

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CARDIOLOGICHE TORACICHE,
VASCOLARI E SANITÀ PUBBLICA

Direttore: Prof. F. Rea

SEZIONE DI PATOLOGIA CARDIOVASCOLARE

Direttore: Prof.ssa C. Basso

TESI DI LAUREA

**IMPATTO CLINICO-PATOLOGICO
DEGLI ANTICORPI DONATORE SPECIFICI NEL TRAPIANTO DI
CUORE**

Relatore: Ch.ma Prof.ssa ANGELINI ANNALISA

Correlatore: Dott.ssa BARISON ILARIA

Laureando: GASPARELLA MATTIA

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

SOMMARIO

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI	1
RIASSUNTO	5
ABSTRACT	9
INTRODUZIONE	13
1. INSUFFICIENZA CARDIACA	13
1.1 DEFINIZIONE	13
1.2 TERMINOLOGIA	13
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	14
1.4 EZIOLOGIA.....	15
1.5 TERAPIA	18
2. TRAPIANTO CARDIACO	21
2.1 INTRODUZIONE.....	21
2.2 SOPRAVVIVENZA.....	22
2.3 INDICAZIONI E CONTROINDICAZIONI	23
2.4 DONATORE	24
2.5 IMMUNOSOPRESSIONE	24
2.6 VALUTAZIONE POSTOPERATORIA.....	26
2.7 VALUTAZIONE IN FOLLOW-UP	26
3. RIGETTO	29
3.1 SENSIBILIZZAZIONE	29
3.2 CARATTERIZZAZIONE	30
3.3 BIOPSIA	30
3.4 VALUTAZIONE ECOCARDIOGRAFICA.....	33
3.5 HLA.....	33
3.6 ISTOCOMPATIBILITÀ	36
3.7 PRA	39
3.8 MONITORAGGIO POST TRAPIANTO.....	41
3.9 RIGETTO ANTICORPO MEDIATO (AMR)	44
3.10 pAMR	52
3.11 DSA NELL' AMR	53
3.12 CAV	56
3.10 TRATTAMENTO AMR	57
SCOPO DELLO STUDIO	59
MATERIALI E METODI	61
RISULTATI	69
DISCUSSIONE	81
CONCLUSIONI	83
LIMITI DELLO STUDIO	83
BIBLIOGRAFIA	85

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

ACE	Enzima di Conversione dell'Angiotensina
ACR	Acute cellular rejection
ALT	Alanina Amino transferasi
AMR	Antibody-mediated rejection
AO	Azienda Ospedaliera
APC	Antigen-Presenting Cell
ARVD/C	Displasia o cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro
AST	Aspartato Transaminasi
BNP	Peptide natriuretico di tipo B
CAD	Coronary artery disease
CAV	Cardiac Allograft Vasculopathy
CMV	Citomegalovirus
CRT	Terapia di resincronizzazione
DSA	Donor Specific Antibodies
EBV	Virus di Epstein-Barr
eGFR	Estimated Glomerular Filtration Rate
FCM	Citometria a flusso
FEV	Frazione di Eiezione Ventricolare
GGT	Gamma Glutamil Transferasi
HF	Heart Failure
HFrEF	Heart failure with reduced ejection fraction
HLA	Human Leukocyte antigens
IC	Insufficienza cardiaca
ICD	Defibrillatore cardiaco impiantabile
IFN	Interferone
IL	Interleuchina
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
LVEF	Left ventricular ejection fraction
MFI	Intensità Media di Fluorescenza
MHC	Complesso maggiore di istocompatibilità
MRA	Antagonisti del recettore per l'aldosterone
NGS	Next Generation Sequencing
NYHA	New York Heart Association
pAMR	Pathologic AMR
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRA	Panel Reactive Antibody
RV	Ventricolo sinistro

SAB	Single-antigen Bead
SIT	Sistema Informativo Trapianti
SITO	Società Italiana Trapianti d'Organo
UO	Unità Operativa
VAD	Dispositivo di assistenza ventricolare
WL	Waiting list
ACE	Enzima di Conversione dell'Angiotensina
ACR	Acute cellular rejection
ALT	Alanina Amino transferasi
AMR	Antibody-mediated rejection
AO	Azienda Ospedaliera
APC	Antigen-Presenting Cell
ARVD/C	Displasia o cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro
AST	Aspartato Transaminasi
BNP	Peptide natriuretico di tipo B
CAD	Coronary artery disease
CAV	Cardiac Allograft Vasculopathy
CMV	Citomegalovirus
CRT	Terapia di resincronizzazione
DSA	Donor Specific Antibodies
EBV	Virus di Epstein-Barr
eGFR	Estimated Glomerular Filtration Rate
FCM	Citometria a flusso
FEV	Frazione di Eiezione Ventricolare
GGT	Gamma Glutamil Transferasi
HF	Heart Failure
HFrEF	Heart failure with reduced ejection fraction
HLA	Human Leukocyte antigens
ICD	Defibrillatore cardiaco impiantabile
IFN	Interferone
IL	Interleuchina
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation

LVEF	Left ventricular ejection fraction
MFI	Intensità Media di Fluorescenza
MHC	Complesso maggiore di istocompatibilità
MRA	Antagonisti del recettore per l'aldosterone
NGS	Next Generation Sequencing
NYHA	New York Heart Association
pAMR	Pathologic AMR
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRA	Panel Reactive Antibody
RV	Ventricolo sinistro
SAB	Single-antigen Bead
SIT	Sistema Informativo Trapianti
SITO	Società Italiana Trapianti d'Organo
UO	Unità Operativa
VAD	Dispositivo di assistenza ventricolare
WL	Waiting list

RIASSUNTO

Introduzione: il trapianto di cuore rimane un'ottima opzione terapeutica nei pazienti affetti da scompenso cardiaco refrattario alla terapia medica. Negli ultimi anni, grazie alla terapia immunosoppressiva il rigetto acuto cellulare si è ridotto drammaticamente. Il rigetto umorale gioca un ruolo importante nella storia dei cardiotrapiantati, la sua definizione istologica, la presentazione clinica e l'approccio terapeutico non sono completamente definiti. La biopsia endomiocardica è stata ed è ancora un validissimo "tool" per il controllo del rigetto asintomatico.

Scopo dello studio: Lo scopo di questo studio è quello di analizzare la presenza degli anticorpi anti-HLA donatore specifici sierici nel follow-up dei pazienti trapiantati di cuore e di valutarne il loro effetto sul *graft*.

Materiale e metodi

Questo studio, monocentrico retrospettivo longitudinale, comprende un totale di 80 pazienti sottoposti a trapianto cardiaco da Gennaio 2016 fino a Dicembre 2020, con criteri principali di inclusione popolazione adulta (≥ 18 anni) e con dosaggio in follow up degli anticorpi anti-HLA nel siero eseguiti al momento della biopsia endomiocardica di monitoraggio con protocollo secondo le linee guida del NITp (North Italian Transplant) a 1 mese, 3 mesi, 6 mesi, 9 mesi e 1 anno dal trapianto. Sono stati raccolti 535 prelievi di anticorpi anti-HLA con una mediana di 5 per paziente.

Sono state collezionate 1086 biopsie endomiocardiche di monitoraggio (13,5 biopsie per paziente). Per ogni biopsia abbiamo considerato parametri istologici per il rigetto: miocitolisi, necrosi miocitaria, danno ischemico, edema, vasculite, microvasculopatia trombosi dei vasi, effetto Quilty, infiammazione microvascolare, grading di C4d, grading di CD68, ACR (classificazione ISHLT 1990), ACR (classificazione ISHLT 2005) e pAMR (classificazione ISHLT 2013). Infine per ogni paziente è stato considerato il Panel Reactive Antibody (PRA), la cardiac allograft vasculopathy (CAV) e la frazione di eiezione ventricolare (FEV). Per ogni paziente sono stati

considerati al momento della prima biopsia i dati ematochimici (formula leucocitaria, creatinina, CPK, AST, ALT, GGT), i dati microbiologici (Citomegalovirus e Virus di Epstein-Barr), funzionalità renale (eGFR), la terapia (ciclosporina, tacrolimus, micofenolato, everolimus, prednisone) con il dosaggio dei livelli sierici dove presente (ciclosporina, tacrolimus e everolimus).

Metodi statistici

I dati clinici, patologici e immunologici sono stati raccolti utilizzando eCFR (electronic Case Form Report) sulla piattaforma REDCap, raggiungibile al link <https://edc01.unipd-ubep.it/redcap/>. Per valutare l'associazione tra DSA e gli outcome di interesse è stato implementato un modello di regressione logistica univariabile, tenendo conto delle misure ripetute mediante Robust Covariance Matrix Estimates.

Risultati

Il follow up degli anticorpi ha mostrato che 61/80 (76%) pazienti presentano almeno una positività agli anticorpi anti-HLA, dei quali 27/61 (44,26%) hanno tutti anticorpi anti-HLA non donatore specifici e 34/61 (55,74%) almeno un anticorpo anti-HLA donatore specifici. I pazienti con anticorpi anti-HLA donatore specifici 5/34 (15%) sono di classe I, 29/34 (85%) sono di classe II.

Dai dati analizzati considerando la singola positività ai loci sono state rilevate 987 specificità anticorpali di cui 92 non DSA e 895 DSA. Le rilevazioni hanno evidenziato per il 34% anticorpi anti-HLA di classe I, mentre per il 66% anticorpi di classe II. Nella classe I il locus maggiormente identificato è il B con il 59% degli anticorpi non DSA e il 44% degli anticorpi DSA. Nella classe II il locus maggiormente riconosciuto è il DR con il 56% degli anticorpi non DSA e il 47% degli anticorpi DSA. I valori di MFI nel 43% sono <3000, il 17% sono 3000-5000, il 16% 5001-9999, il 24% sopra i 10000.

Dalle analisi statistiche, confrontando gli anticorpi anti-HLA DSA con i dati bioptici è risultato, statisticamente rilevante, una correlazione con il pAMR ($p < 0.001$), con la vasculite ($p = 0.039$), con la trombosi dei vasi ($p = 0.021$), con l'infiammazione microvascolare ($p < 0.001$), con il grading del C4d ($p < 0.001$) e con il grading del CD68 ($p = 0.003$).

Considerando separatamente gli anticorpi anti-HLA DSA di classe I, i risultati statisticamente rilevanti hanno dimostrato una correlazione con l'edema ($p = 0.028$), con l'effetto Quilty (0.011) e con il grading del C4d ($p = 0.072$) oltre con pAMR ($p = 0.003$). Mentre considerando separatamente gli anticorpi anti-HLA DSA di classe II i risultati statisticamente rilevanti mostrano una correlazione con la vasculite ($p = 0.043$), con la microvasculopatia ($p = 0.030$), con la trombosi dei vasi ($p = 0.039$), con l'infiammazione microvascolare ($p = 0.002$) con il grading del C4d ($p = 0.002$), con il grading del CD68 ($p = 0.004$) e sempre con il pAMR (< 0.001).

Discussione e Conclusioni

Questo studio ha voluto studiare gli anticorpi anti HLA post-trapianto cardiaco monitorati durante il follow up e correlati con la biopsia di monitoraggio eseguita contemporaneamente al prelievo in pazienti asintomatici. Il danno d'organo principale è il danno vascolare non solo in termini di endotelialite o capillarite ma anche di coinvolgimento infiammatorio dei piccoli vasi intramiocardici. Inoltre i nostri dati confermano che gli anticorpi anti-HLA DSA di classe II sono maggiormente associati rispetto a quelli di classe I in termini di danno d'organo e di capacità di fissare il complemento e per quest'ultimo il coinvolgimento dei capillari $< 50\%$ si associa alla presenza di anticorpi.

ABSTRACT

Introduction: Heart transplantation remains an excellent therapeutic option in patients with heart failure refractory to medical therapy. In recent years, thanks to immunosuppressive therapy, acute cellular rejection has been controlled and endomyocardial biopsy has been and still is an extremely valid "tool" for the control of asymptomatic rejection. In contrast, the development of donor-specific and non-donor-specific anti-HLA antibodies and humoral rejection still remain nebulous concepts in the histological definition, in the clinical presentation and therefore in the therapeutic approach.

Aim of the study: The aim of this study is to analyze the presence of serum donor-specific anti-HLA antibodies in the follow-up of heart transplant patients and to evaluate their effect on the graft.

Material and methods

This study is a single-centre retrospective longitudinal study including a total of 80 patients undergoing cardiac transplantation from January 2016 to December 2020. The inclusion criteria is to be an adult transplanted patients (≥ 18 years) and with follow-up dosage of anti-HLA antibodies in the performed at the time of the monitoring endomyocardial biopsy with the protocol according to the guidelines of the NITp (North Italian Transplant) at 1 month, 3 months, 6 months, 9 months and 1 year after transplantation. 535 HLA antibody were collected with a median of 5 per patient.

A total of 1086 monitoring endomyocardial biopsies were collected (13,5 biopsies per patient). For each biopsy we considered histological parameters for rejection: myocytolysis, myocyte necrosis, ischemic injury, edema, vasculitis, microvascular disease, thrombosis of vessels, Quilty effect, microvascular inflammation, inflammatory infiltrate, grading di C4d, grading di CD68, ACR (ISHLT classification 1990), ACR (ISHLT classification 2005) and pAMR (ISHLT 2013 classification).

Finally, the Panel Reactive Antibody (PRA), the cardiac allograft vasculopathy (CAV) and the ejection fraction (EF) were considered. For each patient we took into consideration, at the time of the first biopsy, blood chemistry data (leukocyte formula, creatinine, CPK, AST, ALT, GGT), microbiological data (Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus), renal function (eGFR), therapy (cyclosporine, tacrolimus, mycophenolate, everolimus, prednisone) with serum dosage where present (cyclosporine, tacrolimus and everolimus).

Statistical methods

The clinical, pathological and immunological data were collected using eCFR (electronic Case Form Report) on the REDCap platform, its link was <https://edc01.unipd-ubep.it/redcap/>. We used Wilcoxon test for continuous variables. The univariable regression logistic and Robust Covariance Matrix Estimates were used for association of antibodies and outcome.

Results

Antibody follow-up showed that 61/80 (76%) of the patients had at least one HLA positive antibody, out of which 27/61 (44,26%) non-donor specific HLA antibody and 34/61 (55,74%) against donor-specific anti-HLA. With donor specific anti-HLA DSA antibodies, 5/34 (15%) are class I while 29/34 (85%) are class II.

From the data analyzed considering the single positivity to the loci as a detection, there were 987 detections, 92 of which were not DSA and 895 were DSA. 34% class I HLA antibodies, while 66% are class II. In class I, the most represented locus is B with 59% of non-DSA antibodies and 44% of DSA antibodies. In class II, the most represented locus is the DR with 56% of non-DSA antibodies and 50% of DSA antibodies. The value of MFI in 44% are <3000, 17% are 3000-5000, 16% 5001-9999, 23% above 10000. From the statistical analyses, comparing the positive anti-HLA antibodies DSA with the biopsy data, a statistically significant correlation was found with pAMR ($p < 0.001$), vasculitis ($p = 0.039$), vessel thrombosis ($p = 0.021$),

microvascular inflammation ($p < 0.001$), C4d grading ($p < 0.001$) and CD68 grading ($p = 0.003$). Considering DSA class I antibodies separately, the statistically relevant results have a correlation with edema ($p = 0.028$), the Quilty effect (0.011), C4d grading ($p = 0.072$) as well as pAMR ($p = 0.003$). Considering DSA class II antibodies separately, the statistically relevant results have a correlation with vasculitis ($p = 0.043$), microvascular disease ($p = 0.030$), vessel thrombosis ($p = 0.039$), microvascular inflammation ($p = 0.002$), C4d grading ($p = 0.002$), CD68 grading ($p = 0.004$) and always the pAMR (< 0.001).

Discussion and Conclusions

This study showed the relationship between anti-HLA antibodies on serum performed with a monitoring protocol and the histopathological characteristics on endomyocardial biopsies, that has done at the same time of antibodies assesment. The microvascular inflammation was the most important histological features that correlate with anti-HLA antibodies and the complement fixation as well. The antibodies anti-HLA DSA class II were identified more aggressive than class I for graft damage and complement fixation. The latter showed the relation of antibodies with the grading of C4d also $< 50\%$ of capillaries.

INTRODUZIONE

1. INSUFFICIENZA CARDIACA

1.1 DEFINIZIONE

L'insufficienza cardiaca (IC) si può definire come una sindrome clinica secondaria a una disfunzione cardiaca. È caratterizzata da segni e sintomi, dove i sintomi sono sempre presenti mentre i segni possono non esserlo. I sintomi sono conseguenza di un sovraccarico volumetrico e si manifestano come: dispnea, rantoli e edemi. Possono essere associati anche a inadeguata perfusione tissutale e affaticabilità o ridotta tolleranza allo sforzo. In termini semplicistici si può dire che l'IC è quella condizione per la quale rispetto alle condizioni metaboliche il cuore non apporta ai tessuti una adeguata quantità di ossigeno.^{1,2}

1.2 TERMINOLOGIA

L'insufficienza cardiaca o scompenso cardiaco può essere definito in termini clinici in base alla cronicità in cronico o acuto oppure in base alla predominanza dei segni e dei sintomi dividendolo in scompenso cardiaco destro o scompenso cardiaco sinistro.¹

La definizione storica dello scompenso cardiaco si basa sulla misurazione del LVEF (left ventricular ejection fraction).²

Lo scompenso cardiaco viene così diviso in scompenso cardiaco con FE preservata se la FE è maggiore o uguale al 50% e ridotta quando la percentuale è sotto il 40%. La situazione intermedia viene chiamata moderatamente ridotta e comprende una riduzione della FE dal 40 al 49%. In accordo poi con la New York Heart Association (NYHA) si può definire in base alla sintomatologia lo scompenso cardiaco in 4 classi. Il NYHA mette in relazione i sintomi della dispnea con l'attività fisica. La classificazione è divisa come da Tabella I.^{2,3}

Tabella I : Classificazione funzionale NYHA

CLASSE FUNZIONALE NYHA	SINTOMI
Classe I	Nessun sintomo, senza limitazione nell'attività fisica.
Classe II	Lievi sintomi con lieve limitazione nell'attività fisica. A riposo nessun sintomo.
Classe III	Nessun sintomo a riposo ma moderati sintomi durante l'attività fisica. Un'attività fisica minore provoca affaticabilità.
Classe IV	Severa dispnea anche a riposo.

Lo scompenso cardiaco si può ulteriormente dividere in stadi. Lo stadio A comprende tutti i pazienti che non presentano malattie cardiovascolari ma hanno un alto rischio di sviluppare IC. Lo stadio B sono tutti quei pazienti che invece presentano malattie cardiovascolari strutturali ma non presentano i sintomi di IC. Nello stadio C si aggiungono anche i sintomi. Lo stadio peggiore, ossia il D, il paziente è refrattario alla terapia e necessita di interventi particolari.⁴

1.3 EPIDEMIOLOGIA

Lo scompenso cardiaco è un rilevante problema di sanità pubblica a livello mondiale.

La prevalenza dello scompenso cardiaco è attorno all'1-2% in Europa e si attesta attorno a 1,5-1,8% negli Stati Uniti e in Canada.³ Ha una prevalenza maggiore con l'avanzare dell'età: nella popolazione tra i 65 e i 70 anni è intorno al 4,3% (2012) si alza fino al 10% nella popolazione sopra i 70 anni. Lo scompenso cardiaco è aggravato dalle comorbidity e dalle sindromi cardiovascolari che colpiscono gli anziani.³

La prevalenza è in continuo aumento sia perché c'è un continuo invecchiamento della popolazione generale sia perché negli ultimi 30 anni l'utilizzo della terapia medica ha diminuito il numero di ospedalizzazioni e aumentato la sopravvivenza dei pazienti affetti da malattie cardiovascolari.

1,3

Nella maggior parte dei casi i pazienti che presentano segni e sintomi minori svolgono una vita relativamente normale e produttiva. Purtroppo, però i pazienti che presentano sintomi moderati o severi hanno una qualità della vita molto minore con difficoltà anche nella vita lavorativa e sociale con episodi di scompenso acuto che possono portare a frequenti ospedalizzazioni. ¹

1.4 EZIOLOGIA

Lo scompenso cardiaco può avere origine da numerose patologie cardiache riassunte nella Tabella II a pagina seguente. Si può fare una prima distinzione tra cardiopatia primitiva con origine dal miocardio o secondaria dovuta da alterazioni anatomiche o meccaniche. Nel 50% dei casi arruolati negli studi, l'IC, è dovuto a una cardiopatia ischemica, nel restante 50% la causa più frequente è quella idiopatica. ¹

Nei paesi più sviluppati i fattori predisponenti sono la *coronary artery disease (CAD)* e l'ipertensione.

Tabella II - Cause di insufficienza cardiaca, modalità comuni di presentazione ⁵

CAUSE	ESEMPIO DI PRESENTAZIONE CLINICA
CAD (coronaropatia)	<p>Infarto miocardico</p> <p>Angina</p> <p>Aritmie</p>
Ipertensione	<p>Scompenso cardiaco con preservata funzione sistolica</p> <p>Ipertensione maligna</p> <p>Edema polmonare acuto</p>
Valvulopatie	<p>Malattia valvolare primaria</p> <p>Stenosi aortica</p> <p>Malattia valvolare secondaria</p> <p>Rigurgito funzionale</p> <p>Malattia valvolare congenita</p>
Aritmie	<p>Aritmie ventricolari</p> <p>Aritmie atriali</p>
Cardiomiopatie	<p>Dilatative</p> <p>Ipertrofiche</p> <p>Restrittive</p> <p>ARVD/C</p> <p>Periparto</p> <p>Sindrome di Takotsubo</p> <p>Tossiche: alcohol, cocaina, ferro, rame</p>
Malattie cardiache congenite	<p>Trasposizione congenita corretta/riparata delle grandi arterie</p> <p>Lesioni dello shunt</p> <p>Tetralogia riparata di Fallot</p> <p>L'anomalia di Ebstein</p>

Infettive	<p>Miocarditi virali</p> <p>Malattia di Chagas</p> <p>HIV</p> <p>Sindrome di Lyme</p>
Farmaco-correlate	<p>Antracicline</p> <p>Trastuzumab</p> <p>Inibitori di VEGF</p> <p>Inibitori dei checkpoint immunitari</p> <p>Inibitori proteosomiali</p> <p>Inibitori di RAF+MEK</p>
Infiltrative	<p>Amiloide</p> <p>Sarcoidosi</p> <p>Neoplastico</p>
Malattie da accumulo	<p>Emocromatosi</p> <p>Malattia di Fabry</p> <p>Malattie da accumulo di glicogeno</p>
Malattie endomiocardiche	<p>Radioterapia</p> <p>Fibrosi endomiocardica/eosinofila</p> <p>Carcinoide</p>
Malattie pericardiche	<p>Infiltrative</p> <p>Calcificazioni</p>
Metaboliche	<p>Malattie endocrine</p> <p>Malattie nutrizionali (carenza vitamina B12)</p> <p>Malattie autoimmuni</p>
Malattie neuromuscolari	<p>Atassia di Friedreich</p> <p>Distrofia muscolare</p>

1.5 TERAPIA

Nei pazienti che hanno già sviluppato una patologia cardiaca l'obiettivo per il trattamento sono molteplici. Come primo step è importante l'identificazione e l'eliminazione dove possibile della causa scatenante. È necessario quindi ritardare o prevenire la progressione della malattia stessa prevenendo anche le complicanze. Altro punto da prendere in considerazione è la qualità della vita, andando a migliorare la sintomatologia, e infine aumentare la sopravvivenza.

Si può quindi dividere la terapia in terapia medica, terapia elettrica e terapia chirurgica.¹

Per quanto riguarda la terapia è suddivisa sia in base agli stadi che alle classi NYAH ma anche in base alla riduzione della FEV.

Terapia medica

La terapia medica vanta numerosi farmaci che possono essere usati in associazione soprattutto con una FEV ridotta. I farmaci utilizzati sono beta bloccanti, ACE inibitori, MRA, sartani e diuretici (diuretici dell'ansa e tiazidici). Dalle ultime linee guida si sono aggiunti ulteriori farmaci quali dapaglifozil e empaglifozin. Tutti questi farmaci sono raccomandati a tutti i pazienti con IC con ridotta frazione di eiezione come riportato nella *Tabella III* a pagina successiva. In questo caso i farmaci devono essere somministrati in associazione come da linee guida ESC 2021.⁵

Tabella III - Trattamento farmacologico indicato nei pazienti con (NYHA classe II-IV) HF con ridotta frazione di eiezione (LFEV<=40%)⁵

Raccomandato	Classe	Livello
ACE-I sono raccomandati per i pazienti con HFrEF per ridurre il rischio di ospedalizzazione e morte per HF	1	A
Beta-bloccanti sono raccomandati per i pazienti con HFrEF per ridurre il rischio di ospedalizzazione e morte per HF	1	A
MRA sono raccomandati per ridurre il rischio di ospedalizzazione e morte per HF	1	A
Dapaglifozin o empagliflozin sono raccomandati per ridurre il rischio di ospedalizzazione e morte per HF	1	A
Sacubitril/valsartan sono raccomandati come sostituti degli ACE-I nei pazienti con HFrEF per ridurre il rischio di ospedalizzazione e morte per HF	1	B

Nei casi in cui ci sia moderatamente ridotta o preservata FEV i farmaci sono i medesimi ma devono essere somministrati secondo le necessità andando a migliorare i sintomi. ^{1,4,5}

Terapia elettrica

Nel caso in cui la terapia farmacologica non fosse sufficiente si può associare anche una terapia di tipo elettrico. Questa comprende l'impianto di un defibrillatore cardiaco o la terapia di resincronizzazione.

L'ICD va preso in considerazione dopo 3 mesi di terapia medica con una FEV <35%. La principale causa di morte nel caso di scompenso cardiaco sono le aritmie e l'ICD previene la morte improvvisa di causa cardiaca.

La resincronizzazione cardiaca (CRT) si prende in considerazione in paziente che presentano sempre una FEV<35% e un QRS >130ms. Prevede l'impianto di un pacemaker particolare con un elettrodo nel ventricolo di destro e uno in quello di sinistra.^{1,5}

Terapia chirurgica

Dalle linee guida ESC del 2018 sono stati introdotti dei criteri per definire lo scompenso cardiaco avanzato, riportati nella Tabella IV.⁵

Tabella IV - Criteri per la definizione di arresto cardiaco avanzato⁵

Tutti i seguenti criteri devono essere presenti nonostante un trattamento medico ottimale

1. Sintomi gravi e persistenti di insufficienza cardiaca [classe NYHA III (avanzata) o IV].

1. Grave disfunzione cardiaca definita da almeno uno dei seguenti:

- LVEF \leq 30%
- Insufficienza RV isolata (ad esempio, ARVC)
- Anomalie valvolari gravi non operabili
- Anomalie congenite gravi non operabili
- Valori persistentemente elevati (o in aumento) di BNP o NT-proBNP e grave disfunzione diastolica ventricolare sinistra o anomalie strutturali (secondo le definizioni di HFpEF).

2. Episodi di congestione polmonare o sistemica che richiedono alte dosi e.v. di diuretici (o combinazioni di diuretici) o episodi di basso *output* che richiedono inotropi o farmaci vasoattivi o aritmie maligne che causano >1 visita o ricovero non programmato negli ultimi 12 mesi.

3. Grave compromissione della capacità di esercizio con incapacità di esercizio o bassa distanza (<300 m) o pVO₂ <12 ml/kg/min o <50% del valore previsto, stimato di origine cardiaca.

Nel caso in cui ci si trovi a soddisfare i criteri sopra riportati si deve prendere in considerazione la terapia chirurgica. Essa prevede essenzialmente 2 soluzioni: impianto di pompa come *destination therapy* o come *bridge* per il trapianto cardiaco oppure il trapianto cardiaco.^{1,5}

2. TRAPIANTO CARDIACO

2.1 INTRODUZIONE

Nella diagnosi di insufficienza cardiaca terminale o refrattaria le strade da intraprendere potrebbero essere due: il trapianto cardiaco o le terapie palliative.

Le tecniche chirurgiche per il trapianto cardiaco ortotopico furono concepite negli anni 60, infatti già nel 1967 ci fu il primo trapianto di cuore.⁴

Nel periodo tra il 2002 e il 2018 sono state registrate nella lista per il trapianto 73108 paziente per un totale di 96.533 iscrizioni. Di queste le iscrizioni per il trapianto di cuore sono state 8232 relative a 7900 pazienti candidati. Dei pazienti iscritti il 92% sono pazienti adulti mentre il rimanente 8% sono pazienti pediatrici. C'è una quasi parità di sesso tra i pazienti pediatrici, mentre negli adulti 8 iscritti su 10 sono M e 2 sono F. (vedi Grafico A)⁶

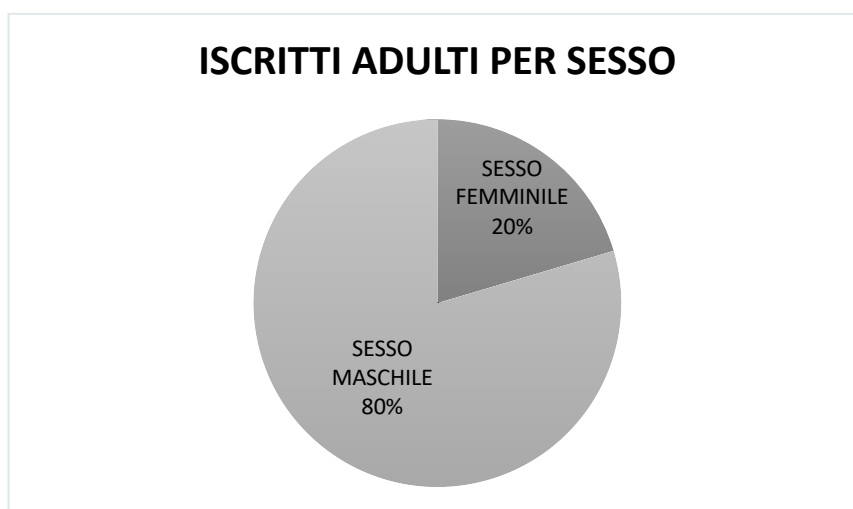
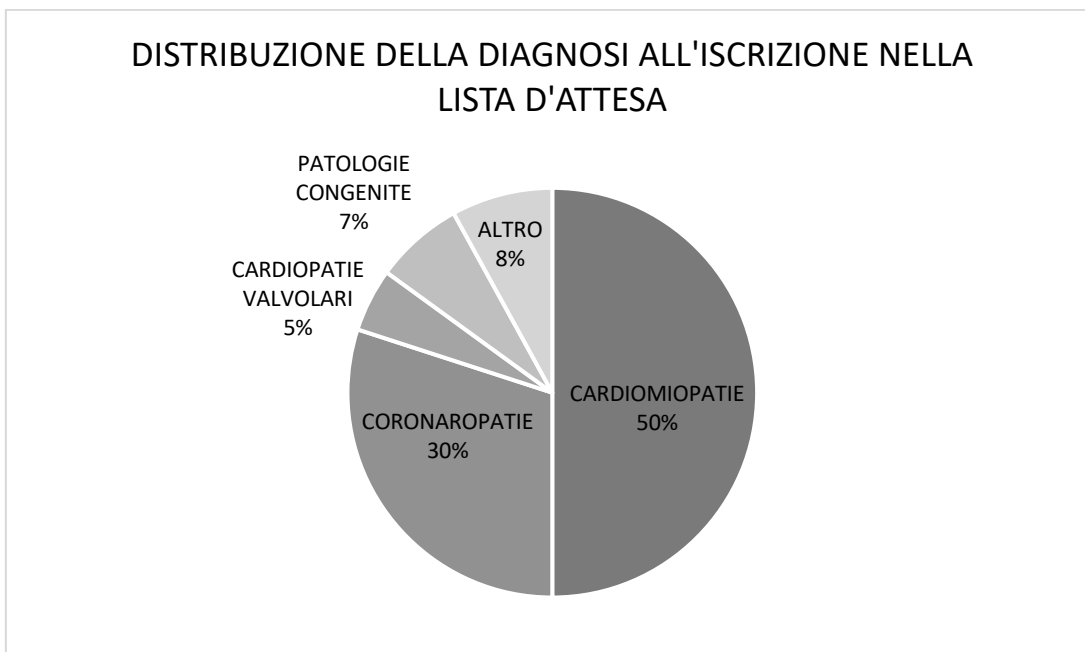


Grafico A - Iscrizione in lista per trapianto di cuore per sesso. Adulti e pediatrici. Periodo 2002-2018 Dati SIT 06/09/2019⁶

La diagnosi di iscrizione nella lista d'attesa nel 30% dei casi è sconosciuta, spesso risalente alle prime anni di attività del SIT. Nell'80% delle cause indicate il 50% sono cardiomiopatie mentre le coronaropatie sono il 30%. (Grafico B).⁶



*Grafico B – Categoria diagnostica all'iscrizione in lista per trapianto di cuore adulti e pediatrici. (Sono escluse le diagnosi non disponibili).
Periodo 2002- 2018 Dati SIT 06/09/2019 ⁶*

In Italia nell'arco di tempo tra il 2000 e il 2018 il numero totale di trapianti cardiaci eseguiti è 5500, di cui 462 a Padova. ⁶

Nel 2021 i pazienti trapiantati complessivamente sono stati 252 e i pazienti hanno prevalentemente un'età compresa tra i 61 e i 75 anni. In A.O. di Padova è stato eseguito un trapianto di cuore su un ricevente di 77 anni. Questo centro si conferma essere quello in cui maggiormente viene eseguita questa procedura in età più avanzata.⁷

Il trapianto cardiaco è fortemente limitato dal numero di donatori che è sempre minore. I pazienti con insufficienza cardiaca possono passare anche molto tempo in lista d'attesa e corrono un rischio di morte significativo in questo lasso di tempo. ⁸

2.2 SOPRAVVIVENZA

La *Grafico C* riassume la sopravvivenza (Kaplan-Meier) dell'organo nella popolazione adulta italiana nei trapiantati tra il 2002 e il 2018. La media

della sopravvivenza stando ai dati del report 2019 dell'ISHLT è di 12,5 anni.
6,9

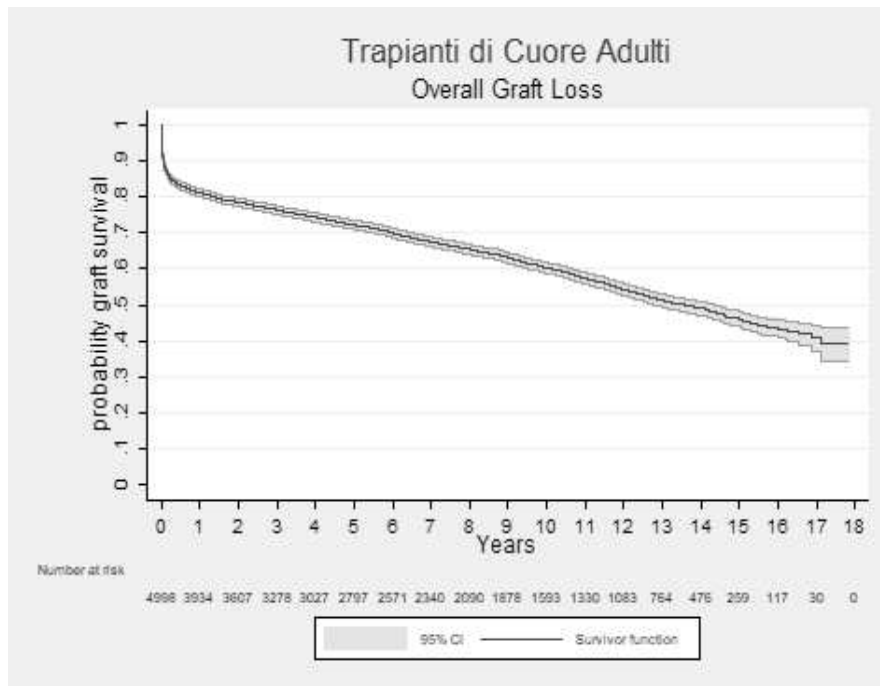


Grafico C - Sopravvivenza del cuore trapiantato con limiti di confidenza al 95% nella popolazione trapiantata in Italia.⁶

2.3 INDICAZIONI E CONTROINDICAZIONI

L'indicazione per il trapianto cardiaco viene posta nel paziente cardiopatico che raggiunge quello che viene definito "stadio D" o cardiopatia in fase terminale. Viene ritenuta irreversibile perché è uno scompenso cardiaco refrattario terminale. I criteri esatti variano da centro a centro perché c'è la mancanza di sicuri indici prognostici nei pazienti con cardiopatia avanzata.

4,10

Si può attivare una richiesta di trapianto in urgenza in particolari condizioni cliniche, quando i pazienti sono ricoverati in una unità di terapia intensiva in cui per sopravvivere hanno bisogno di infusioni di inotropi, nei pazienti pediatrici.

Nel caso si eseguisse tale procedura senza il miglioramento della prognosi o l'intervento o la terapia immunosoppressiva rappresentino un rischio

troppo elevato per il paziente il trapianto è controindicato. Le controindicazioni assolute sono le neoplasie maligne in atto, la prognosi infausta di una malattia sistemica o l'aumento eccessivo o irreversibile delle resistenze polmonari. ¹⁰

Bisogna inoltre fare particolare attenzione ai casi in cui ci siano infezioni in atto, un infarto del polmone, l'ulcera peptica in fase attiva, l'obesità grave o la cachessia. Controindicazioni sono anche l'uso di stupefacenti, l'alcolismo e problemi psichiatrici o sociali. ¹⁰

2.4 DONATORE

Le condizioni per le quali si può effettuare il trapianto cardiaco sono: la disponibilità del donatore, la compatibilità donatore-ricevente e l'idoneità dell'organo da trapiantare.

La compatibilità donatore – ricevente si valuta tramite la compatibilità del gruppo sanguigno (AB0), la ricerca degli anticorpi antilinfocitotossici (PRA, Panel Reactive Antibodies) e la dimensione corporea.

L'idoneità dell'organo viene considerata sulla base dei seguenti parametri: indici di funzionalità del cuore, assenza di danni irreversibili, normale anatomia, età e assenza di malattie trasmissibili.

Le condizioni del donatore che rappresentano una controindicazione al trapianto sono la presenza di infezioni di HIV o di neoplasie maligne. ¹⁰

2.5 IMMUNOSOPRESSIONE

È importante nell'innesto eterologo di organi solidi la soppressione dei normali sistemi di difesa immunologica. I protocolli variano nelle varie unità operative e sono in costante evoluzione. Attualmente gli schemi farmacologici non sono specifici e possono causare una suscettibilità maggiore alle infezioni e alle neoplasie nel ricevente. La maggior parte dei programmi prevede l'utilizzo di tre classi di farmaci. La prima sono gli inibitori della calcineurina come ciclosporina o tacrolimus. La seconda

classe sono gli inibitori della proliferazione o differenziazione dei linfociti di cui fanno parte l'azatioprina, il mofetil micofenolato e il silorimus. Possono anche essere introdotti anticorpi monoclonali che hanno funzione di blocco dell'interleuchina-2 prevenendo il rigetto.

Nella Tabella V c'è una descrizione dettagliata di tutti i farmaci utilizzati con il target cellulare.

Tabella V - Farmaci utilizzati nell'immunoprofilassi nel trapianto cardiaco¹¹

Classe del farmaco	Farmaco generico	Target cellulare
Inibitori della calcineurina	Ciclosporina	Si lega alla ciclofilina, che quindi inibisce la calcineurina
	Tacrolimus	Si lega alla proteina legante l'immunofilina FK506, che inibisce la calcineurina
Antagonisti del recettore della Interleuchina-2	Basiliximab	Inibitore del CD25 del recettore dell'int-2
Antimetaboliti	Azatioprina	Derivato imidazolilico e profarmaco della 6mercaptopurina (inibitore del ciclo cellulare)
	Micofenolato	Inibisce l'inosina monofosfato deidrogenasi, che controlla la guanina monofosfato nella via de novo della sintesi delle purine (inibisce la proliferazione delle cellule T e B)
	Mofetil	Si lega con FKBP12 e il complesso inibisce il bersaglio meccanicistico della rapamicina (mTOR)

Inibitori del segnale proliferativo	Sirolimus	Si lega con FKBP12 e il complesso inibisce il bersaglio meccanicistico della rapamicina (mTOR)
	Everolimus	Si lega a FKBP12, che inibisce mTORC1 (e non mTORC2)

2.6 VALUTAZIONE POSTOPERATORIA

Il periodo postoperatorio è definito come quello che si estende dal momento dell'allotrapianto al momento della dimissione. Le complicanze avvenute durante il periodo postoperatorio sono valutate tramite biopsie, esami ematochimici, ecocardiografia e eventuali correzioni di terapia. Le complicanze più gravi sono il rigetto cellulare acuto (ACR) e il rigetto mediato da anticorpi (AMR) sono due forme separate di rigetto di allotrapianto cardiaco che sono riconosciute e talvolta possono coesistere.

¹²

2.7 VALUTAZIONE IN FOLLOW-UP

Nell'azienda ospedaliera di Padova in seguito alla dimissione dall'UOC di cardiocirurgia, i pazienti sono stati valutati tramite visita ambulatoriale, ogni due settimane nei primi due mesi dall'intervento o con cadenza mensile se successivo a tale periodo durante il primo anno.¹² La visita di follow-up consta della valutazione delle condizioni generali del paziente, viene eseguita una biopsia miocardica in day hospital. I giorni precedenti viene eseguito un prelievo di sangue per il controllo degli esami ematochimici e se necessario per il dosaggio dei DSA.¹²

Durante la visita ambulatoriale sono inoltre visionati gli esiti degli esami ematochimici e di eventuali esami diagnostici strumentali di controllo, quali l'ecocardiografia (che viene eseguita a controlli alterni).¹²

Questo periodo di follow-up è inteso dalla dimissione del paziente e ha termine in caso di decesso del paziente ed entro il primo anno del trapianto.

Qualora il paziente superi il primo anno le visite ambulatoriali continuano ma senza l'esecuzione della biopsia se non ritenuto necessario.

Gli eventi avversi che possono avvenire durante il periodo di follow-up sono molto simili alle complicanze già definite per quanto riguarda il periodo postoperatorio.^{9,12}

La

Tabella VI riassume il numero di follow up per sede di trapianto e la sopravvivenza a 5, 10 e 15 anni dal trapianto cardiaco.⁶

Tabella VI - Attività di aggiornamento dei follow up

Tabella II.2. Attività di aggiornamento dei follow-up

Centro Trapianti	Numero Trapianti 2000-18	Trapianti con almeno un follow up utile	Trapianti con follow up aggiornato	Aggiornamento follow-up				Trapianti con organo funzionante					
				2000-18*		2017		2018		Tempo follow up mediana (anni)	5 anni	10 anni	15 anni
				FUP	%	FUP	%**	FUP	%**				
BA - AZIENDA OSPEDALE POLICLINICO	71	71	71	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	6.8	19	3	3		
BG - OSPEDALI RIUNITI	479	476	474	99.0%	95.0%	100.0%	100.0%	10.3	236	162	39		
BO - S.ORSOLA-MALPIGHI	540	539	539	99.8%	100.0%	100.0%	94.1%	9.7	250	165	28		
CA - A. O. G.BROTZU	127	114	114	89.8%	0.0%	0.0%	0.0%	10.4	51	38	11		
CH - OSPEDALE SAN CAMILLO DE LELLIS	36	36	36	100.0%	-	-	-	11.1	13	9	0		
CT - AZ. OSP. V. EMANUELE FERRAROTTO	67	61	53	77.6%	-	-	-	2.3	14	0	0		
MI - OSPEDALE CA GRANDA-NIGUARDA	574	574	574	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	8.3	283	166	30		
NA - A. O. MONALDI	497	496	496	99.8%	100.0%	100.0%	100.0%	11.5	219	154	34		
PA - ISMETI	177	177	177	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	6.6	71	32	0		
PA - OSP. CIV. BENFRATELLI	17	8	6	35.3%	-	-	-	0.0	0	0	0		
PD - AZIENDA OSPEDALIERA	462	462	462	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	6.7	171	96	16		
PV - OSPEDALE POLICLINICO S. MATTEO	546	546	513	94.0%	100.0%	100.0%	100.0%	10.7	246	167	33		
RM - AZ. OSP. SAN CAMILLO-FORLANINI	225	225	225	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	7.3	75	36	5		
RM - O. PEDIATRICO BAMBINO GESU'	195	195	195	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	8.7	90	56	15		
SI - OSPEDALI RIUNITI (POL. LE SCOTTE)	275	275	275	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	8.9	107	66	12		
TO - A. O. S. GIOVANNI BATTISTA	384	384	382	99.5%	100.0%	100.0%	100.0%	8.7	165	100	11		
TO - OSPEDALE INFANTILE R. MARGHERITA	46	44	44	95.7%	100.0%	0.0%	0.0%	5.1	17	5	0		
UD - S. MARIA DELLA MISERICORDIA	460	436	436	94.8%	100.0%	0.0%	0.0%	8.0	198	111	11		
VR - AZIENDA OSPEDALIERA DI VERONA	322	322	319	99.1%	94.1%	100.0%	100.0%	9.7	133	89	17		
ITALIA	5500	5441	5391	98.0%	97.7%	87.6%		9.08	2358	1455	265		

* Percentuale invio dei follow-up relativi ai trapianti effettuati negli anni 2000-18 confrontate con la media nazionale
 ** Sono segnalati in rosso i Centri che hanno una percentuale di aggiornamento del follow-up inferiore all'80%

3. RIGETTO

3.1 SENSIBILIZZAZIONE

Il numero dei riceventi il trapianto che presentano anticorpi contro gli HLA sono aumentati molto negli ultimi decenni e questo fenomeno ha preso il nome di sensibilizzazione. I fattori che portano alla sensibilizzazione comprendono gravidanze, trasfusioni di sangue, VAD o precedenti trapianti. Ad esempio nel caso dei riceventi trasfusioni la sensibilizzazione passa da una media del 3% nei pazienti che non ne hanno mai ricevute al 20% nei pazienti riceventi.¹³

Negli ultimi anni l'impianto di *device* per l'assistenza ventricolare sinistra come "*bridge to transplant*" and "*destination therapy*" è aumentato drasticamente. È stato dimostrato come tali *device* si associano ad aumento della presenza di anticorpi antidonatore specifici (DSA)¹⁴. Ci sono varie ipotesi per tale associazione tra questi riporto quelle più plausibili che vedono l'associazione con maggior rischio tromboembolico, con conseguente danno endoteliale e l'aumentato rischio di infezioni.¹⁵

Un altro fattore che si associa ad un aumentato rischio di sviluppo anticorpale è il re-trapianto, sebbene sia un evento abbastanza raro nel trapianto di cuore.

La presenza di DSA nei pazienti al momento del trapianto è intorno al 3-11% e nella maggior parte sono anticorpi diretti contro gli HLA di classe II.¹⁶

I pazienti che presentano questa sensibilizzazione possono essere trattati con vari protocolli. I protocolli prevedono la somministrazione di immunoglobuline, la rimozione degli anticorpi tramite la plasmaferesi oppure la riduzione di produzione degli anticorpi tramite farmaci come rituximab o bortezomib, anche se il trattamento ottimale rimane comunque poco chiaro.^{9,16}

3.2 CARATTERIZZAZIONE

Il rigetto rimane una delle cause più importanti di prognosi infausta nel trapiantato cardiaco. Si può classificare in: rigetto iperacuto, rigetto acuto cellulare (ACR) o rigetto anticorpo mediato (AMR). Queste ultime due forme di rigetto possono talvolta anche coesistere.

Il rigetto iperacuto è il più raro e i fattori di rischio possono essere una sensibilizzazione precedente al trapianto. L'incidenza dell'ACR è maggiore nei primi sei mesi post trapianto e va a diminuire negli anni successivi. È causato da un attacco da parte delle cellule T del cuore. Istologicamente è caratterizzato da un'infiltrazione dei linfociti nell'interstizio miocardico, nei casi più severi si associa a necrosi dei miociti stessi.^{9,17}

Nei casi lievi, queste infiltrazioni sono localizzate nelle regioni vicino ai vasi sanguigni, mentre nei casi più gravi si diffondono ampiamente nel tessuto cardiaco. Nelle fasi avanzate dell'ACR grave, spesso associato a problemi emodinamici, si possono osservare cellule multiclonali come macrofagi, neutrofilii ed eosinofili, accompagnati da emorragie nel tessuto cardiaco, danni alle cellule muscolari e necrosi.¹¹

Il trattamento tipico per l'ACR subclinico prevede l'uso di alte dosi di corticosteroidi. Tuttavia, alcuni centri medici possono scegliere di monitorare attentamente i pazienti con forme lievi di infiltrazione, poiché è noto che molti di essi possono riprendersi spontaneamente nel tempo. Se si manifestano sintomi emodinamici compromettenti, vengono utilizzati anticorpi policlonali di salvataggio in combinazione con i corticosteroidi.¹¹

I sintomi sono spesso aspecifici e la presentazione soprattutto nel rigetto iperacuto può essere drammatica e improvvisa.^{9,17}

3.3 BIOPSIA

Come sorveglianza per il rigetto cardiaco ci sono diversi protocolli che comprendono tutti la biopsia endomiocardica. La biopsia viene eseguita usando come accesso la vena giugulare destra. L'ago per biopsia prosegue

poi fino ad arrivare al ventricolo di destra dove verranno prelevati ≥ 3 frammenti di miocardio.

Le biopsie vengono generalmente svolte ogni 2 settimane per i primi 3 mesi post-operatori per poi diventare mensili nel primo anno post-trapianto se il paziente è stabile.⁹

Nell'immagine è riportato un piccolo schema che esemplifica l'esame bioptico.

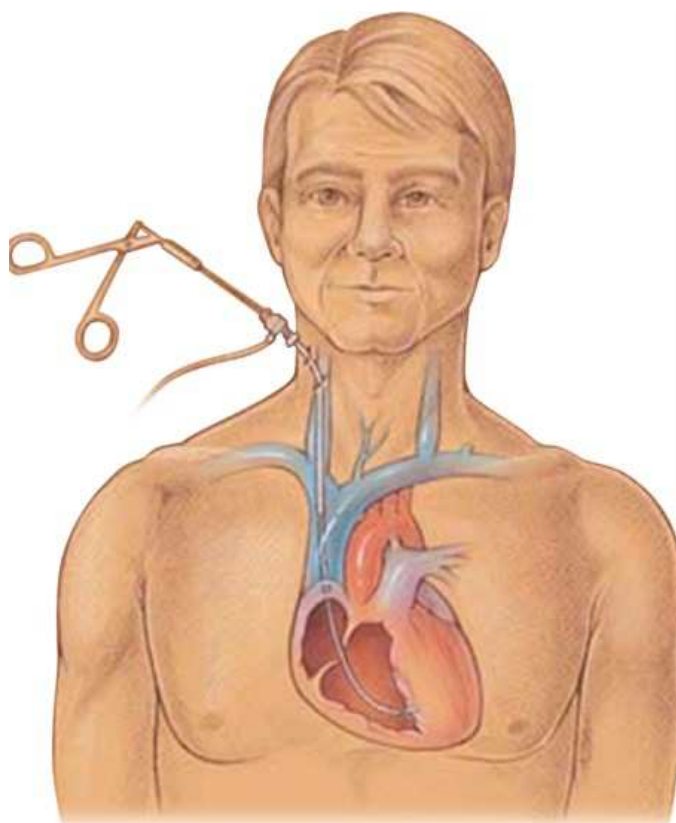


Figura 1 - esame bioptico con entrata dalla vena giugulare destra¹⁸

Nelle Tabella VII e Tabella VIII sono riportate le modalità di classificazione ISHLT e quindi il grado di rigetto ACR nelle biopsie. Il sistema è stato introdotto nel 1990 per poi essere aggiornato nel 2004 sotto la direzione dell'ISHLT.

Tabella VII - ISHLT grading standardizzato per la biopsia cardiaca dell'ACR 1990¹⁹

GRADO	DESCRIZIONE
GRADO 0	Assenza di rigetto
GRADO 1 (lieve) A - focale B - diffuso	A - Infiltrato interstiziale o/e perivascolare focale senza miociti danneggiati B – Infiltrato diffuso senza miociti danneggiati
GRADO 2 focale (diffuso)	1 focus di infiltrato associati a miociti danneggiati
GRADO 3 (moderato) A – focale B – diffuso	A - Infiltrato multifocale con miociti danneggiati B – Infiltrato diffuso con miociti danneggiati
GRADO 4 (severo)	Infiltrato diffuso, polimorfo con estesi miociti danneggiati e/o edema e/o emorragia e/o vasculiti

Tabella VIII - ISHLT grading standardizzato per la biopsia cardiaca dell'ACR 2004¹⁹

GRADO	DESCRIZIONE
GRADO 0 R	Assenza di rigetto
GRADO 1 R (lieve)	Infiltrato interstiziale o/e perivascolare con 1 focus di miociti danneggiati
GRADO 2 R (moderato)	2 o più foci di infiltrato associati a miociti danneggiati
GRADO 3 R (severo)	Infiltrato diffuso con miociti multifocali danneggiati e/o edema e/o emorragia e/o vasculite.

Il rigetto acuto è caratterizzato da due importanti parametri istologici, il primo è l'infiltrato infiammatorio composto soprattutto da linfociti e macrofagi e nei casi più severi da eosinofili. Il secondo è la necrosi miocardica, Quando compare la necrosi il grado di rigetto diventa severo. Le sezioni su più livelli aiutano l'esaminatore nell'apprezzare meglio le caratteristiche della biopsia.

20

3.4 VALUTAZIONE ECOCARDIOGRAFICA

Durante la degenza post-trapianto e nei mesi successivi alla dimissione viene valutata la funzionalità cardiaca tramite un esame ecocardiografico completo. Tale indagine è eseguita solitamente con approccio trans toracico o, in caso di finestra acustica di qualità scadente, con approccio trans esofageo.

In particolare, è indicativo il parametro ecocardiografico indicativo della funzionalità del ventricolo di sinistra: frazione di eiezione del ventricolo sinistro.⁹

3.5 HLA

I geni coinvolti nel sistema MHC è un insieme di geni che coinvolti nel meccanismo di difesa immunitaria dell'organismo umano. L'MHC si trova nel braccio corto del cromosoma 6 e contiene circa 200 geni che possono essere divisi in 2 classi differenti (classe I, classe II).^{15,21}

La Figura 2 schematizza bene le regioni del cromosoma 6.

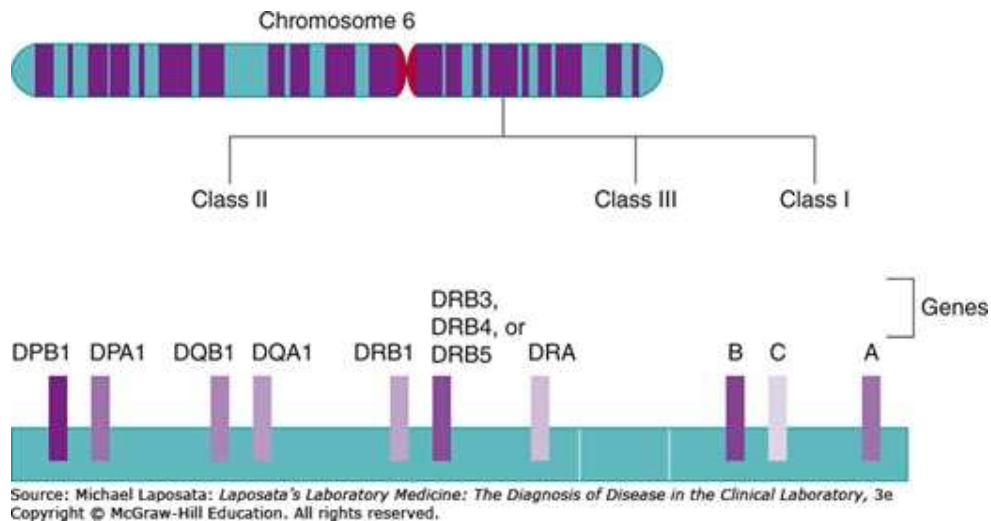


Figura 2 - Il complesso maggiore di istocompatibilità umana (MHC) è una regione genetica sul cromosoma 6 contenente oltre 200 geni. È diviso in regioni di classe I-III. Le principali molecole HLA coinvolte nel trapianto sono codificate dai geni delle regioni di classe I (HLA-A, B e C) e di classe II (HLA-DP, DQ e DR). La regione di classe III non codifica per le molecole HLA.

Gli HLA di classe I codificano per alcune glicoproteine che sono presenti costitutivamente in tutte le cellule nucleate. Queste glicoproteine hanno la funzione di legarsi a frammenti che derivano dalla distruzione di patogeni come ad esempio i virus. Il peptide insieme alla molecola di HLA viene presentato sulla superficie della cellula per avviare la risposta immunitaria. I principali tre geni che attualmente caratterizzano la classe I sono conosciuti come HLA-A, B e C. Sono geni molto polimorfici nel senso che hanno un'alta variabilità sia dal punto di vista del prodotto genetico che del locus genetico. HLA A, B e C possono dare più di 100 prodotti genici differenti, analizzabili tutti tramite la sierologia abbinando quindi i diversi anticorpi con i vari antigeni HLA. Fortunatamente non a tutti gli alleli genici corrisponde un differente sierotipo anticorpale; infatti, sebbene questi siano diversi non sempre attivano anticorpi differenti.²¹

La classe II codifica per le catene alpha e beta da dove derivano le molecole di HLA DR, DQ e DP e sono limitate alle cellule B, T e cellule presentanti l'antigene (APC). L'espressione può essere anche indotta su alcune cellule,

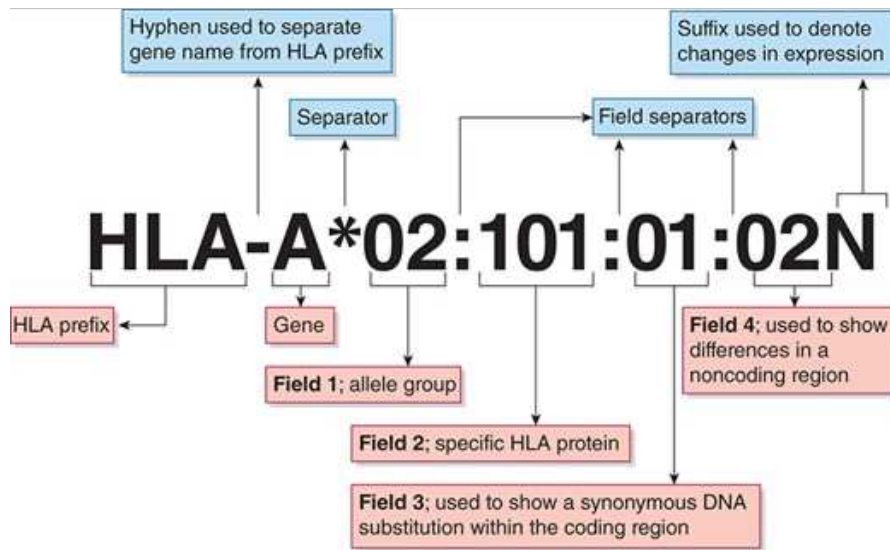
come quelle endoteliali, sotto l'influenza delle citochine quindi nel caso di ischemia.¹⁵

Le cellule che presentano l'antigene sono ad esempio i macrofagi con la loro capacità di fagocitare i patogeni. Una volta che questi patogeni vengono endocitati vengono lisati in peptidi che possono legarsi alle molecole di classe II. Quando vengono esposti sulla superficie esterna della cellula anche in questo caso si attiva il sistema immunitario e delle cellule B. Queste cellule stimulate si possono trasformare in plasmablasti che producono anticorpi a bassa affinità oppure possono diventare cellule B attivate che formano centri germinativi dopo l'interazione con cellule follicolari dendritiche o *T-helper*. A questo punto i linfociti B maturano in cellule B della memoria o in plasmacellule che secernono anticorpi ad alta affinità.^{15,22}

Gli alleli MHC sono collegati tra loro e questa associazione di alleli lungo un unico cromosoma prende il nome di aplotipo. Il genotipo HLA è ereditario infatti ciascun individuo eredita un aplotipo dalla madre e uno dal padre.

La *World Health Organization Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* definisce il nome degli alleli HLA e degli antigeni. I nuovi alleli prendono un numero crescente in base alla loro scoperta e vengono inseriti nel database IPDIMG/HLA che è consultabile anche online.

Nella Figura 3 sottostante è riportato un esempio di nomenclatura degli HLA.²¹



Source: Michael Laposata: *Laposata's Laboratory Medicine: The Diagnosis of Disease in the Clinical Laboratory*, 3e. Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

Figura 3 - La nomenclatura HLA utilizza una lettera per identificare il gene, un numero per identificare il gruppo di alleli. La specifica proteina HLA è identificata da un numero nel secondo gruppo di cifre mentre il terzo gruppo identifica se ci sono state sostituzioni nucleotidi sinonimi (silent), e le cifre del quarto insieme vengono utilizzate se necessario per indicare sostituzioni nelle regioni non codificanti del gene.

3.6 ISTOCOMPATIBILITÀ

L'incidenza del rigetto è aumentata anche dalla presenza di DSA preformati nei pazienti che riceveranno il trapianto. Per scongiurare questa evenienza le linee guida AIBT in collaborazione con SITO prevedono, nel paziente in lista d'attesa per il trapianto, degli esami. Questi esami sono la caratterizzazione HLA, la valutazione dello stato di presensibilizzazione e il *crossmatch* col potenziale donatore. In casi specifici come ad esempio nell'urgenza dove non c'è il tempo o i mezzi per una esecuzione del *crossmatch*, ci si può basare su un "virtual *crossmatch*". In questi casi quindi per attuare una corretta terapia immunosoppressiva si esegue una *crossmatch* retrospettivo.²³

Esistono due tipi principali di *crossmatching*: il *crossmatching* diretto, che coinvolge reazioni tra il siero del paziente e i linfociti del donatore, e il *crossmatching* virtuale, che utilizza antigeni HLA immobilizzati al posto dei linfociti del donatore. Per ottenere i risultati più accurati, il *crossmatching*

virtuale altamente sensibile viene utilizzato come primo test, seguito dal *crossmatching* diretto come conferma.¹⁵

È importante considerare la possibilità di reazioni false positive nei pazienti in attesa di un trapianto di organi, soprattutto se hanno ricevuto terapie a base di anticorpi come il rituximab. Pertanto, è essenziale eseguire i test di rilevamento degli anticorpi prima dell'inizio della terapia a base di anticorpi.¹⁵

Un metodo migliore per determinare il tipo HLA di un possibile ricevente o donatore di trapianto è il test di microlinfotossicità o diretto. Questo test prevede l'utilizzo dei linfociti T per identificare gli antigeni di classe I mentre per gli antigeni della classe II vengono identificati usando i linfociti B. La procedura prevede l'unione di modelli di siero (oltre 200 tipi) noti con i linfociti del paziente. Successivamente verrà unito il complemento di coniglio. Tramite il microscopio a fluorescenza si possono identificare l'unione dell'antigene HLA con l'anticorpo che provoca danno cellulare. Per mettere in evidenza questa lisi vengono utilizzati dei coloranti che legano il DNA come il bromuro di etidio.^{15,21}

Il vantaggio di questa tecnica è la capacità di rilevare anche il danno causato dagli anticorpi non-HLA perché mimano perfettamente le condizioni in vivo. Gli svantaggi invece sono la variabilità dell'interpretazione dei risultati perché operatore dipendente e la difficoltà nella preparazione dei linfociti del donatore. Possono anche esserci dei falsi positivi dovuti a reazioni aspecifiche dovute dagli anticorpi IgM. Questo metodo seppure perfezionato rimane comunque con una sensibilità minore rispetto al metodo FCM (citometria a flusso) o al dosaggio in fase solida.¹⁵

Ci sono poi altre tecniche di tipo molecolare. Queste tecniche sono più ad alta risoluzione e permettono di identificare con più precisione gli alleli rispetto ai test sierologici. Queste tecniche sono anche utilizzabili in pazienti che presentano citopenie o in carenza di linfociti.

Una tecnica di queste prevede tramite il metodo PCR l'amplificazione del DNA utilizzando però gruppi specifici (es. tutti gli alleli DQB1). Il DNA a questo punto viene ibridato con delle sonde che sono specifiche per allele

o gruppo di alleli. Le sonde legate riescono a essere visibili tramite metodi come l'ibridazione *dot blot*.

Un'altra tecnica correlata è quella che prevede l'utilizzo di primer specifici reazione di amplificazione della PCR (PCRSSP). In questo caso se è presente l'amplificazione allora vuol dire che è presente quello specifico allele.

Ultimamente questi metodi sono stati sostituiti con quelli più evoluti come il metodo Sanger di sequenziamento del DNA. Non sempre però questo metodo riesce a distinguere in modo preciso le basi nucleotidiche soprattutto quando si parla di cis/trans negli individui eterozigoti. Un metodo che invece risolverebbe questo problema è il NGS con la creazione di librerie di DNA. Questa tecnica prevede di sequenziare parallelamente più frammenti di DNA in una singola corsa.²¹

Il procedimento di citometria a flusso (FCM) implica l'utilizzo del siero del soggetto e dei linfociti del donatore, insieme all'aggiunta di un anticorpo secondario contrassegnato con fluorescenza, specifico per le immunoglobuline umane, che evidenzia gli anticorpi legati ai linfociti. Mediante la FCM, è possibile individuare le variazioni nella distribuzione dei segnali di fluorescenza. Poiché la FCM comporta la quantificazione degli anticorpi legati e dei linfociti, tale metodo può rilevare gli anticorpi non anti-HLA, ma non è idoneo per valutare gli anticorpi che si legano al complemento. Rispetto alla LCT, la FCM offre una maggiore sensibilità nel rilevare le reazioni fisiologiche. Di conseguenza, questo approccio è ampiamente adottato per la valutazione incrociata nei paesi con un elevato numero di pazienti che richiedono un trapianto di organi.¹⁵

Il *virtual crossmatch* prevede la reazione del siero con gli antigeni HLA fissati su microsfere, tramite dei saggi in fase solida è possibile rilevare i segnali degli anticorpi anti-HLA legati. La piattaforma include un citometro a flusso o *Luminex*. A seconda del tipo di antigene HLA purificato sulle microsfere, è possibile utilizzare gli anticorpi reattivi del pannello (PRA) o il metodo SAB (*single-antigen bead*).¹⁵ Nel metodo di *Luminex*, vengono utilizzate microsfere *Luminex* di polistirene fluorescente, sulle quali

vengono fissati gli antigeni HLA purificati. Queste microsfere vengono quindi esposte agli anticorpi anti-HLA presenti nel siero del paziente. Successivamente, il complesso formato dalle microsfere e dagli anticorpi viene rilevato utilizzando un'immunoglobulina antiumana marcata con ficoeritrina fluorescente come anticorpo secondario, attraverso la piattaforma *Luminex*. La rilevazione fluorescente avviene tramite un laser rosso, che identifica il tipo di microsfere *Luminex* e quindi l'antigene HLA ad esse associato, e un laser verde, che rileva la ficoeritrina presente sull'anticorpo secondario.¹⁵

La lettura dei valori di fluorescenza *Luminex* è rappresentata dall'intensità media di fluorescenza (MFI), che indica l'intensità del segnale emesso dalla ficoeritrina su ciascuna microsfera *Luminex*. Di solito, i laboratori eseguono studi di validazione per stabilire la relazione tra i livelli di anticorpi determinati utilizzando i SAB (*Single Antigen Beads*) e il *crossmatching* del flusso. A tale scopo, viene confrontata la forza del legame dell'anticorpo alle SAB, espressa attraverso l'MFI, con il grado di *crossmatching* del flusso. In generale, livelli di MFI superiori a 1000 o 5000 vengono considerati risultati positivi, mentre livelli superiori a 8000 o 10000 possono indicare la presenza di anticorpi citotossici e hanno una rilevanza clinica. Tuttavia, l'MFI può essere influenzata da diversi fattori tecnici e biologici. La densità dell'antigene sulle microsfere può variare a seconda del tipo di molecola HLA, del produttore o del lotto del test. Inoltre, la densità dell'antigene sulle microsfere potrebbe non rispecchiare l'espressione naturale delle molecole HLA sulle cellule in vivo. Di conseguenza, gli anticorpi anti-HLA potrebbero non essere rilevati se non sono in grado di legarsi alle molecole HLA deformate. Al contrario, potrebbero essere rilevati anticorpi clinicamente insignificanti che si legano all'antigene denaturato ma non a quello intatto.¹⁵

3.7 PRA

Sono state sviluppate delle tecniche in fase solida che incentivano l'utilizzo del *virtual crossmatch*. Attraverso queste tecniche un donatore che non

presenta specifici antigeni HLA (U-HLA) viene identificato per il candidato.^{8,24}

Nei centri specializzati si utilizza un pannello reattivo per verificare la presenza di anticorpi (cPRA). Il cPRA è una percentuale che caratterizza la frequenza di HLA nella popolazione dei donatori non adatti al trapianto.

È stata calcolata tramite uno studio di 12000 donatori di rene Americani tra il 2003 e il 2005.²⁴

Storicamente la PRA veniva verificata utilizzando linfociti umani, ma attualmente le microsfere con gli antigeni HLA vengono purificati da linfociti umani attraverso l'ingegneria genetica.¹⁵

Il cPRA dipende dalla soglia di legame dell'anticorpo che si è prefissata. La maggior parte dei centri utilizza come valore soglia 5000 MFI.

Nel caso in cui il cPRA sia maggiore di 50 – 70% si possono utilizzare delle specifiche terapie per abbassare questa percentuale e rendere il paziente con meno rischi.²⁴

Lo studio di Kransdorf et al. "Calculated panel-reactive antibody predicts outcomes on the heart transplant waiting list"⁸ ha dimostrato come i candidati a trapianto cardiaco con un cPRA più elevato hanno una minore probabilità di trapianto e quindi una maggiore probabilità di essere tolti dalla lista d'attesa e di prognosi infausta.

Se si va ad analizzare i cPRA i candidati sensibilizzati con cPRA >80% hanno un'incidenza di eventi avversi molto aumentata, anche dopo aver preso in considerazioni eventuali confondenti come l'urgenza medica, il sesso e la diagnosi. I riceventi con una cPRA dopo il trapianto >20% hanno un rischio maggiore di prognosi infausta.⁸

Da qui l'importanza di inserire UA-HLA prima del trapianto per prevenire la formazione di DSA nel paziente ricevente con un corrispondente anticorpo anti-HLA. Ricordiamo come il DSA può essere causa di rigetto sia iperacuto che AMR precoce.⁸

Quando il grado di sensibilizzazione aumenta, aumentano anche le probabilità di rimozione dalla WL e quindi la probabilità di morte.

Molti centri di trapianto escludono tutti gli antigeni HLA per un anticorpo sopra un certo MFI (spesso 5000). A volte questa strategia può essere eccessiva in quanto lo studio dimostra come in pazienti con un MFI "basso"(5000) non avevano esiti differenti ad 1 anno dal trapianto. Pertanto sarebbe più sensato valutare il paziente singolarmente tramite tecniche multiple. ⁸

3.8 MONITORAGGIO POST TRAPIANTO

Negli anni l'incidenza del rigetto acuto sta diminuendo, rendendo il rigetto cronico, nello specifico AMR (*Antibody Mediated Rejection*), la causa principale di rigetto che porta a morte circa nel 35-40% dei casi dopo 5 anni ^{16,25}. Nel post-trapianto molti pazienti sviluppano anticorpi anti-HLA donatori specifici (DSA). Da alcuni studi si è dimostrata che c'è una correlazione tra la produzione de novo dei DSA nel post-trapianto e l'*outcome* del trapianto stesso. Ossia un effetto dannoso nei confronti dell'organo trapiantato. ^{23,26}

Le condizioni più gravi associate a DSA nel trapianto di cuore sono il rigetto iperacuto e nei minuti e nelle ore post-intervento l'insufficienza cardiaca acuta post-trapianto. Si può verificare una grave disfunzione cardiaca post-trapianto quando un alto titolo di DSA interagisce con l'endotelio vascolare portando ad una reazione di legame del complemento nei vasi sanguigni che porta alla morte cellulare, all'attivazione delle cellule infiammatorie e aggregazione piastrinica entro minuti o ore dopo la riperfusione provocando ischemia diffusa e necrosi nel cuore trapiantato, che può portare a prognosi infausta. ¹⁵

La causa principale di rigetto iperacuto è l'anticorpo donatore specifico già presente al momento del trapianto (ricevente presensibilizzato), grazie al "*managment*" pre-trapianto tale reazione iperacuta è diventata rarissima.

Per il monitoraggio dei DSA de novo ci si avvale di due tecniche prevalentemente. Il primo test viene eseguito sul siero post-trapianto di FC-XM questo test però potrebbe dare dei risultati non corretti in quanto mette in evidenza se sono stati prodotti anticorpi che si legano agli antigeni HLA

può legarsi anche ad anticorpi non-HLA dando falsi positivi. Il secondo metodo è l'utilizzo di tecniche in fase solida SBA con SPA (es. *Luminex beads*) gli antigeni HLA in questo caso sono fissate su microsfere dando la possibilità di identificare più anticorpi contemporaneamente nel siero del paziente. In questo caso potrebbero essere messi in evidenza anche anticorpi non legati agli antigeni HLA e quindi potenzialmente inutili.¹⁶

Il *gold standard* quindi è l'unione delle due tecniche in cui singoli antigeni HLA purificati sono attaccati a microsfere capaci quindi di determinare la specificità e la forza degli anticorpi anti-HLA. I seri positivi possono essere ulteriormente valutati andando a verificare la presenza di frammenti di complemento come C1q.^{16,27}

Il test con C1q è basato sul legame degli anticorpi anti-HLA con C1q, necessario per l'attivazione della cascata del complemento con la via classica che porta a danno endoteliale e necrosi. Il test sembra molto più sensibile di quello standard nel rilevare gli anticorpi che si legano al complemento.^{15,28}

Alcuni studi poi eseguiti da Schaub et al. Hanno messo in evidenza come una eventuale negatività del test non sempre è corrispondente all'assenza completa di forti sottoclassi di IgG leganti il complemento.^{15,29}

L'interpretazione della rilevanza clinica alla positività ai DSA è difficile. Attualmente il livello di legame dell'anticorpo specifico anti-HLA è espresso come intensità media di fluorescenza (MFI) che non dovrebbe essere un valore quantificabile perché misura il grado di saturazione delle microsfere. Il problema principale attuale comunque rimane la standardizzazione del valore tra laboratori e che l'MFI non può essere considerato un adeguato indicatore del livello anticorpale.^{16,23}

I DSA de novo hanno maggior incidenza nel primo anno post-trapianto e predomina la componente DSA contro gli antigeni HLA di classe II (50-65%) seguiti da quelli contro entrambe le classi (18-30%). Quelli solamente contro la classe I sono l'11-20%. In una minoranza di pazienti bisogna ricordare che i DSA sono passeggeri e sono associati a particolari condizioni avverse.¹⁶

Molti studi differenti confermano il fatto che chi produce DSA de novo ha una sopravvivenza inferiore rispetto a chi presenza DSA già al trapianto. Addirittura, il tasso di sopravvivenza è maggiore nei pazienti che presentano DSA già al trapianto rispetto a chi non li presenta in quanto probabilmente ha una migliore gestione degli anticorpi anti-HLA.^{16,30}

Smith et al tramite i suoi studi ha dimostrato quanto i DSA abbiano un ampio impatto sulla sopravvivenza: il tasso di sopravvivenza era il 21% nei pazienti con DSA de novo contro un ben più alto 72% nei pazienti che non presentavano DSA su uno studio di 105 pazienti pediatrici.³¹

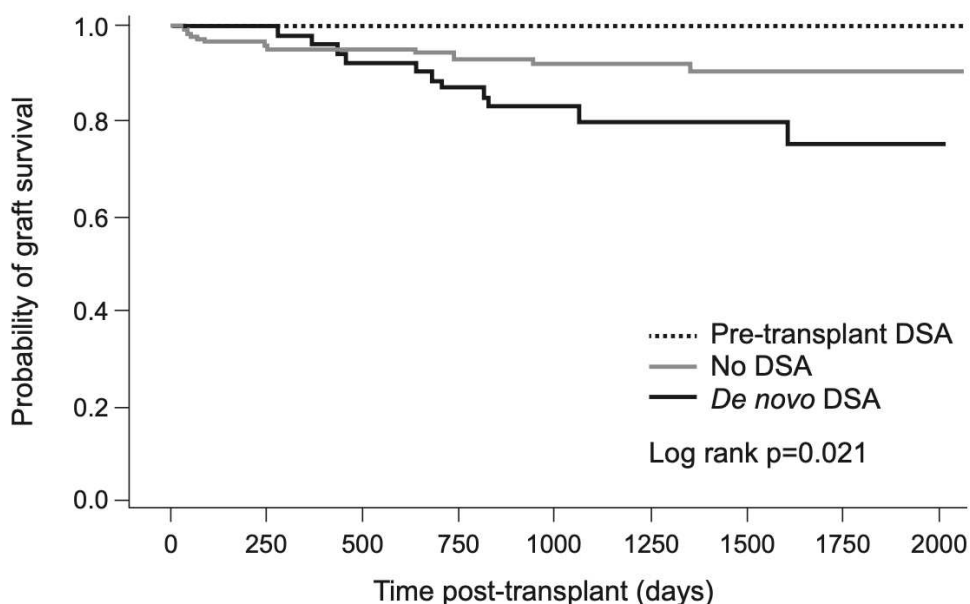


Figura 4 - Sopravvivenza di pazienti adulti sottoposti a trapianto cardiaco senza DSA (n = 141), DSA preesistente (n = 18) o DSA de novo (n = 53).³²

Nello studio di Clerkin e colleghi, si è provato a cercare una corrispondenza tra il tipo di DSA e l'aumento di rigetto. Si è dimostrato come i pazienti senza DSA di classe II avevano il 100% di sopravvivenza e nello specifico gli anticorpi DQ sono particolarmente sfavorevoli.^{16,32}

Ho et al. Durante le sue analisi ha messo in evidenza come la sopravvivenza a 15 anni era del 70% nei pazienti che non avevano anticorpi

anti-HLA, del 71% nei pazienti con positività degli anticorpi solo prima del trapianto e del 47% nei pazienti positivi sia prima che dopo.^{15,33}

I controlli vengono fatti più frequentemente nel periodo subito post-operatorio e successivamente ogni 6 o 12 mesi in caso di necessità o segni clinici o patologici di disfunzione del trapianto.²³

3.9 RIGETTO ANTICORPO MEDIATO (AMR)

Il rigetto mediato da anticorpi negli ultimi 25 anni ha preso sempre di più maggiore importanza. Già dagli anni '80 Hammond et al dimostrò come la presenza di AMR porti ad una ridotta sopravvivenza.

Nel 1990 la ISHLT ha introdotto come segno distintivo e grave l'immunofluorescenza positiva, vasculite o edema grave in assenza di infiltrati cellulari. Questo lavoro ha portato a raccomandare l'esecuzione della immunofluorescenza sulle biopsie miocardiche nei trapiantati per le prime sei settimane successive al trapianto.^{34,35}

Nel 2005 c'è stata poi una revisione da parte del ISHLT dei criteri diagnostici e la nomenclatura che comprendono i caratteri istopatologici e i criteri immunologici.^{19,34}

Attualmente la vera incidenza dell'AMR non è nota per la mancanza di screening da parte dei programmi, probabilmente quindi è sottostimata.³⁶

I fattori di rischio segnalati per l'AMR nei riceventi di trapianto di cuore includono PRA elevato, sieropositività al citomegalovirus, precedente supporto circolatorio meccanico, precedente trattamento con muromonab-CD3 e sviluppo di anticorpi contro muromonab-CD3 monoclonale di topo, anamnesi di nuovo trapianto, multiparità e positività al PRA.³⁶

I segni AMR del trapianto di organo da donatore esterno includono i sintomi della compromissione sistolica e diastolica dei ventricoli destro e sinistro (LV), tra cui dispnea, ortopnea, dispnea parossistica notturna, aumento della pressione venosa giugulare, edema e distensione addominale e si associa a una compromissione emodinamica nel 10-47% dei casi.^{36,37}

I criteri per definire la compromissione emodinamica sono stati molto variabili nella letteratura e includendo una riduzione della frazione di eiezione del ventricolo sinistro, un innalzamento delle pressioni intracardiache inspiegato con una contemporanea diminuzione del flusso cardiaco e la necessità di terapia inotropica. La definizione precisa di compromissione emodinamica manca di uniformità e i criteri specifici per la disfunzione possono variare dalla ridotta frazione di eiezione fino allo shock cardiogeno che richiede il supporto inotropo.³⁶

I danni dell'allotrapianto da parte degli anticorpi si verificano soprattutto attraverso l'attivazione del complemento. I DSA possono anche causare danno attraverso il reclutamento del recettore Fc delle cellule infiammatorie con il rilascio dei mediatori. Gli anticorpi anti MHC possono, infine, causare danni diretti a livello dell'endotelio capillare mentre danni indiretti attraverso il complemento o il reclutamento delle cellule infiammatorie con il recettore FC.¹⁵

Dal punto di vista morfologico l'AMR si identifica dopo colorazione con ematossilina ed eosina con allargamento delle cellule endoteliali o il rigonfiamento e l'accumulo di macrofagi nei piccoli vasi miocardici. Le caratteristiche immunopatologiche invece comprendono oltre alla presenza di pezzi del complemento la presenza nei capillari di immunoglobuline (IgG, IgM e IgA) oppure la deposizione di sottoprodotti del complemento associati alla presenza di macrofagi intravascolari CD68. Nel 2011 è stato pubblicato il lavoro del Consensus Meeting dell'AMR dove si raccomandava di non valutare più l'AMR in base ai dati clinici e sierologici. La diagnosi a questo punto può essere stabilita solamente con l'utilizzo dei criteri immunopatologici e istopatologici. Si può distinguere AMR in silente quando si accerta la presenza di C4d nei capillari miocardici senza ulteriori anomalie e può evolvere in subclinico quando oltre ai depositi si associano alterazioni dei miociti. Dal 2011 al 2012 durante le riunioni annuali del ISHT sono stati meglio definiti i criteri che vengono ancora utilizzati.³⁴

Istopatologia AMR

Le caratteristiche istopatologiche dell'AMR comprendono le lesioni dei capillari interstiziali con la presenza di cellule endoteliali rigonfie e i macrofagi a livello intravascolare. Per descriverlo si preferisce la dicitura "cellule mononucleate attivate" perché spesso è difficile distinguere queste cellule da altre tipologie di cellule come i linfociti. Nel miocardio normale sono presenti molti spazi interstiziali per la presenza di una rete di capillari ben rappresentata. Nell'interstizio miocardio nel AMR è rappresentata una quota maggiore di cellule e nelle sezioni longitudinali la componente capillare e venule è esagerata. La quantità di macrofagi che si accumula a livello intravascolare può variare e può essere osservata insieme alle altre cellule mononucleate in altri contesti. La presenza di "cellule mononucleate attivate" si può quindi definire solo nel caso in cui la presenza di monociti sia più che occasionale o multifocale e questo aumento la possibilità che si stia riferendo a AMR.

In generale, comunque, c'è una diffusa presenza di alterazioni a livello del microcircolo mentre i cambiamenti morfologici sono solamente occasionali. Bisogna sempre ricordare che la diagnosi fatta senza il supporto immunopatologico è sconsigliata in quanto potrebbe portare a delle diagnosi falsamente positive.

I cambiamenti microvascolari oltre al AMR possono dipendere anche da altri fattori come i metodi di conservazione del tessuto e da inadeguata lavorazione dei campioni. Importanti cambiamenti possono anche essere visti nel caso di ischemia. Pertanto, i fattori che sono importanti da considerare sono i miociti, l'edema, la presenza di tessuto di granulazione e macrofagi.

La distinzione tra ACR e AMR si può fare prendendo in considerazione linfociti interstiziali e macrofagi che sono presenti a livello extra vascolare. L'edema è definito come la presenza tra i miociti di filamenti proteici eosinofili e attorno al microcircolo ed è da considerare come uno stadio più avanzato di AMR. A volte l'edema può essere osservato anche a livello

dell'endocardio. Esso può essere una componente dell'ischemia sia da danno da conservazione sia da vasculopatia post-trapianto.³⁴

L'emorragia, i trombi intravascolari, gli infiltrati neutrofilici intravascolari e perivascolari sono criteri che sono riscontrabili nei casi più severi di danno anticorpo mediato. La Tabella IX Riportata di seguito riassume i criteri istopatologici (Berry G et al 2013).³⁴

Tabella IX - Criteri morfologici per la diagnosi dell'AMR³⁸

CRITERI MORFOLOGICI	DESCRIZIONE
Cellule mononucleate attivate intravascolari	<ol style="list-style-type: none"> 1. Accumulo di macrofagi intravascolari nei capillari e nelle venule che distendono e riempiono i lumi vascolari 2. Cellule endoteliali con grandi nuclei e proiezioni citoplasmatiche espanse che sembrano restringere o occludere i lumi.
Rigetto anticorpale mediato severo	Emorragia, edema interstiziale, necrosi dei miociti, frammentazione capillare, infiltrati infiammatori misti, picnosi delle cellule endoteliali e/o carioressi.

Nella Figura 5 sono visibili alcuni vetrini colorati con ematossilina eosina che mostrano le caratteristiche dell'AMR.

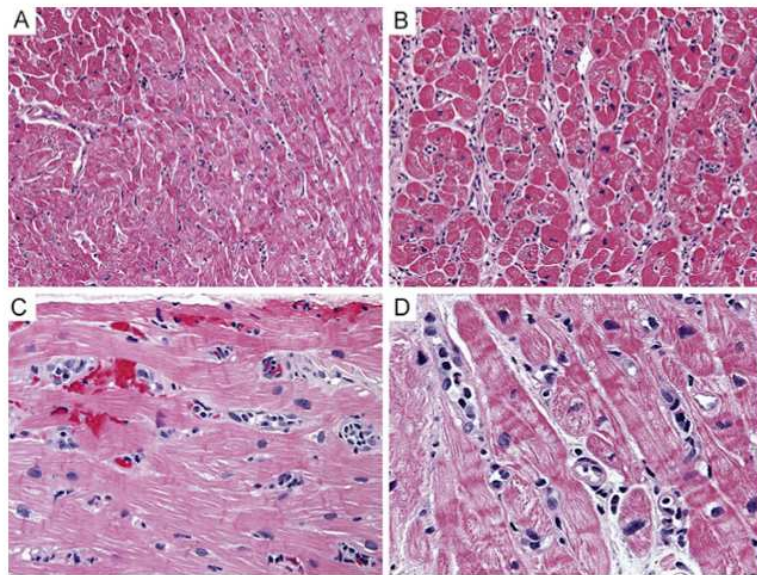


Figura 5 - Alcune foto al microscopio mostrano le caratteristiche morfologiche del rigetto mediato da anticorpi cardiaci. (A) Nell'immagine B si può notare un aumento del numero di macrofagi intravascolari. Nelle figure C e D si possono identificare le cellule mononucleari attivate con cambiamenti interstiziali di cellule endoteliali e macrofagi intravascolari. Le cellule mononucleate attivate riempiono ed espandono i vasi interstiziali.³⁸

Immunopatologia AMR

L'utilizzo dei pannelli anticorpali per definire l'AMR è stato proposto nella conferenza del 2010 per poi essere confermato durante i congressi del 2011 e 2012.³⁹

Nella Tabella X sottostante sono riportate le raccomandazioni per i pannelli da eseguire nel caso di paraffina (IHC) o tessuto congelato (IF).

Tabella X - Pannello primario e secondario per la caratterizzazione immunoistochimica dell'AMR³⁸

VARIABILE	PANNELLO PRIMARIO - OBBLIGATORIO	PANNELLO SECONDARIO - OPZIONALE
Sezione immunoistochimica in paraffina	C4d e CD68	Pan-T-cell CD3 Pan-T-cell CD20 Complemento C3d Cellule endoteliali CD31 o CD34 Proteine regolatorie del complemento Altro
Sezione immunoistochimica congelata	C4d, C3d Anti-HLA-DR (utilizzati da alcuni centri per identificare i capillari)	Fibrina IgG e IgM Altro

Dal 2010 è stato imposto un approccio in cui il primo pannello AMR per l'IHC in paraffina comprenda sia C4d che i marcatori anti-macrofago CD68. Un secondo pannello invece, facoltativo, comprende altri marcatori anti-complemento e anticorpi vascolari (CD31 o CD34) oltre ai pannelli T-marker (CD3) o B-marker (CD20).³⁸

Un risultato positivo per la colorazione C4d può essere descritto con una colorazione diffusa, debole o forte nel miocardio intatto. La colorazione forte e focale dovrebbe suggerire un follow-up stretto con valutazione dei DSA. I macrofagi CD68 possono essere distinti dai macrofagi interstiziali perché prendono una caratteristica conformazione a perline o a grappolo. Nella

Tabella XI sono riportati i criteri per la diagnostica con la tecnica dell'immunofluorescenza.³⁸

Tabella XI - criteri per la diagnosi patologica dell'AMR usando l'immunofluorescenza³⁸

VARIABILE	SCORING SYSTEM	RISULTATI
Distribuzione nei capillari di C4d/C3d	0: <10% = negative 1: 10%–50% = colorazione focale 2: >50%= colorazione multifocale/diffusa	Risultati finali di C4d/C3d: C4d/C3d positivo: colorazione multifocale/diffusa or forte colorazione
Intensità di C4d/C3d nei capillari	0: negativo 1: poca colorazione = 0-1+ 2: forte colorazione = 2-3+	
Distribuzione di HLA-DR	0: <10% = negative 1: 10%–50% = colorazione focale 2: >50% = colorazione multifocale/diffusa	Risultati finali HLA-DR (per valutare l'integrità vascolare)
Intensità di HLA-DR	0: negativo 1: poca colorazione = 0-1+ 2: forte colorazione = 2-3+	

Nella Figura 6 sono visibili alcuni vetrini che mostrano le caratteristiche immunohistochimiche dell'AMR.

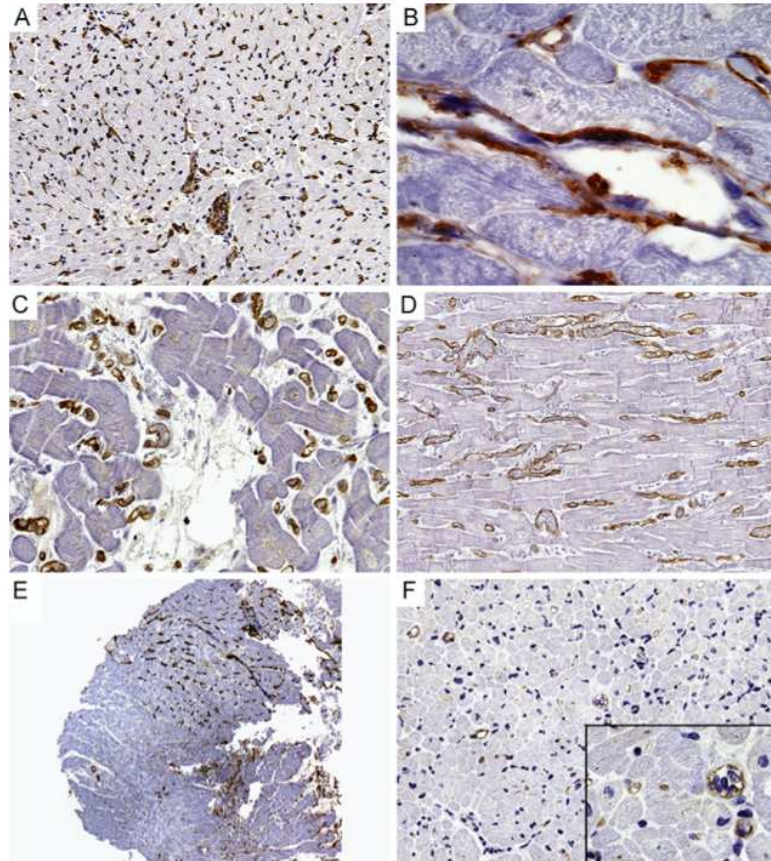


Figura 6 – Nelle immagini sopra 'immunoistochimica mostra la deposizione di C4d nell'AMR. (A) Nella figura B l'ingrandimento della scansione mostra una colorazione uniforme e diffusa di tutti i capillari interstiziali, creando un motivo a "ciambella". Nella figura C la localizzazione subendoteliale uniforme di C4d è visibile nei capillari. Nella figura D ha un profilo di colorazione simile è visibile per i vasi disposti nel piano longitudinale della sezione. Nella figura E la colorazione C4d può essere focale in un pezzo di miocardio o macchiare alcuni ma non tutti i frammenti del campione o solo una parte di un frammento. Nella figura F la colorazione C4d capillare debole diffusa è riconosciuta come pattern di colorazione positivo. ³⁸

3.10 pAMR

Nel 2012 si è arrivati alla conclusione che fosse necessaria una standardizzazione e una migliore riproducibilità del sistema. Come già proposto nel 2011³⁹ la classificazione combina i risultati istopatologici con quelli immunopatologici e prende il nome di “patologica o pAMR”. Confermando anche che la diagnosi verrà formulata come già detto nel 2010 senza prendere in considerazione la disfunzione clinica o la positività ai DSA.⁴⁰

La Tabella XII riassume la classificazione in cui si basa l'AMR attualmente.

34

Tabella XII – Classificazione pAMR per AMR dell'ISHLT 2013 ³⁸

GRADO	DEFINIZIONE	SUBSTRATI
pAMR 0	Negativa per AMR	Studi istologico e immunologico entrambi negativi
pAMR 1 (H+)	Solo l'istopatologica positiva per AMR	Studio istologico è positivo e l'immunologico è negativo
pAMR 1 (I+)	Solo l'immunoistochimica positiva per AMR	Studio istologico è negativo e immunologico è positivo (CD68+ e/o C4d+)
pAMR 2	Patologica per AMR	Studi istologico e immunologico entrambi positivi

pAMR 3	Severamente patologica per AMR	Emorragie interstiziali, capillari frammentati, infiltrati infiammatori misti, pinocitosi e marker per l'edema e l'immunopatologico è positivo. Questo caso è associato a una profonda disfunzione emodinamica.
--------	--------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.11 DSA NELL'AMR

In seguito a recenti scoperte, è emerso che i DSA non solo aumentano l'aterosclerosi, ma accelerano e anticipano la fibrosi dell'organo trapiantato. Nella AMR, la maggior parte dei DSA conosciuti prende di mira gli HLA. I DSA diretti contro entrambe le classi di antigeni HLA sono sempre dannosi, ma quelli diretti contro gli antigeni di classe II sono particolarmente associati all'AMR tardiva, alla produzione di nuovi anticorpi e alla ridotta sopravvivenza del trapianto.

È importante notare che i DSA non si limitano agli antigeni HLA; sono stati individuati anche diversi DSA non anti-HLA, che prendono di mira antigeni espressi dall'endotelio e accelerano il danno ai vasi sanguigni. Inizialmente si pensava che il danneggiamento dell'endotelio fosse causato dall'attivazione del sistema del complemento, ma studi successivi hanno dimostrato che questa attivazione non è necessaria per la vasculopatia del trapianto. Tuttavia, i DSA anti-HLA che si legano al complemento sono associati a un maggiore AMR, a un danno tissutale più grave e a un'infiammazione dei vasi sanguigni più estesa rispetto ai DSA anti-HLA

non leganti al complemento. Questi risultati dimostrano il coinvolgimento evidente dell'endotelio nell'AMR e l'associazione tra DSA, complemento e infiammazione delle cellule endoteliali e danno vascolare (CAV).^{16,26}

Inizialmente il sistema immunitario del ricevente viene a contatto con gli antigeni del donatore nel sistema microvascolare del l'organo trapiantato, quindi l'endotelio è il principale bersaglio delle risposte immunitarie. In studi recenti è stato dimostrato l'associazione tra AMR e l'infiammazione, l'attivazione degli anticorpi e della cascata del complemento, confermando anche che l'attivazione dell'endotelio come una caratteristica specifica e distintiva.⁴¹⁻⁴³

È stato notato come l'attivazione del complemento è una conseguenza del legame DSA-HLA sull'endotelio. Questo meccanismo porta anche all'esocitosi di molecole protombotiche e proinfiammatorie già presente dal legame con DSA ma aumentata dalla presenza del frammento C5a del complemento.^{26,44}

L'infiltrazione leucocitaria è una caratteristica del rigetto del trapianto e si possono notare spesso lo stesso numero di linfociti intravascolari (CD3+) e di cellule mieloidi (CD68+) nelle biopsie cardiache.²⁶

In condizione di infiammazione, c'è una sovra regolazione delle molecole HLA e delle molecole di adesione presenti a livello dell'endotelio le quali attivano i linfociti T CD4+ con l'incremento concomitante di IL-2 e IFN- γ .

La presenza di linfociti Th17 nel cuore trapiantato invece è spesso sintomo di una minore sopravvivenza perché queste cellule attivano la via non canonica di NF- κ B.

Come precedente detto l'HLA di classe II ha un impatto funzionale sulle risposte dei linfociti. Può legarsi all'endotelio attivandolo e inducendo la fosforilazione di Akt, MEK e ERK agendo su vie che regolano la crescita e la proliferazione della cellula.

La Figura 7 schematizza le varie vie sopra citate.²⁶

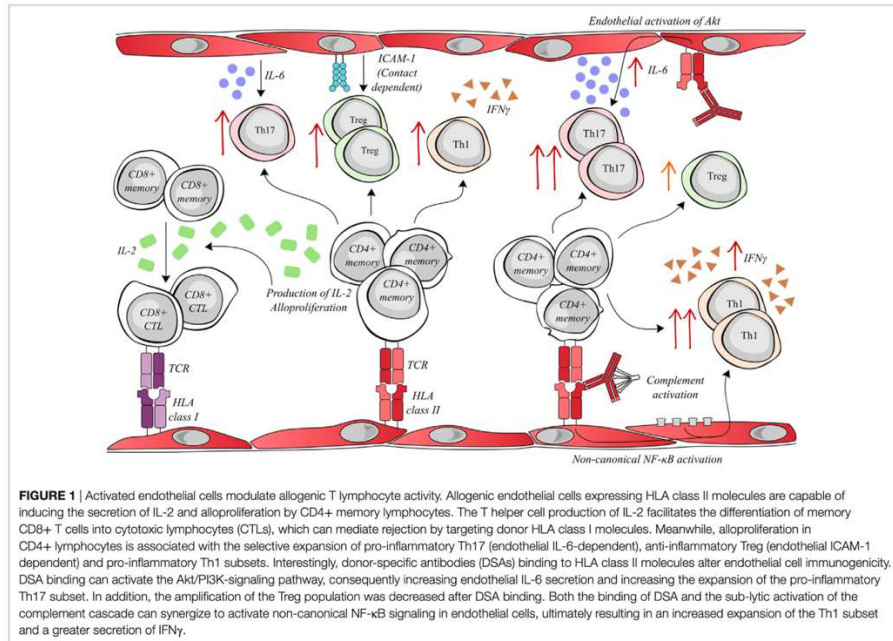


Figura 7 - Le cellule endoteliali attivate influenzano l'attività dei linfociti T allogenici. Le cellule endoteliali allogeniche che esprimono molecole HLA di classe II possono indurre la produzione di IL-2 e la proliferazione dei linfociti memoria CD4+. Ciò favorisce la differenziazione dei linfociti T CD8+ in linfociti citotossici (CTL) che mirano alle molecole HLA di classe I del donatore, causando il rigetto. L'espansione dei linfociti CD4+ è associata a diversi sottotipi di linfociti pro-infiammatori (Th17, Treg e Th1). Gli anticorpi specifici del donatore (DSA) legati alle molecole HLA di classe II delle cellule endoteliali modificano la loro immunogenicità, attivando vie di segnalazione che influenzano l'espansione dei sottotipi pro-infiammatori.²⁶

Una maggiore infiltrazione linfocitaria porta una gravità maggiore e quindi ad un danno dell'allotrapianto. Alcuni studi su biopsie hanno analizzato i trascritti dei macrofagi identificando i geni che identificano i pazienti AMR e non AMR. I geni mieloidi sono correlati sia con la gravità dell'AMR ma anche con il MFI anti-HLA del DSA. I cambiamenti di questi geni suggeriscono anche che la fagocitosi sia una via attiva del AMR.

Monociti e macrofagi hanno quindi un importante compito nell'AMR in quanto elaborano e presentano l'antigene che porta poi all'attivazione e la liberazione di citochine. Sono proprio le cellule endoteliali quindi ad attivarsi in maniera atipica sia dal punto di vista immunologica che scarsa capacità di modulare le risposte anticorpali.^{26,45}

Un valore soglia di riferimento per i valori MFI DSA potrebbe essere utile per identificare precocemente pAMR. Ci sono degli studi retrospettivi sui bambini di Ware et al. Che tramite il modello ROC ha dimostrato un *cut off* di MFI pari a 5100 per gli anticorpi di classe I e di 2000 per gli anticorpi di classe II per prevedere il pMAR di classe 2 e 3 con buona specificità e sensibilità.^{16,46} Un'altra analisi ROC ha dimostrato come l'MFI per qualsiasi DSA sopra i 6000 fosse indicativo della presenza del frammento C4d (essenziale per la classificazione pAMR).^{16,47}

Altri studi ancora hanno dimostrato risultati simili su una popolazione adulta. Quindi si può dire che il rilevamento del DSA è predittivo di AMR, comunque ricordando che l'assenza di DSA non esclude l'AMR.¹⁶

3.12 CAV

La CAV è una forma proliferativa della tonaca intima di aterosclerosi, è proliferativa e obliterante. La prognosi migliora grazie ai controlli tramite ecografia e angiografia e ai progressi farmacologici viene diagnosticata nel 10% dei casi nel primo anno e in più della metà dei casi entro 10 anni. L'alloimmunità è la principale causa ma ci sono molti fattori che possono incidere. L'AMR tardiva o asintomatica è strettamente associata a un'incidenza maggiore di CAV. I DSA oltre al loro ruolo nell'AMR causando danni all'endotelio vascolare attivando il complemento C4d o i macrofagi e le cellule NK che aumentano la progressione aterosclerotica. I numerosi studi fatti sulla correlazione tra DSA e CAV hanno portato risultati contrastanti anche se tutti hanno dimostrato tassi più elevati di CAV negli individui positivi ai DSA.¹⁶

Gli studi con un breve periodo di follow up potrebbero non essere significativi in quanto la CAV è progressiva e tra la formazione di DSA e la disfunzione di organo trapiantato possono passare parecchi mesi se non anni.¹⁶

La CAV nell'azienda ospedaliera di Padova viene indagata tramite angiografia. È consigliato eseguire questo esame strumentale alla fine del

primo anno di follow up e poi periodicamente ogni 2 anni se non ci sono problematiche. La CAV viene classificata secondo lo schema di classificazione ISHTL riportato nella Tabella XIII.²⁴

Tabella XIII - Classificazione ISHTL della CAV

CAV	Descrizione
ISHTL CAV0 (Non significativa)	Nessuna lesione angiografica rilevabile
ISHTL CAV1 (lieve)	Angiografia sinistra principale (LM) <50%, o vaso primario con lesione massima <70%, o qualsiasi stenosi di branca <70% (incluso restringimento diffuso) senza disfunzione dell'allotrapianto
ISHTL CAV2 (moderato)	LM angiografico <50%; un singolo vaso primario ≥70% o stenosi di ramo isolato ≥70% nei rami di 2 sistemi, senza disfunzione dell'allotrapianto
ISHTL CAV3 (severo)	LM angiografico ≥50%, o stenosi di due o più vasi primari ≥70%, o stenosi di branca isolata ≥70% in tutti e 3 i sistemi; o ISHLT CAV1 o CAV2 con disfunzione dell'allotrapianto (definita come LVEF ≤45% di solito in presenza di anomalie della cinetica di parete regionale) o evidenza di significativa fisiologia restrittiva (che è comune ma non specifica)

Alcuni pazienti possono essere valutati con una nuova tecnica di angiografia basata su tomografia computerizzata e la riserva frazionale di flusso derivata (FFRCT): CAD-RADS.

3.10 TRATTAMENTO AMR

Il trattamento dell'AMR si concentra sulla soppressione e sulla rimozione degli anticorpi circolanti attraverso procedure come la plasmateresi e l'uso

di farmaci specifici come rituximab (un anticorpo monoclonale chimerico che mira all'antigene CD20), bortezomib (un inibitore del proteasoma) ed eculizumab (un inibitore terminale del complemento). Durante il trattamento immunosoppressivo, è fondamentale prendere precauzioni per prevenire le infezioni opportunistiche e mantenere una sorveglianza costante per rilevare le manifestazioni cliniche più comuni di infezioni causate da agenti come il citomegalovirus (CMV), l'Aspergillus, la Nocardia e la toxoplasmosi.¹¹

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo dello studio

Lo scopo di questo studio è quello di analizzare la presenza degli anticorpi anti-HLA donatore specifici sierici nel follow-up dei pazienti trapiantati di cuore e di valutarne il loro effetto sul graft.

MATERIALI E METODI

Popolazione di studio

In questo studio monocentrico retrospettivo longitudinale sono stati selezionati pazienti sulla base del monitoraggio anticorpale, infatti dal 2016 il nostro centro ha iniziato il monitoraggio anticorpale a 1 mese, 3 mesi 6 mesi e 1 anno post-trapianto secondo le linee guida del NIT (*North Italian Transplant*), randomicamente 80 pazienti adulti sottoposti a trapianto cardiaco nella U.O. Cardiocirurgia “Centro Gallucci” di Padova da Gennaio 2016 fino a Dicembre 2020.

Il range di età è di 17-72 anni, con mediana di 57 anni, il 26,25% di sesso femmine (21/80) e il 73,75% (59/80) di sesso maschile.

Sono stati raccolti tutti i dosaggi su siero degli anticorpi anti-HLA donatore specifici (DSA) e non donatore specifici con numero pari a 535 rilevazioni di cui l'82,43% eseguite nel primo anno (441/535) con una mediana di 5 per paziente.

Il numero di biopsie prese in considerazione sono 1086. La mediana per paziente è di 14 biopsie per paziente.

La Tabella XIV riportata a pagina seguente mostra la distribuzione della popolazione del nostro studio.

Tabella XIV - Descrizione della popolazione

Variabili N=80	
Età (anni)	57 (17 – 72)
Sesso, n (%)	
Maschile	73,75 (87%)
Femminile	21 (26,25%)
Pazienti per anno di trapianto, n (%)	
Pazienti trapiantati nel 2016	24 (30%)
Pazienti trapiantati nel 2017	25 (31,5%)
Pazienti trapiantati nel 2018	13 (16,25%)
Pazienti trapiantati nel 2019	12 (15%)
Pazienti trapiantati nel 2020	6 (7,5%)

Le variabili prese in considerazione per lo studio sono riportate nella Tabella XV con l'indicazione del periodo di indagine.

Tabella XV - Variabili dello studio

Variabili	Periodo di indagine
Esami ematochimici	Ogni 2 settimane per i primi 3 mesi e 1 volta al mese per il primo anno
Globuli bianchi	
Linfociti	
Monociti	
Eosinofili	
Creatinina	
CPK	
Funzionalità epatica	Ogni 2 settimane per i primi 3 mesi e 1 volta al mese per il primo anno
ALT	
AST	
GGT	

Funzionalità renale	Ogni 2 settimane per i primi 3 mesi e 1 volta al mese per il primo anno
eGFR	
Infezioni	
Test CMV	
Test EBV	
Dosaggio Farmaci nel sangue	Ogni 2 settimane per i primi 3 mesi e 1 volta al mese per il primo anno (quando somministrati)
Ciclosporina	
Everolimus	
Tacrolimus	
Dosaggio anticorpi anti-HLA	Ogni 2 settimane per i primi 3 mesi e 1 volta al mese per il primo anno in corrispondenza delle biopsie. In caso di rigetto o necessità più frequentemente
PRA	Una volta, pre-trapianto
Esami strumentali	
Angiografia (CAV)	La prima dopo il primo anno e poi ogni 2 anni dal trapianto
Ecocardiografia (FEV)	Durante il ricovero e dopo il primo anno dal trapianto o al bisogno
Terapia	Preso in considerazione il giorno prima della biopsia
Ciclosporina	
Prednisone	
Micofenolato	
Tacrolimus	
Everolimus	

Esami ematochimici

Nella Tabella XVII sono riportati i valori di riferimento non patologici presi in considerazione. Gli esami ematochimici presi in considerazione sono corrispondenti al prelievo nel periodo corrispondente alla prima biopsia quindi circa a 2 settimane successive al trapianto.

Tabella XVI - Valori di riferimento esami ematochimici

Test	Unità di misura	valore minimo	valore massimo
Globuli bianchi	x10 ⁹ /L	4,4	11
Linfociti	x10 ⁹ /L	1,10	4,80
Monociti	x10 ⁹ /L	0,20	0,96
Eosinofili	x10 ⁹ /L	0	0,5
Basofili	x10 ⁹ /L	0	0,2
Creatinina	uMol/L	59	104
ALT	U/L	10	50
AST	U/L	10	45
GGT	U/L	3	65
CPK	U/L	60	190
eGFR	mL/min		
Ciclosporina	ug/L	150	300
Everolimus	ng/mL	3	8

Anticorpi anti-HLA

Il dosaggio degli anticorpi anti-HLA nei pazienti dello studio è stato eseguito nel laboratorio di riferimento dei trapianti della regione Veneto secondo linee guida con la metodologia *Luminex*. Gli anticorpi sono stati suddivisi in classe I e classe II. Si è poi fatta una distinzione tra anticorpi DSA e non DSA. I DSA di classe I sono poi stati suddivisi in anticorpi anti-HLA A, B e C, mentre quelli di classe II in anticorpi anti-HLA DR, DQ e DP. Per quanto riguarda i non DSA è stato preso in considerazione solo il valore maggiore

per ciascuna classe. Si divide la popolazione in 4 classi in base al valore di MFI:

- ≤ 3000
- 3001 - 5000
- 5001 - 9999
- ≥ 10000

Biopsie di monitoraggio

Sono state raccolte ed analizzate tutte le biopsie di monitoraggio post-trapianto e valutate le caratteristiche istologiche elencate nella Tabella XVII e classificate per rigetto umorale pAMR secondo la classificazione dell'ISHLT 2013³⁴ e per rigetto cellulare secondo la classificazione dell'ISHLT del 1990 e del 2005¹⁹

La necrosi miocitaria quando presente è stata divisa in:

- focale
- due focolai
- multifocale

L'infiltrato infiammatorio quando presente è stato diviso in:

- linfomonocitario focale
- linfomonocitario multifocale
- subendocardico
- linfomonociti intravascolari attivati

Il parametro "infiammazione microvascolare" comprende le voci "linfomonociti intravascolari attivati" e la presenza di vasculite.⁴⁸

Tabella XVII - caratteristiche istopatologiche analizzate

Variabili	Periodo di indagine
Biopsia	Ogni 2 settimane per i primi 3 mesi e 1 volta al mese per il primo anno.
Fibrosi	
Infiltrato infiammatorio	
Miocitolisi	
Necrosi	
Necrosi miocitaria	
Danno ischemico	
Edema	
Vasculite	
Microvasculopatia	
Trombosi dei vasi	
Grading del CD68	
Grading del C4d	
ACR score	
pAMR	
Effetto Quilty	

Dati pre-trapianto

Abbiamo raccolto di tutti i pazienti il PRA (*panel reactive antibodies*) eseguito con tecnica CDC (*complement dependent Cytotoxicity*).

Analisi statistica

La raccolta dei dati è stata effettuata mediante eCFR (*electronic Case Form Report*) sulla piattaforma REDCap, raggiungibile al link <https://edc01.unipd-ubep.it/redcap/>. Per ciascun paziente sono state raccolte informazioni relative all'anagrafica, alle caratteristiche cliniche, bioptiche e anticorpali.

Le variabili continue sono state descritte come mediane (range interquartile) e confrontate con il test di Wilcoxon. Le variabili categoriche sono state espresse come numeri (percentuali) e analizzate utilizzando il test chi-quadro o il test esatto di Fisher. Un livello significativo è stato considerato $p < 0.05$ per tutti i test. Per valutare l'associazione tra DSA e gli *outcome* di interesse è stato implementato un modello di regressione logistica univariabile, tenendo conto delle misure ripetute mediante Robust Covariance Matrix Estimates. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il software R (*R: The R Project for Statistical Computing*, no date), utilizzando i pacchetti *tidyverse*, *gtsummary*, *rms*.

RISULTATI

Popolazione dello studio

La popolazione è stata divisa inizialmente in: pazienti che hanno la positività agli anticorpi anti-HLA DSA e tutti gli altri pazienti.

Successivamente la popolazione generale con positività agli anticorpi anti-HLA è stata distinta in una popolazione con almeno una rilevazione anticorpi anti-HLA DSA e una popolazione con tutti gli anticorpi anti-HLA non DSA.

Esami biochimici

Gli esami biochimici eseguiti nei pazienti al momento della prima biopsia (circa due settimane dopo il trapianto) e del primo dosaggio anticorpale sono riportati nella Tabella XVIII.

Dall'analisi dei dati che mette a confronto la popolazione con anticorpi positivi anti-HLA DSA e la popolazione restante al primo dosaggio, emerge come quasi tutti i dati ematochimici non abbiano significativa rilevanza statistica.

L'unica eccezione è la GGT che una rilevanza statistica $p=0,034$. La popolazione con DSA positivi ha un valore maggiore di GGT di 138 U/L (90, 163) rispetto alla popolazione con DSA negativi (76 U/L 47, 131).

Tabella XVIII – dati espressi come mediana (I-III interquartile) e come numero assoluto (percentuale)

VARIABILI	DSA			p-value ²
	TOTALE (N = 80) ¹	NEGATIVO (N = 58) ¹	POSITIVO (N= 22) ¹	
GLOBULI BIANCHI (x10 ⁹ /L)	9.9 (6.8, 12.7)	9.1 (6.8, 11.8)	11.8 (6.6, 12.7)	0.4
NEUTROFILI (x10 ⁹ /L)	8.6 (5.5, 11.1)	8.1 (5.6, 10.7)	10.1 (5.5, 11.3)	0.4
LINFOCITI (x10 ⁹ /L)	0.44 (0.31, 0.69)	0.42 (0.29, 0.54)	0.48 (0.32, 0.73)	0.3

MONOCITI (x10 ⁹ /L)	0.66 (0.51, 0.88)	0.67 (0.50, 0.88)	0.65 (0.56, 0.88)	0.8
EOSINOFILI (x10 ⁹ /L)	0.09 (0.04, 0.14)	0.08 (0.04, 0.14)	0.10 (0.08, 0.14)	0.2
BASOFILI (x10 ⁹ /L)	0.010 (0.010, 0.023)	0.010 (0.010, 0.020)	0.020 (0.010, 0.028)	0.5
CREATININA (uMol/L)	94 (75, 130)	93 (72, 131)	102 (76, 110)	>0.9
ALT (U/L)	33 (21, 50)	32 (23, 47)	35 (19, 62)	>0.9
AST (U/L)	27 (20, 40)	27 (21, 39)	28 (18, 44)	0.8
GGT (U/L)	102 (52, 153)	76 (47, 131)	138 (90, 163)	0.034
Sconosciuto CPK (U/L)	8 32 (22, 56)	8 32 (20, 58)	0 37 (26, 48)	0.5
Sconosciuto eGFR (mL/min)	58 73 (49, 98)	41 72 (49, 92)	17 83 (59, 101)	0.4
Sconosciuto CMV	4	3	1	0.7
NEGATIVO	58 (81%)	40 (78%)	18 (86%)	
POSITIVO	14 (19%)	11 (22%)	3 (14%)	
Sconosciuto EBV	8	7	1	0.13
NEGATIVO	56 (78%)	37 (73%)	19 (90%)	
POSITIVO	16 (22%)	14 (27%)	2 (9.5%)	
Sconosciuto	8	7	1	

¹Median (IQR); n (%)

²Wilcoxon rank sum test; Fisher's exact test

Terapia

La Tabella XIX prende in considerazione in maniera estesa la terapia somministrata al momento della prima biopsia ai pazienti della popolazione. I dati analizzati non hanno dato un risultato significativo statisticamente e non ci sono differenze significative tra le due popolazioni di anticorpi positivi DSA e tutti gli altri pazienti.

Nella totalità dei dati analizzati ai pazienti è stato somministrata la ciclosporina. Sono state prese in considerazione 188 misurazioni di ciclosporina del sangue con una mediana di 188 ug/L (145, 228) che non si differenzia di molto nei due gruppi.

Anche per quanto riguarda gli altri farmaci presi in considerazione quindi, micofenolato, azatioprina, tracolimus e prednisone non c'è differenza statistica tra le due popolazioni.

Tabella XIX - dati espressi come mediana (I-III interquartile) e come numero assoluto (percentuale)

VARIABILI	TOTALE (N = 80) ¹	DSA		p-value ²
		NEGATIVO (N = 58) ¹	POSITIVO (N= 22) ¹	
CICLOSPORINA				>0.9
NON	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
SOMMINISTRATA				
SOMMINISTRATA	73 (100%)	51 (100%)	22 (100%)	
Sconosciuto	7	7	0	
CICLOSPORINA	200	200	212	>0.9
ORALE (mg)	(175, 225)	(175, 225)	(150, 225)	
Sconosciuto	9	9	0	
LIVELLI DI	188	192	180	>0.9
CICLOSPORINA (ug/L)	(145, 228)	(156, 220)	(144, 242)	
Sconosciuto	4	2	2	
PREDNISONE (mg)	5.00	5.00	7.50	0.10
	(5.00, 7.50)	(5.00, 7.50)	(5.00, 10.00)	
Sconosciuto	13	11	2	
MICOFENOLATO (mg)	360	360	360	0.5

	(360, 540)	(360, 540)	(360, 540)	
Sconosciuto	28	23	5	
AZATIOPRINA (mg)	38	38	NA	
	(31, 44)	(31, 44)	(NA, NA)	
Sconosciuto	78	56	22	
TRCROLIMUS (mg)				>0.9
0	71 (100%)	49 (100%)	22 (100%)	
Sconosciuto	9	9	0	
LIVELLI DI	0 (NA%)	0 (NA%)	0 (NA%)	
TACROLIMUS (ng/mL)				
Sconosciuto	80	58	22	

¹Median (IQR); n (%) ²Wilcoxon rank sum test; Fisher's exact test

Dati strumentali

I dati descritti in modo esaustivo nella Tabella XX ci dicono che i pazienti deceduti sono 9/80 (11%) ossia 3/22 (14%) pazienti con anticorpi anti-HLA positivi DSA e il 6/58 dei restanti pazienti comprendenti i pazienti con anticorpi anti-HLA positivi non DSA e anticorpi anti-HLA negativi.

Dall'esame angiografico eseguito al termine del primo anno di follow up è stato suddiviso il risultato in un gruppo di popolazione che comprendeva il risultato CAV0 o CAD-RADS 0, mentre i restanti pazienti sono stati messi in un secondo gruppo. Anche in questo caso non c'è differenza statisticamente significativa tra la popolazione con anticorpi anti-HLA positivi DSA e i restanti pazienti.

Dalle ecocardiografie eseguite durante il follow up si è tenuto in considerazione il dato della FEV per valutare la funzionalità cardiaca che risultata nella norma in entrambe le popolazioni.

Il dato pre-trapianto che valuta la presenza di anticorpi anti-HLA del ricevente (presensibilizzazione) risulta che nel gruppo di pazienti che sviluppano anticorpi anti-HLA DSA post-trapianto hanno un PRA lievemente aumentato rispetto all'altro gruppo di pazienti (range 0-20) con una mediana pari a 0 e con un p-value=0,023 statisticamente significativo.

Tabella XX - Caratteristiche strumentali

VARIABILI	ANTICORPI			p-value ²
	TOTALE (N = 80) ¹	NEGATIVO (N = 58) ¹	POSITIVO (N= 22) ¹	
PRA (%)	0 (0, 0)	0 (0, 0)	0 (0, 20)	0.023
FEV (%)	60.0 (55.8, 64.0)	60.0 (56.0, 64.0)	60.0 (56.0, 63.0)	0.7
Sconosciuto	16	13	3	
CAV				>0.9
0	75 (94%)	54 (93%)	21 (95%)	
1	5 (6.2%)	4 (6.9%)	1 (4.5%)	
MORTE				0.7
SI	9 (11%)	6 (10%)	3 (14%)	
NO	71 (89%)	52 (90%)	19 (86%)	

Biopsia di monitoraggio

Le biopsie sono state eseguite secondo protocollo e sono stati presi in considerazione i parametri descritti nella Tabella XXI a pagina seguente per una analisi con le rilevazioni degli anticorpi anti-HLA DSA positivi.

Il parametro “infiammazione microvascolare” comprende le voci “linfomonociti intravascolari attivati” e la presenza di vasculite.

Sicuramente il dato statisticamente significativo è il pAMR ($p < 0.001$) che corrisponde al grading dell'AMR.

I dati statisticamente significativi sono la vasculite ($p = 0.039$), trombosi dei vasi ($p = 0.021$), il grading C4d ($p < 0.001$), il grading CD68 ($p = 0,003$) e l'infiammatorio microvascolare ($p < 0.001$).

Tabella XXI – confronto tra gli anticorpi anti-HLA DSA positivi donatore specifici con i parametri bioptici

VARIABILI	OR	95% CI	p-value
SITO BIOPTICO	1.48	0.80, 2.73	0.2
FIBROSI	1.10	0.66, 1.83	0.7
MIOCITOLISI	1.00	0.45, 2.19	>0.9
NECROSI	1.04	0.51, 2.15	>0.9
NECROSI MIOCITARIA	1.05	0.50, 2.20	>0.9
DANNO ISCHEMICO	1.08	0.45, 2.64	0.9
EDEMA	1.39	0.68, 2.86	0.4
VASCULITE	1.93	1.03, 3.62	0.039
MICROVASCULOPATIA	0.26	0.07, 1.03	0.055
TROMBOSI DEI VASI	17.7	1.53, 205	0.021
GRADING C4d	3.05	1.61, 5.77	<0.001
GRADING CD68	5.32	1.74,16.3	0.003
EFFETTO QUILTY	0.56	0.22,1.45	0.2
INFILTRATO INFIAMMATORIO	1.64	0.90, 3.00	0.11
INFIAMMAZIONE MICROVASCOLARE	7.41	2.45,22.4	<0.001
ACR 1990	1.33	0.74, 2.37	0.3
ACR 2005	1.40	0.78, 2.50	0.3
pAMR	15.1	6.12, 37.5	<0.001

Nella Tabella XXII sono riportati i risultati istopatologici con riferimento agli anticorpi anti-HLA verso gli HLA di classe I DSA.

Il dato più statisticamente significativo è il pAMR ($p=0.003$); le altre variabili statisticamente significative sono l'edema ($p=0,028$), il grading di C4d ($p=00,72$) e l'effetto Quilty ($p=0,011$).

Tabella XXII - confronto anticorpi anti-HLA DSA di classe I donatore specifici con parametri bioptici

VARIABILI	OR	95% CI	p-value
SITO BIOPTICO	0.68	0.30, 1.53	0.3
FIBROSI	0.91	0.53, 1.55	0.7
MIOCITOLISI	1.39	0.62, 3.12	0.4
NECROSI	1.21	0.50, 2.89	0.7
NECROSI MIOCITARIA	1.25	0.51, 3.03	0.6
DANNO ISCHEMICO	1.38	0.71, 2.67	0.3
EDEMA	2.17	1.09, 4.34	0.028
VASCULITE	1.26	0.65, 2.44	0.5
MICROVASCULOPATIA	0.78	0.29, 2.14	0.6
TROMBOSI DEI VASI	4.22	0.35, 50.5	0.3
GRADING C4d	2.13	0.93, 4.85	0.072
GRADING CD68	1.74	0.55, 5.52	0.3
EFFETTO QUILTY	0.30	0.12, 0.75	0.011
INFILTRATO INFIAMMATORIO	0.65	0.40, 1.06	0.083
INFIAMMAZIONE MICROVASCOLARE	1.80	0.65, 4.97	0.3
ACR 1990	0.64	0.41, 1.02	0.058
ACR 2005	0.70	0.43, 1.16	0.2
pAMR	6.66	1.87, 23.7	0.003

Nella Tabella XXIII sono riportati i risultati istopatologici con riferimento agli anticorpi positivi verso gli HLA DSA di classe II.

Il dato più statisticamente significativo è il pAMR ($p < 0,001$); le altre variabili statisticamente significative sono la vasculite ($p = 0,043$), la microvasculopatia ($p = 0,030$), la trombosi dei vasi ($p = 0,040$), il grading del C4d ($p = 0,002$), il grading del CD68 ($p = 0,004$) e l'infiammazione microvascolare ($p = 0,002$).

Tabella XXIII - confronto anticorpi anti-HLA DSA di classe II con parametri bioptici

VARIABILI	OR	95% CI	p-value
SITO BIOPTICO	1.36	0.76, 2.44	0.3
FIBROSI	1.10	0.66, 1.83	0.7
MIOCITOLISI	0.97	0.46, 2.06	>0.9
NECROSI	1.06	0.53, 2.14	0.9
NECROSI MIOCITARIA	1.05	0.51, 2.16	0.9
DANNO ISCHEMICO	0.87	0.36, 2.08	0.7
EDEMA	1.46	0.75, 2.86	0.3
VASCULITE	1.84	1.02, 3.34	0.043
MICROVASCULOPATIA	0.31	0.11, 0.89	0.030
TROMBOSI DEI VASI	13.0	1.13, 150	0.040
GRADING C4d	2.79	1.47, 5.28	0.002
GRADING CD68	7.01	1.89, 26.0	0.004
EFFETTO QUILTY	0.70	0.30, 1.66	0.4
INFILTRATO INFIAMMATORIO	1.62	0.87, 3.02	0.13
INFIAMMAZIONE MICROVASCOLARE	16.1	2.76, 93.3	0.002
ACR 1990	1.24	0.68, 2.28	0.5
ACR 2005	1.29	0.70, 2.37	0.4
pAMR	19.8	5.91, 66.2	<0.001

HLA

Tutti gli anticorpi dosati sono riportati in Tabella XXIV suddividendoli anticorpi anti-HLA DSA e anticorpi anti-HLA non DSA.

Le rilevazioni degli anticorpi anti-HLA di classe II DSA sono i più presenti con 656/987 (66%) rilevazioni.

Le rilevazioni degli anticorpi anti-HLA positivi DSA sono 287/895 (32%) di classe I e 608/895 (68%) di classe II. Gli anticorpi anti-HLA positivi non DSA sono 44/92 (48%) di classe I e 48/92 (52%) di classe II

Il locus maggiormente riconosciuto di anticorpi anti-HLA di classe I è il B con 151/987 di cui 26/92 (59%) rilevazioni DSA e 125/895 (44%) non DSA.

Il locus maggiormente riconosciuto di anticorpi anti-HLA di classe II è il DR con 311/987 (47%) di cui 284/895 (47%) rilevazioni DSA e 27/92 (56%) non DSA.

Tabella XXIV – Totalità delle rilevazioni degli anticorpi anti-HLA

VARIABILI	TOTALE (N = 987) ¹	DSA		p-value ²
		NO (N = 92) ¹	SI (N= 895) ¹	
CLASSE HLA				0.002
I	331 (34%)	44 (48%)	287 (32%)	
II	656 (66%)	48 (52%)	608 (68%)	
HLA CLASSE I				0.005
A	139 (42%)	18 (41%)	121 (42%)	
B	151 (46%)	26 (59%)	125 (44%)	
C	41 (12%)	0 (0%)	41 (14%)	
HLA CLASSE II				0.4
DR	311 (47%)	27 (56%)	284 (47%)	
DQ	280 (43%)	18 (38%)	262 (43%)	
DP	65 (9.9%)	3 (6.2%)	62 (10%)	

Il dosaggio massimo di MFI per ogni paziente è riportato nella Tabella XXV.

Il valore massimo dei MFI in 20/62 (33%) casi corrisponde agli anticorpi anti-HLA di classe I, mentre in 41/62 (67%) corrisponde agli anticorpi anti-HLA di classe II.

Nella popolazione di pazienti con anticorpi anti-HLA non DSA con MFI più alto in 15/27(56%) casi è di classe I mentre in 12/27 (44%) è di classe II.

Nella popolazione di pazienti con anticorpi anti-HLA DSA con MFI più in 5/34(15%) casi è di classe I mentre in 29/34 (85%) è di classe II.

Tabella XXV –Rilevazioni di anticorpi anti HLA considerando solo l'MFI più alto per ogni paziente

VARIABILI	TOTALE (N = 62) ¹	DSA		p-value ²
		NO (N = 27) ¹	SI (N= 34) ¹	
CLASSE HLA				<0.001
I	20 (33%)	15 (56%)	5 (15%)	
II	41 (67%)	12 (44%)	29 (85%)	
HLA CLASSE I				>0.9
A	11 (55%)	8 (53%)	3 (60%)	
B	9 (45%)	7 (47%)	2 (40%)	
C	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
HLA CLASSE II				0.3
DR	16 (39%)	5 (42%)	11 (38%)	
DQ	22 (54%)	5 (42%)	17 (59%)	
DP	3 (7.3%)	2 (17%)	1 (3.4%)	

MFI

La Tabella XXVI descrive in modo completo i valori di MFI dividendoli nella popolazione con anticorpi anti-HLA non DSA e anticorpi anti-HLA DSA.

Gli MFI sono stati anche divisi in classe nel seguente modo:

- <3000
- 3001-5000
- 5001-9999
- >10000

Le analisi degli anticorpi anti-HLA con MFI minore di 3000 sono la maggior parte 373/987 (43%).

Le rilevazioni degli anticorpi anti-HLA non DSA l'MFI fino a 3000 sono 45/92 (56%), da 3000 a 5000 sono 15/92 (19%), da 5001 a 9999 sono 17/91 (21%) e quelli superiori o uguali a 10000 sono 4/92 (4,9%).

Per quanto riguarda la popolazione con gli anticorpi anti-HLA DSA le rilevazioni del MFI fino a 3000 sono 328/895 (42%), da 3000 a 5000 sono 130/895 (17%), da 5001 a 9999 sono 121/895 (15%) e quelli superiori o uguali a 10000 sono 203/895 (26%).

Tabella XXVI - MFI considerando la totalità delle rilevazioni

VARIABILI	TOTALE (N = 987) ¹	DSA		p-value ²
		NO (N = 92) ¹	SI (N= 895) ¹	
MFI	3,854 (1,566, 9,055)	2,177 (1,388, 5,150)	3,944 (1,579, 10,504)	<0.001
MFI STRATIFICATO				<0.001
<3000	373 (43%)	45 (56%)	328 (42%)	
3000-5000	145 (17%)	15 (19%)	130 (17%)	
5001-9999	138 (16%)	17 (21%)	121 (15%)	
>=10000	207 (24%)	4 (4.9%)	203 (26%)	

Il valore La Tabella XXVII descrive in modo completo i dati raccolti per il valore MFI maggiore per ogni paziente.

Statisticamente interessante è il valore massimo di MFI negli anticorpi anti-HLA DSA che ha un valore molto maggiore (6974 - 2106,18394) rispetto all'MFI degli anticorpi anti-HLA non DSA (3669 - 1583, 6140)

I pazienti con anticorpi anti-HLA con MFI massimo <3000 sono 10/27 (37%) dei pazienti con anticorpi anti-HLA non DSA e 10/27 (37%) dei pazienti e in 10/34 (29%) dei pazienti DSA.

I pazienti con anticorpi anti-HLA con MFI massimo 10000 sono 3/27 (11%) dei pazienti con anticorpi anti-HLA non DSA e 1/27 (37%) dei pazienti e in 16/34 (47%) dei pazienti DSA.

Tabella XXVII – MFI considerando solo il valore MFI più elevato per ogni paziente

VARIABILI	TOTALE (N =61) ¹	DSA		p-value ²
		NO (N = 27) ¹	SI (N= 34) ¹	
MFI	5,000 (1,766, 12,000)	3,669 (1,583, 6,140)	6,974 (2,286, 18,158)	0.019
MFI STRATIFICATO				0.012
<3000	20 (33%)	10 (37%)	10 (29%)	
3000-5000	11 (18%)	8 (30%)	3 (8.8%)	
5001-9999	11 (18%)	6 (22%)	5 (15%)	
>=10000	19 (31%)	3 (11%)	16 (47%)	

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo valutato un'ampia popolazione di pazienti cardiotrapiantati del nostro centro che sono stati sottoposti a follow up anticorpale e per la prima volta abbiamo studiato l'impatto degli anticorpi anti-HLA donatore specifici (DSA) nelle biopsie endomiocardiche di monitoraggio in relazione al danno miocardico.

I nostri risultati mostrano come la presenza dell'anticorpo donatore specifici correli strettamente con il pAMR, con il danno vascolare (endotelialite, infiltrato flogistico monocitico intravascolare), con la presenza di infiltrato linfocitario, con la trombosi dei vasi e, infine, abbia una tendenza all'associazione con la microvasculopatia, e con la presenza di infiltrato flogistico nella parete delle piccole arteriole intramiocardiche.⁴⁹ Il nostro gruppo, già nel 2015 con uno studio multicentrico patrocinato dall' AECVP (*Association for European Cardiovascular Pathology*), ha dimostrato che il corteo infiammatorio del rigetto umorale non è solo costituito da macrofagi ma anche da linfociti presenti anche in sede intravascolare denominando "inflammatory burden" dato che la distribuzione dell'infiltrato non era contemplata nella classificazione del rigetto. Il nostro studio, ha correlato per la prima volta la presenza dell'anticorpo anti-HLA **DSA** circolante con il danno miocardico, ed ha evidenziato che il danno anticorpale si correla molto bene con l'infiltrato flogistico presente nei capillari e nelle arteriole privilegiando un danno vascolare in senso più ampio, non solo capillarite ma anche vasculite. Lavori molto recenti evidenziano la presenza di infiammazione microvascolare e la distribuzione del danno miocardico come entità patologica diagnostica e prognostica.⁴⁸

Dai nostri dati emerge anche che gli anticorpi anti-HLA donatore specifici di classe I (DSA classe I) provocano un danno miocardico blando rispetto agli anticorpi anti-HLA donatore specifici di classe II (DSA classe II). Gli anticorpi anti-HLA DSA di classe I correlano con il pAMR, con l'edema e con l'effetto Quilty, mentre gli anticorpi anti-HLA DSA di classe II provocano un danno vascolare più severo. Sebbene Wallace WD, et al⁵⁰ che ha valutato la relazione tra gli anticorpi anti-HLA DSA differenziandoli tra classe I e II e il

danno tissutale prodotto nel rene trapiantato non ha trovato differenze tra le due classi di anticorpi, è stato dimostrato da studi in vitro che gli anticorpi anti-HLA DSA di classe II inducono danno diretto sulle cellule endoteliali.⁵¹ Il nuovo approccio molecolare nella diagnostica del rigetto umorale nel trapianto di cuore si sta facendo strada in maniera dirompente negli ultimi 10 anni. Loupy A e il *team* francese leader nel campo ha dimostrato che dal punto di vista molecolare il danno d'organo espressione come infiammazione microvascolare è "attivo" molecularmente e che un "inflammatory burden" con maggior danno endoteliale e/o vascolare ha una prognosi peggiore.⁵² Questo risultato molecolare apre dunque una importante discussione sulla classificazione del rigetto umorale pAMR dell'ISHLT 2013 ed è in linea con quello che il nostro studio ha evidenziato. La fissazione del complemento evidenziata con il deposito di C4d negli endoteli capillari è un importante marker di rigetto umorale nella biopsia. La classificazione ISHLT 2013 sottolinea che la positività deve essere superiore al 50% dei capillari presenti nella biopsia. Il nostro studio dimostra che anche a positività inferiore l'anticorpo circolante è presente e produce danno d'organo ed è molto più significativo per gli anticorpi anti-HLA DSA di classe II rispetto a quelli di classe I ($p=0,002$ vs $p=0,072$ rispettivamente).

Similmente alla nuova classificazione del rigetto umorale per il trapianto di rene che identifica il C4d come positivo già a focale coinvolgimento dei capillari maggiore al 10%⁵³, anche per il cuore può essere proposta questa classificazione con una positività per il C4d nei capillari minore del 50% e maggiore del 10%.

CONCLUSIONI

Questo studio ha voluto studiare gli anticorpi anti-HLA post-trapianto cardiaco monitorati durante il follow up e correlati con la biopsia di monitoraggio eseguita contemporaneamente al prelievo in pazienti asintomatici. Il danno d'organo principale è il danno vascolare non solo in termini di endotelialite o capillarite ma anche di coinvolgimento infiammatorio dei piccoli vasi intramiocardici. Inoltre i nostri dati confermano che gli anticorpi anti-HLA di classe II sono più aggressivi rispetto a quelli di classe I in termini di danno d'organo e di capacità di fissare il complemento e per quest'ultimo anche con <50% di coinvolgimento dei capillari si associa alla presenza di anticorpi.

LIMITI DELLO STUDIO

Questo studio è stato condotto in maniera retrospettiva, le condizioni dei pazienti non sono sempre omogenee in termini di monitoraggio anticorpale e di raccolta dei dati clinici. Il follow up della casistica raccolta è breve e disomogeneo.

BIBLIOGRAFIA

1. Sabino Iliceto & Renato Razzolin. *Manuale di Cardiologia*.
2. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure | Enhanced Reader.
3. Roger, V. L. Epidemiology of Heart Failure A Contemporary Perspective. *Circ Res* **128**, 1421–1434 (2021).
4. Longo *et al.* *Harrison. Principi di medicina interna. 18 edizione.* (2012).
5. McDonagh, T. A. *et al.* 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* **42**, 3599–3726 (2021).
6. Centro Nazionale Trapianti. *VALUTAZIONE DI QUALITÀ DELL'ATTIVITÀ DEL TRAPIANTO DI CUORE 2000-2018.*
7. *RETENAZIONALE TRAPIANTI.*
8. Kransdorf, E. P. *et al.* Calculated panel-reactive antibody predicts outcomes on the heart transplant waiting list. *Journal of Heart and Lung Transplantation* **36**, 787–796 (2017).
9. DeVore, A. D. *et al.* Mechanical Circulatory Support and Heart Transplantation in Severe Heart Failure. in *Fuster and Hurst's The Heart, 15e* (eds. Fuster, V. *et al.*) (McGraw-Hill Education, 2022).
10. DALLA VOLTA S, DALIENTO L & RAZZOLINI R. *Manuale delle malattie del cuore e dei vasi.* (2005).
11. Mehra, M. R. *Harrison's Principles of Internal Medicine Chaptel 260.*
12. UOC Cardiochirurgia. Il Trapianto Cardiaco - Opuscolo informativo.
13. Leffell, M. S. *et al.* Red Blood Cell Transfusions and the Risk of Allosensitization in Patients Awaiting Primary Kidney Transplantation. *Transplantation* **97**, 525–533 (2014).
14. Khush, K. K. *et al.* The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fifth Adult Heart Transplantation Report—2018; Focus Theme: Multiorgan Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **37**, 1155–1168 (2018).
15. Nunoda, S. Impact of pretransplant antibodies on outcomes after heart transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* vol. 24 220–226 Preprint at <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000629> (2019).
16. Barten, M. J. *et al.* The clinical impact of donor-specific antibodies in heart transplantation. *Transplantation Reviews* vol. 32 207–217 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.trre.2018.05.002> (2018).
17. Long, B. & Koyfman, A. The Transplant Patient. in *Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide, 9e* (eds. Tintinalli, J. E. *et al.*) (McGraw-Hill Education, 2020).
18. Mechanical Circulatory Support and Heart Transplantation in Severe Heart Failure | Fuster and Hurst's The Heart, 15e | AccessMedicine | McGraw Hill Medical.

<https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?sectionid=265682779&bookid=3134#266562437>.

19. Stewart, S. *et al.* Revision of the 1990 Working Formulation for the Standardization of Nomenclature in the Diagnosis of Heart Rejection. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **24**, 1710–1720 (2005).
20. Stewart, S. *et al.* Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. in *Journal of Heart and Lung Transplantation* vol. 24 1710–1720 (2005).
21. Agrawal, Y. P. & Saidman, S. L. *Histocompatibility Testing and Transplantation (CHAPTER 4)*. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>.
22. Stegall, M. D., Dean, P. G. & Gloor, J. Mechanisms of Alloantibody Production in Sensitized Renal Allograft Recipients. *American Journal of Transplantation* **9**, 998–1005 (2009).
23. *Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei trapianti Linee-Guida AIBT per la Valutazione dell'Istocompatibilità nel Trapianto d'Organo*.
24. Devore, A. D. *et al.* *Mechanical Circulatory Support and Heart Transplantation in Severe Heart Failure (Chapter 52)*.
25. Shahzad, K. *et al.* New-onset graft dysfunction after heart transplantation—incidence and mechanism-related outcomes. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **30**, 194–203 (2011).
26. Cross, A. R., Glotz, D. & Mooney, N. The role of the endothelium during Antibody-mediated rejection: From victim to accomplice. *Frontiers in Immunology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00106> (2018).
27. Chen, G., Sequeira, F. & Tyan, D. B. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol* **72**, 849–858 (2011).
28. Chin, C. *et al.* Clinical usefulness of a novel C1q assay to detect immunoglobulin G antibodies capable of fixing complement in sensitized pediatric heart transplant patients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **30**, 158–163 (2011).
29. Schaub, S., Hönger, G., Koller, M. T., Liwski, R. & Amico, P. Determinants of C1q Binding in the Single Antigen Bead Assay. *Transplantation* **98**, 387–393 (2014).
30. Clerkin, K. J. *et al.* Donor-specific anti-HLA antibodies with antibody-mediated rejection and long-term outcomes following heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **36**, 540–545 (2017).
31. Tran, A. *et al.* Donor-specific HLA alloantibodies: Impact on cardiac allograft vasculopathy, rejection, and survival after pediatric heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **35**, 87–91 (2016).
32. Clerkin, K. J. *et al.* Donor-specific anti-HLA antibodies with antibody-mediated rejection and long-term outcomes following heart

- transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **36**, 540–545 (2017).
33. Ho, E. K. *et al.* Pre- and posttransplantation allosensitization in heart allograft recipients: Major impact of de novo alloantibody production on allograft survival. *Hum Immunol* **72**, 5–10 (2011).
 34. Berry, G. J. *et al.* The 2013 international society for heart and lung transplantation working formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation* **32**, 1147–1162 (2013).
 35. Billingham, M. E. *et al.* A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. *J Heart Transplant* **9**, 587–93 (1990).
 36. Colvin, M. M. *et al.* Antibody-mediated rejection in cardiac transplantation: Emerging knowledge in diagnosis and management: A scientific statement from the American Heart Association: Endorsed by the international society for heart and lung transplantation. *Circulation* vol. 131 1608–1639 Preprint at <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000093> (2015).
 37. Michaels, P. J. *et al.* Humoral rejection in cardiac transplantation: risk factors, hemodynamic consequences and relationship to transplant coronary artery disease. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **22**, 58–69 (2003).
 38. Berry, G. J. *et al.* The 2013 international society for heart and lung transplantation working formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation* vol. 32 1147–1162 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.healun.2013.08.011> (2013).
 39. Berry, G. J. *et al.* The ISHLT working formulation for pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation: Evolution and current status (2005–2011). *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **30**, 601–611 (2011).
 40. Kobashigawa, J. *et al.* Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **30**, 252–269 (2011).
 41. Hidalgo, L. G. *et al.* NK Cell Transcripts and NK Cells in Kidney Biopsies from Patients with Donor-Specific Antibodies: Evidence for NK Cell Involvement in Antibody-Mediated Rejection. *American Journal of Transplantation* **10**, 1812–1822 (2010).
 42. Pabois, A. *et al.* Notch signaling mediates crosstalk between endothelial cells and macrophages via Dll4 and IL6 in cardiac microvascular inflammation. *Biochem Pharmacol* **104**, 95–107 (2016).
 43. Lion, J. *et al.* HLA Class II Antibody Activation of Endothelial Cells Promotes Th17 and Disrupts Regulatory T Lymphocyte Expansion. *American Journal of Transplantation* **16**, 1408–1420 (2016).

44. Yamakuchi, M. *et al.* Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 1301–1306 (2007).
45. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation* **122**, 787–795 (2012).
46. Tible, M. *et al.* Pathologic classification of antibody-mediated rejection correlates with donor-specific antibodies and endothelial cell activation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **32**, 769–776 (2013).
47. Peng, D. M. *et al.* Donor-specific antibodies: Can they predict C4d deposition in pediatric heart recipients? *Pediatr Transplant* **17**, 429–435 (2013).
48. Coutance, G. *et al.* Correlation Between Microvascular Inflammation in Endomyocardial Biopsies and Rejection Transcripts, Donor-specific Antibodies, and Graft Dysfunction in Antibody-mediated Rejection. *Transplantation* **106**, 1455–1464 (2022).
49. Fedrigo, M. *et al.* Inflammatory Cell Burden and Phenotype in Endomyocardial Biopsies With Antibody-Mediated Rejection (AMR): A Multicenter Pilot Study From the AECVP. *American Journal of Transplantation* **15**, 526–534 (2015).
50. Wallace, W. D. *et al.* Banff study of pathologic changes in lung allograft biopsy specimens with donor-specific antibodies. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **35**, 40–48 (2016).
51. Aljabri, A. *et al.* HLA class II antibodies induce necrotic cell death in human endothelial cells via a lysosomal membrane permeabilization-mediated pathway. *Cell Death Dis* **10**, 235 (2019).
52. Loupy, A. *et al.* Gene Expression Profiling for the Identification and Classification of Antibody-Mediated Heart Rejection. *Circulation* **135**, 917–935 (2017).
53. Loupy, A. *et al.* The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *American Journal of Transplantation* **17**, 28–41 (2017).