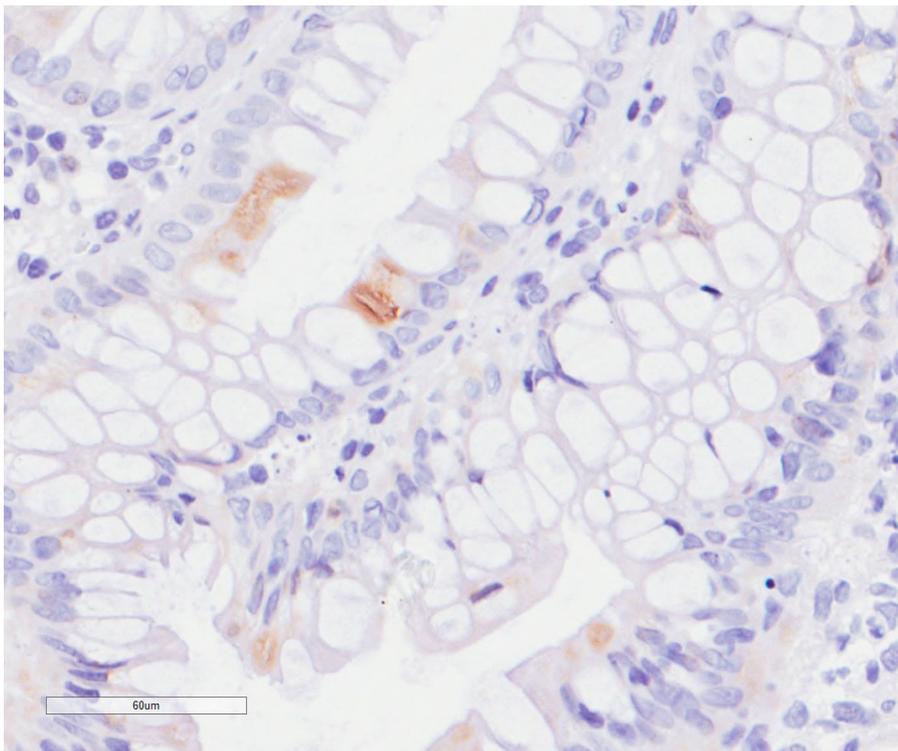


Fig.1: Positività immunohistochimica per l'antigene Early di CMV, 40X.

Per quanto riguarda i risultati delle altre indagini di immunistochemica, la valutazione è stata effettuata con una scala di valori non parametrici assegnando:

- - alla negatività o comunque normale positività,
- + ad una lieve positività,
- ++ ad una positività moderata,
- +++ ad una positività intensa.

Questi dati unitamente a quelli anamnestici dei pazienti sia CMV positivi sia CMV negativi sono riportati nelle seguenti tabelle.

| Paziente CMV DNA+ | Status sierologico | Terapia | Ki-67 | Cromogranina A | CMV Early e Late | Diagnosi |
|-------------------------|-----------------------|---------------|-------|-------------------|---------------------|-------------|
| 1 | D+/R- | Eve/MMf/ster | +++ | - | +++ | CMV |
| 2 | D+/R+ | Rapa/MMF/Ster | +++ | - | ++ | MMF+CMV |
| 3 | D+/R- | Tac/MMF/ster | +++ | - | ++ | ADENOMA+CMV |
| 4 | D+/R- | Tac/MMF/ster | +++ | - | ++ | CMV |
| 5 | D+/R+ | Tac/MMF/Ster | +++ | + | ++ | ADENOMA+CMV |
| 6 | D+/R+ | Tac/MMF/Ster | +++ | - | ++ | ADENOMA+CMV |
| 7 | D+/R+ | Tac/MMF/Ster | +++ | - | ++ | ADENOMA+CMV |

Tab. 2: Pazienti CMV DNA positivi

| Pazienti CMV DNA- | Status sierologico | Terapia | Ki-67 | Cromogranina A | CMV Early e Late | Diagnosi |
|-------------------------|-----------------------|--------------|-------|-------------------|------------------------|----------|
| 8 | D+/R+ | Tac/MMF/Ster | + | - | - | IBD |
| 9 | D+/R+ | Tac/MMF/Ster | + | - | - | ADENOMA |
| 10 | D+/R+ | Tac/MMF/Ster | + | - | - | IBD |
| 11 | D+/R- | Tac/MMF/Ster | - | - | - | POLIPO |
| 12 | D+/R- | Tac/MMF/ster | ++ | ++ | - | GVHD |
| 13 | D+/R- | Tac/MMF/ster | - | - | - | POLIPO |
| 14 | D+/R+ | CyA/MMF/Ster | ++ | - | - | ADENOMA |
| 15 | D+/R+ | CyA/MMF/Ster | +++ | + | - | IBD |
| 16 | D+/R+ | Tac/MMF/Ster | +++ | - | - | IBD |
| 17 | D+/R- | Tac/MMF/Ster | +++ | ++ | - | GVHD |

Tab. 3: Pazienti CMV DNA negativi

Come si può dedurre dalle tabelle Ki-67 (Fig.2), indice di proliferazione cellulare, è positivo per quasi tutti i pazienti poiché tende ad aumentare come risposta rigenerativa/riparativa nelle condizioni di infiammazione acuta.

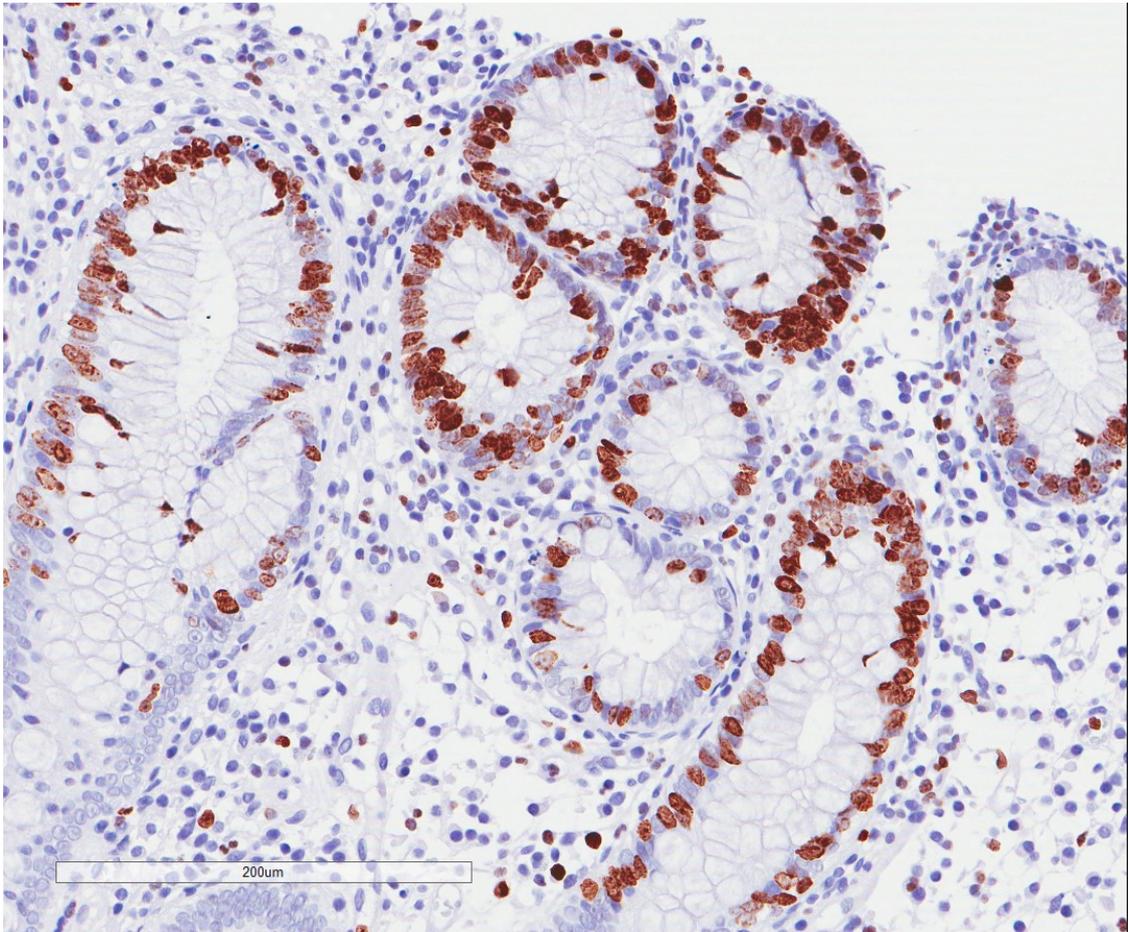
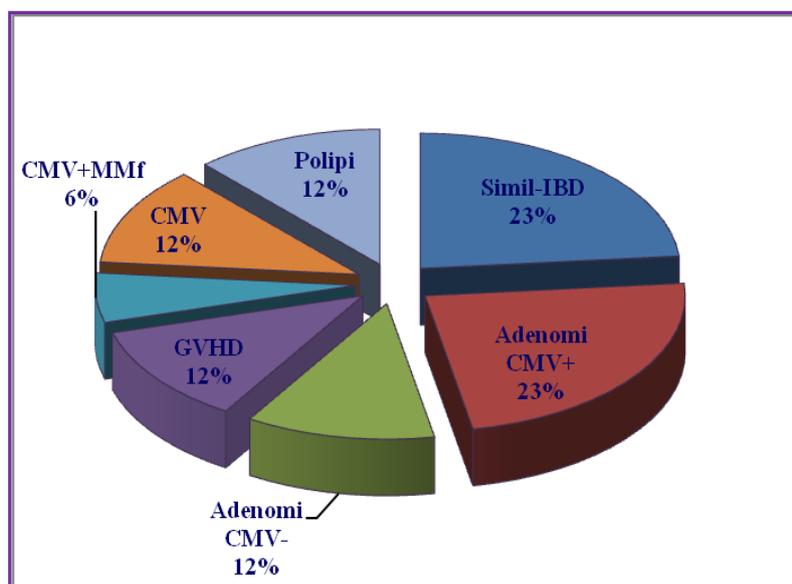


Fig.2: Positività immunoistochimica per Ki-67, 20X.

Alla luce dei risultati di immunoistochimica e di virologia molecolare e prendendo in considerazione l'esame istopatologico è stata fatta una probabile diagnosi differenziale e i risultati sono mostrati nel grafico 1.



Graf.1: Prevalenza delle patologie gastrointestinali

Dei 17 pazienti arruolati nello studio, 4 (23%) mostravano una colite da simil IBD, 2 (12%) da GVHD, 2 (12%) da CMV, 1 (6%) da MMF+CMV; inoltre 6 (35%) avevano un adenoma (4 CMV+ e 2 CMV-) e 2 (12%) avevano polipi iperplastici.

I quattro pazienti (23%) con un quadro istologico da simil-IBD mostravano infatti un intenso e irregolare infiltrato linfoplasmocitario e, in minor quota, granulocitario eosinofilo nella lamina propria della mucosa colica e una presenza, in taluni casi, di micronoduli epitelioidi. Tutti presentavano una immunopositività alla Ki-67 e una negatività alla cromogranina A.

I due pazienti con GVHD mostravano una positività alla cromogranina A (Fig. 3), che indica la presenza di aggregati di cellule neuroendocrine nella lamina propria, e una intensa positività per la Ki-67.

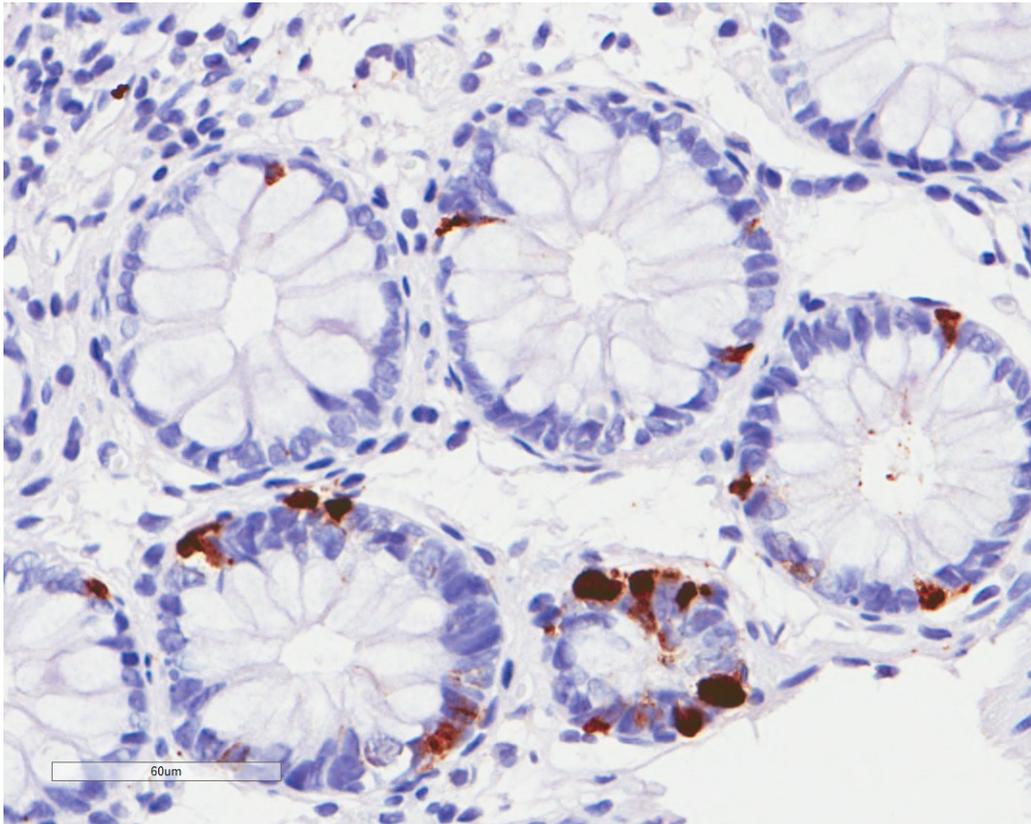


Fig.3: Positiv  immunoistochimica per Cromogranina A, 40X.

Per due dei sette pazienti positivi al DNA di CMV abbiamo ipotizzato solo una colite da CMV. Infatti questi avevano risultati di molecolare e di immunoistochimica positivi e quadri istologici che non facevano sottintendere nessun'altra forma patologica.

Un paziente dei sette CMV positivi mostrava la combinazione di due eventi patologici. In concomitanza alla replicazione attiva del virus presentava un quadro affine alla colite da MMF, in cui   caratteristica la presenza e l'elevata quantit  di infiltrato eosinofilo nella lamina propria, soprattutto nella biopsia del colon ascendente.

Per i restanti quattro pazienti CMV+ era stata posta la diagnosi di adenoma.

Tra i 10 pazienti CMV negativi si sono riscontrati anche 2 soggetti con adenomi e 2 con polipi iperplastici, i quali avevano assenza di sia per la Ki-67 sia per la cromogranina.

10. DISCUSSIONE

I progressi nel campo medico che permettono una diagnosi più precisa e rapida hanno consentito di intervenire con sempre maggior successo anche in pazienti particolarmente “critici” quali i trapiantati d’organo; questi soggetti, però, necessitano di sottoporsi *quoad vitam* ad un trattamento immunosoppressivo.

La buona riuscita del trapianto dipende, in buona parte, dalla terapia immunosoppressiva, che pur riducendo l’incidenza del rigetto dell’organo rende il soggetto fragile e bersaglio di numerosi processi morbosi. Le problematiche nella fase post-trapianto risultano numerose e tra le più difficili da affrontare dal punto di vista clinico. Oltre alle complicanze infettive, immunologiche e chirurgiche, il trapiantato è a rischio di altre malattie, seppur meno comuni, come le patologie cardiovascolari, neoplastiche e gastrointestinali.

Le varie patologie gastrointestinali, per lo più coliti, nel soggetto trapiantato si manifestano con quadri patogenetici diversi ma con una sintomatologia aspecifica e simile che non consente un immediato riconoscimento delle stesse. Inoltre le diverse entità hanno differenti implicazioni cliniche, in quanto diversa, e talvolta controversa, è la gestione terapeutica. Sarebbe opportuno poter distinguere le patologie gastrointestinali dovute a GVHD, da quelle dovute all’infezione da CMV e da MMF e dalle simil-IBD.

Dati di letteratura hanno dimostrato come un’attenta valutazione delle biopsie endoscopiche potrebbe essere di ausilio nel chiarire la diagnosi e guidare il clinico verso una mirata e tempestiva strategia terapeutica.

Sulla scorta di queste conoscenze e di un’accurata ricerca bibliografica che si è rilevata povera, specie per i soggetti sottoposti a trapianto di rene, è stata avviata questa ricerca tesa a valutare un nuovo percorso diagnostico, che abbracci più ambiti disciplinari, in grado di contribuire alla diagnosi differenziale delle diverse forme

morbide. In tal senso si è proceduto con la sperimentazione sull'uso e sull'innovazione di alcune metodiche, sia anatomo-patologiche sia virologiche, utilizzando biopsie del tratto gastrointestinale di soggetti trapiantati di rene. Inoltre è stata effettuata una valutazione dell'impatto che le varie entità morbide, comprese le infezioni da CMV, hanno sui soggetti trapiantati di rene.

I nostri risultati, seppure derivanti da una coorte ristretta, mostrano una varietà di forme patologiche che possono affliggere il tratto gastrointestinale dei soggetti trapiantati.

La prevalenza dei pazienti positivi al DNA di CMV è del 41,2%; il dato mette in evidenza come tale virus resti ancora, nonostante l'avvento delle nuove terapie e le strategie di monitoraggio, un patogeno importante nel trapiantato di rene. Tre dei sette pazienti CMV positivi presentavano uno status sierologico del tipo D+/R- mentre i rimanenti erano D+/R+ (Tab. 2). Nonostante i riceventi sieronegativi per CMV abbiamo fatto un trattamento profilattico sono comunque incorsi in un'infezione primaria, che molto probabilmente, in questi casi, ha portato al coinvolgimento del tratto colico. Nel caso dei riceventi sieropositivi per CMV l'attività virale potrebbe essere dovuta ad una riattivazione del virus latente o ad una reinfezione esogena da un virus di ceppo diverso rispetto a quello del donatore. La riattivazione di CMV potrebbe essere innescata da un ambiente propizio, come la mucosa infiammata, nel quale il rilascio di citochine pro-infiammatorie come il TNF α e IFN γ promuoverebbe la replicazione virale. Nel contempo, macrofagi infettati da CMV verrebbero mobilitati nel tessuto infiammato con conseguente propagazione dell'infezione e peggioramento del quadro infiammatorio.

In letteratura, diversi lavori propongono il CMV non come *primum movens* della patologia, ma come fattore che contribuisce all'esacerbazione delle coliti in pazienti immunocompromessi, quali gli HIV+ e i trapiantati^[60]. Altri attribuiscono al virus una responsabilità nell'esordio della malattia infiammatoria stessa^[40]. Controverso

rimane anche l'associazione tra CMV e IBD. Sebbene CMV sia stato frequentemente associato con le malattie infiammatorie croniche, non esistono evidenze che questa relazione sia di causa-effetto. Nel nostro studio non è venuta alla luce nessuna associazione in quanto i quattro casi per cui è stata fatta diagnosi di simil-IBD erano CMV negativi. I nostri dati di prevalenza delle IBD, 23%, si discostano dai dati di letteratura che mostrano un'incidenza di 206 nuovi casi di IBD de novo su 100.000 trapiantati di organo solido, anche se questa casistica riguarda essenzialmente i trapiantati di fegato; quindi, poco si sa circa i trapianti renali^[54]. Tre dei quattro pazienti con IBD seguivano un regime terapeutico di mantenimento con Tacrolimus, che dai dati di letteratura sembra essere un fattore di rischio per lo sviluppo di queste patologie. Tra i vari meccanismi d'azione, il Tacrolimus inibisce infatti la produzione di IL-2 con conseguente deregolazione dei linfociti T e sviluppo di infiammazione acuta^[55]. L'associazione tra Tacrolimus e IBD non è valutabile in questo studio a causa della esiguità dei soggetti e soprattutto perché la quasi totalità dei pazienti arruolati nello studio (13/17) eseguivano la terapia con Tacrolimus.

La diagnosi di colite da micofenolato mofetile non è semplice per la presenza di caratteri istologici comuni ad altre forme eziologiche come la GVHD e le malattie croniche intestinali. Come suggerito da Liapis e collaboratori^[52] l'atrofia e la distorsione delle cripte ghiandolari, con aspetti di criptite, e la marcata infiltrazione di granulociti eosinofili nella lamina propria della mucosa del colon ascendente hanno permesso di poter avanzare la diagnosi di colite da MMF solo per un paziente. In costui si osservava anche una positività al CMV a dimostrazione del fatto che questo virus si comporta da patogeno opportunisto.

Nonostante la GVHD sia una rara complicanza del soggetto trapiantato di rene, in questa ricerca è stata riscontrata in due soggetti. Le biopsie di tali pazienti mostravano la presenza di gruppi di cellule neuroendocrine, che sembra possa essere ritenuta come una nota distintiva. Molti studi sono stati condotti per ricercare le

eventuali caratteristiche diagnostiche e sembra che l'apoptosi delle cellule delle cripte lo siano. Inoltre, come dimostrato da Lin^[34], la valutazione dell'espressione della proteina CD123 potrebbe trovare impiego nella diagnosi di GVHD.

Dai quattro pazienti CMV positivi con adenoma si evince come il virus, in queste forme tumorali benigne, si comporti in maniera analoga alla mucosa colica non tenendo conto della patologia associata e sovrapponendosi alle altre forme morbose.

Dallo studio condotto si è giunti alla conclusione che la diagnosi di patologie gastrointestinali, nei soggetti trapiantati, appare complessa in quanto nessun parametro di laboratorio da solo è in grado di indirizzare verso una diagnosi certa.

L'approccio diagnostico multidisciplinare, rappresentato dall'esame istologico, immunoistochimico e molecolare delle biopsie endoscopiche, risulta di estrema importanza per meglio definire la patologia da cui è afflitto il paziente ed evitare, così, interpretazioni e diagnosi errate che ritarderebbero un corretto intervento terapeutico. Il presente studio è da considerarsi come fase preliminare di un progetto più ampio che miri alla ricerca di nuovi target diagnostici, ancora più specifici, che facilitino la diagnosi e che rendano conto del reale impatto, sia in termini di prevalenze sia in termini di outcome, che le varie entità morbose, comprese le infezioni da CMV, hanno sui soggetti trapiantati di rene.

Inoltre, la definizione dell'effettivo ruolo eziopatogenetico di CMV nell'insorgenza di patologie a carico dell'intestino dei soggetti trapiantati d'organo, per esempio, potrebbe indirizzare a uno specifico trattamento antivirale. Se in effetti si definisce che alcune patologie enteriche siano legate direttamente al CMV, potrebbe essere utile valutare l'opportunità di rilevare, in un fase precoce di malattia, la presenza del virus con tecniche meno invasive ottenendo una migliore *compliance* del paziente e un intervento terapeutico precoce e probabilmente risolutivo.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis awaiting transplantations, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341: 1725-30.
2. Repubblica Italiana, Ministero della salute, Centro Nazionale Trapianti.
3. Heeman U, Abramowics D, Spasovski G, Vanholder R for the European Renal Best Practice (ERBP) work Group on Kidney Transplantation. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines on Kidney transplantation: ERBP position statement. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 (7): 2099-106.
4. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; 338: 1741-51.
5. G.M. Frascà, E. Balestra, G. Gaffi, et al. Il trapianto è uno stato di malattia renale? *Giornale Italiano di Nefrologia*. Anno 27/n. 3, 2010: pp274-81.
6. Abbas AK, Lichtman AH. *Le basi dell'immunologia*, 2^a edizione. Masson 2006.
7. Gordon RD, Fung JJ, and Markus B. The antibody crossmatch in liver transplantation. *Surgery* 1996; 100: 705-15.
8. Kasiske L, Ramos EL, Gaston RS et al. The evaluation of renal transplant candidates: clinical practice guidelines. Patient care and education committee of the American Society of Transplant Physicians. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 1-34.
9. Ersan S, Celik A, Atila K et al. Tuberculosis in renal transplant recipients. *Ren Fail* 2011; 33: 753-7.

10. Witczak BJ, Jenssen T, Endresen K, Røislien J, Hartmann A. Risk factor for mortality in diabetic nephropathy patients accepted for transplantation. *Transplantation* 2007; 84: 356-61.
11. Veroux P, Veroux M, Sparacino V et al. Kidney transplantation from donors with viral B and C hepatitis. *Transplant Proc* 2006; 38: 996-8.
12. Martina MN, Cofan F, Suarez A, et al. Kidney transplantation and waiting list for renal transplantation for human immunodeficiency virus patients. *Transplant Proc* 2011; 43: 2179-81.
13. Centro Nazionale Trapianti. Linee guida per la valutazione di idoneità del donatore e protocolli specifici. Revisione del 1 marzo 2005.
14. Repubblica Italiana. Legge 1 aprile 1999, n.91. “Disposizione in materia di prelievi e di trapianti di organi e tessuti”. G.U. 15 aprile 1999, n.87.
15. Repubblica Italiana. Decreto ministeriale 22 agosto 1994, n. 582. “Regolamento recante le modalità per l’accertamento e la certificazione di morte”. GU 19 ottobre 1994, n. 245, testo aggiornato al 15 dicembre 2005.
16. Venuta F, Rossi M. Il trapianto di rene in trapianti di organo organi e tessuti. Società Editrice Universo 2010.
17. Repubblica Italiana. Art. 5 del Codice Civile, dalla Legge n. 458 del 26 Giugno 1967. “Trapianto di rene tra persone viventi”. GU 27 giugno 1967, n. 160.
18. Malvezzi P, Rostaing L. The safety of calcineurin inhibitors for kidney-transplant patients. *Expert Opin Drug Saf.* 2015; 14(10):1531-46.

19. Morath C, Arms W, Schwenger V et al. Sirolimus in renal transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and transplant Association-European Renal Association* 2007; 22 (8): 61-5.
20. Paoletti E, Ratto E, Bellino D et al. Effect of early conversion from CNI to sirolimus on outcomes in kidney transplant recipients with allograft dysfunction. *Journal of nephrology* 2012; 25 (5): 709-18.
21. Caletti C, Granata S, Tornei P, Lupo A, Zaza G. Effetti avversi degli inibitori m-TOR e trapianto di rene. *G Ital Nefrol* 2014; 31 (4).
22. De Andrade LGM, Rodrigues MAM, Romero FG, et al. Clinicopathologic features and outcome of mycophenolate-induced colitis in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2014; 28: 1244-8.
23. Chan GL, Erdman GR, Gruber SA, Matas AJ, Canafax DM. Azathioprine metabolism: pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 1990; 30: 358-63.
24. Heeman U, Abramowics D, Spasovski G, Vanholder R for the European Renal Best Practice (ERBP) work Group on Kidney Transplantation. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines on Kidney transplantation: a ERBP position statement. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 (7): 2099-106.
25. Granata A, Clementi S, Clementi A et al. Le complicanze parenchimali del rene trapiantato: il ruolo dell'eco-color-doppler. *G Ital Nefrol* 2012; 29 (S57): S90-S98.
26. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; 338: 1741-51.

27. Rubin RH. Gastrointestinal infectious diseases complications following transplantation and their differentiation immunosuppressant-induced gastrointestinal toxicities. *Clinical Transplant* 2002; 15: 163-7.
28. Wong NACS. Gastrointestinal pathology in transplant patients. *Histopathology* 2015, 66: 467-79.
29. Barnes DW, Loutit JF. Spleen protection: the cellular hypothesis. In Bacq ZM, editor. *Radiobiology symposium: Butterworth*; 1995. P. 134-5.
30. Washington K, Jagasia M. Pathology of graft-versus-host disease in the gastrointestinal tract. *Human Pathology* 2009; 40: 909-17.
31. Assi MA, Pulido JS, McCannel CA, Razonable RR. Graft-vs.-host disease in lung and other solid organ transplant recipients. *Clin Transplant* 2007; 21: 1-6.
32. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reaction. *Harvey Lect.* 1966; 62: 21-78.
33. Zhang Y, Ruiz P. Solid Organ Transplant-Associated Acute Graft-Versus-Host disease. *Arch Pathol Lab Med* 2010, 134: 1220-4.
34. Lin J, Chen S, Zhao Z, Cummings OW, Fan R. CD123 is a useful immunohistochemical marker to facilitate diagnosis of acute graft-versus-host disease in colon. *Hum Pathol* 2013, 44: 2075-80.
35. Melson J, Jakate S, Fung H, Arai S, Keechavarzxian A. Crypt loss is a marker of clinical severity of acute gastrointestinal disease. *Am J Hematol* 2007; 82: 881-6.
36. Razonable RR. Infections in solid transplant recipients. Conference report: highlights from the 40th Annual Meeting of Infectious Disease Society of America. 2002.

37. Rubin R. Infection in the organ transplant recipient. In: *Clinical Approach to Infection in the Compromised Host*. Edited by RH Rubin and LS Young. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002; 573-9.
38. Merrikhi AR, Amir-Shahkarami SM, Saneian H. Cytomegalovirus colitis in a 10 year-old girl after kidney transplantation. *Iran J Pediatr*. 2013; 23(2): 220-2.
39. Sanger K, Alam S, Baid A, Chinnapper L, Robert CS. Cytomegalovirus and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 41(8); 725-33.
40. Angeliki C, Zambeli E, Mantzaris G. Cytomegalovirus and Inflammatory Bowel Disease: pathogenicity, diagnosis and treatment. *Annals of Gastroenterology* 2007, 20 (2): 110-5.
41. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatment. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:725.
42. Antonelli G, Clementi M. *Principi di virologia medica*. Ambrosiana 2008.
43. Cohen JI, Corey GR. Cytomegalovirus infection in normal host. *Medicine* 1985; 64 (2): 100.
44. Rowshani aT, Bemelman FJ, van Leewen EM et al. Clinical and immunologic aspect of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplant* 2005; 79: 381-6.
45. Landini MP. *Il citomegalovirus umano*. Eds AMCLI
46. Ramanan P, Razonable RR. Cytomegalovirus Infections in Solid Organ Transplantation: A Review. *Infect Chemother* 2013; 45 (3): 260-71.

47. Ljungman P, Griffiths P, and Paya C. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *CID* 2002; 34: 109-17.
48. Cornella C, Torazza MC, Strippoli GFM, Segoloni G. Profilassi con farmaci antivirali e pre-emptive therapy per la prevenzione dell'infezione da Citomegalovirus nel trapiantato di rene: Linea Guida. *G Ital Nefrol* 2007; 24 (S37): S165-S78.
49. Altıparmak MR, Trablus S, Pamuk ON et al. Diarrhoea following renal transplantation. *Clin Transplantation* 2004; 18:100-4.
50. Selbst MK, Ahrens WA, Robert ME et al. Spectrum of histologic changes in colonic biopsies in patients treated with mycophenolate mofetil. *Modern Pathology* 2009; 22: 737-43.
51. Calmet FH, Yarur AJ, Pukazhendhi G, Ahmad J, Bhamidimarri KR. Endoscopic and histological features of mycophenolate mofetil colitis in patients after solid organ transplantation. *Annals of Gastroenterology* 2015; 28: 366-73.
52. Liapis G, Boletis J, Bamias G et al. Histological spectrum of mycophenolate mofetil-related colitis: association with apoptosis. *Histopathology* 2013; 63: 649-58.
53. Papadimitriou JC, Cangro CB, Lustberg et al. Histological features of mycophenolate mofetil-related colitis: a graft-versus-host disease-like pattern. *Int J Surg Pathol* 2003; 11: 295-302.
54. Hampton DD, Poleski MH, Onken JE. Inflammatory bowel disease following solid organ transplantation. *Clinical Immunology* 2008; 128: 287-93.

55. Indriolo A, Ravelli P. Clinical management of inflammatory bowel disease in the organ recipient. *World J Gastroenterol* 2014; 20(13): 3525-33.
56. Berk T, Gordon SJ, Choi HY et al. Cytomegalovirus infection of the colon: a possible role in exacerbations associated of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 1985; 80: 355-60.
57. Joshi D, Bjarnason I, Belgaumkar A et al. The impact of inflammatory bowel disease post-liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Liver Int* 2013; 33: 53-61.
58. Haagsma EB, Van Den Berg AP, Kleibeuker JH, Slooff MJ, Dijkstra G. Inflammatory bowel disease after liver transplantation: the effect of different immunosuppressive regimens. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 33-44.
59. Verdonk RC, Dijkstra G, Haagsma EB et al. Inflammatory bowel disease after liver transplantation: risk factor for recurrence and de novo disease. *Am J Transplant* 2006; 6: 1422-9.
60. Eyre-Brook IA, Dundas S. Incidence and clinical significance of colonic cytomegalovirus infection in idiopathic inflammatory bowel disease requiring colectomy. *Gut* 1986; 27: 1419-25.