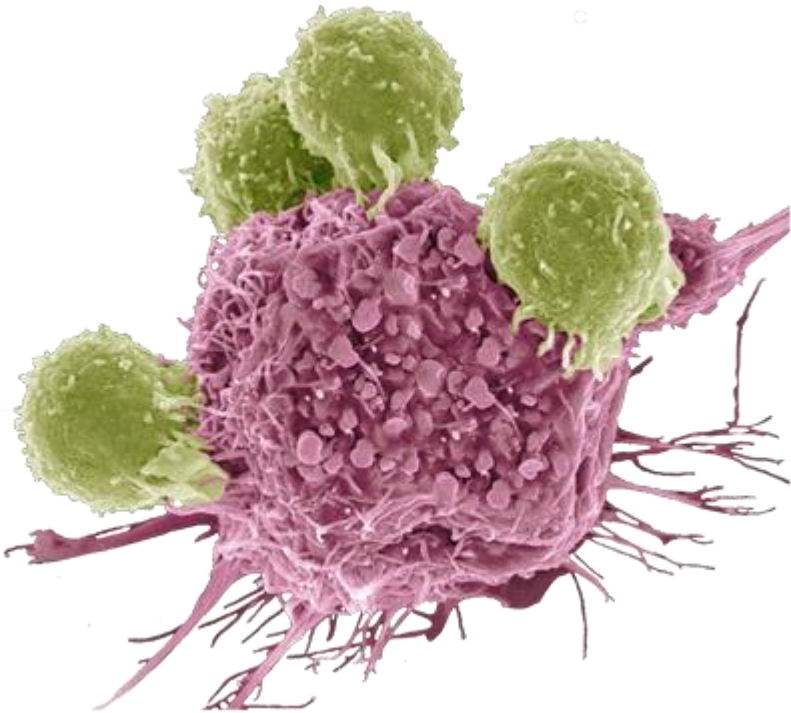


Imunologie de transplant și aplicații clinice

Curs 7



Objective

- Definirea termenilor: autolog, singenic, alogenic, xenogenic
- Clasificarea diferitelor tipuri de reacții de rejet și definirea rejetului hiperacut, acut și cronic
- Înțelegerea diferitelor componente ale antigenelor de histocompatibilitate HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP și relația acestora cu MHC-I și MHC-II
- Înțelegerea noțiunii de "antigen mismatch" în transplantul de țesuturi și de "allele matching" în transplantul de celule stem hematopoietice
- Explicarea bazelor imunologice ale bolii grefă-contra-gazdă (GVHD) și aplicarea acesteia în reacțiile grefă-contra-leucemie (GVL)
- Clasificarea diferitelor clase de agenți imunosupresori utilizați în transplant și explicarea mecanismului de acțiune
- Sumarizarea metodelor de tipizare tisulară și crossmatching efectuate pentru determinarea compatibilității între donor și recipient

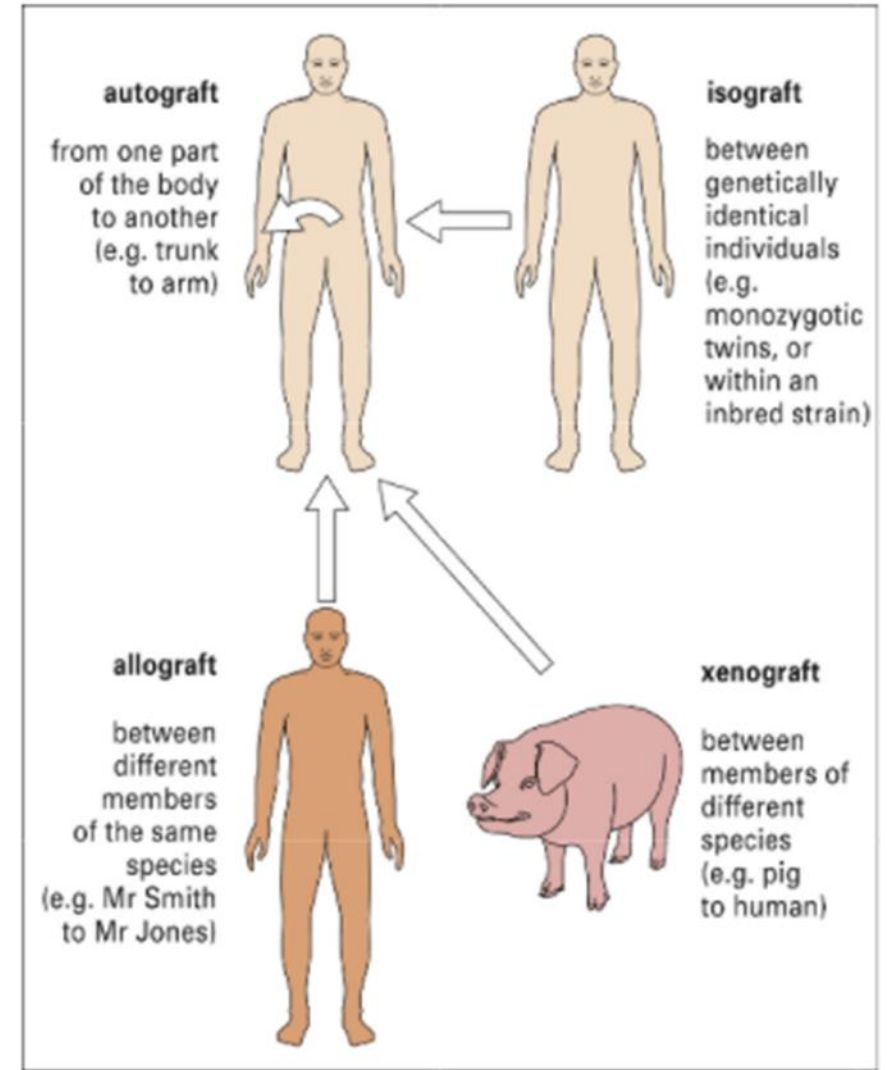
Cuprins

1. Imunitatea de transplant
2. Antigenele de histocompatibilitate
3. Transplantul de organe solide
4. Tipuri de rejet al grefei: hiperacut, acut și cronic
5. Transplantul de celule stem hematopoietice
6. Boala grefă contra gazdă (GvHD)
7. Boala grefă contra leucemie (GvL)
8. Imunosupresia

1. Imunitatea de transplant

Definiție: Transplantul reprezintă actul de transfer al unor celule, țesuturi sau organe dintr-un loc în altul.

- Disfuncționalitatea unui organ poate să fie corectată prin transplantul unui organ (inimă, plămân, rinichi, etc.) de la un donator;
- Cel mai mare obstacol pentru transplant rămâne sistemul imun. Sistemul imun a evoluat multiple mecanisme și căi de combatere a agenților non-self;
- Aceste mecanisme sunt implicate în respingerea/rejetul organelor transplantate, ele fiind recunoscute ca non-self de către sistemul imun al recipientului (cel care primește organul/celulele transplantate).



1. Imunitatea de transplant

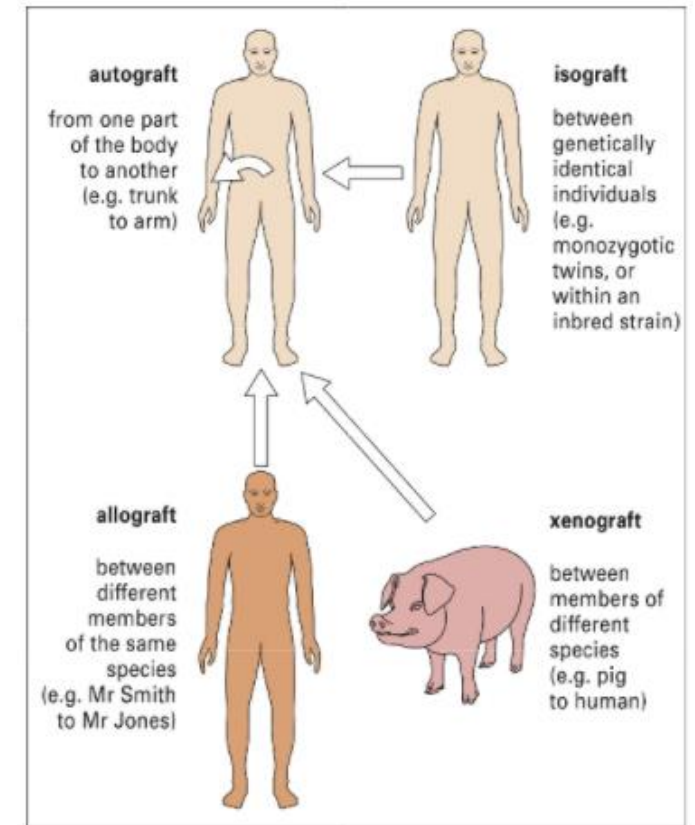
Tipuri de transplant:

Autotransplant – de la/la același individ

Izotransplant (singenic) – între doi indivizi identici genetic (gemeni)

Alotransplant – între doi indivizi diferiți genetic, dar din aceeași specie

Xenotransplant – între indivizi din două specii diferite



- Transplantul este singura formă de tratament pentru cele mai multe dintre bolile aflate în fază terminală
- Transplantul este o procedură clinică importantă
- Transplantul s-a dovedit a fi un instrument de studiu/înțelegere a mecanismelor imune – MHC a fost pentru prima dată descris în contextul transplantării
- Transplantul a fost utilizat pentru înlocuirea organelor cu insuficiență – primul transplant reușit a fost în 1906 (cornee)

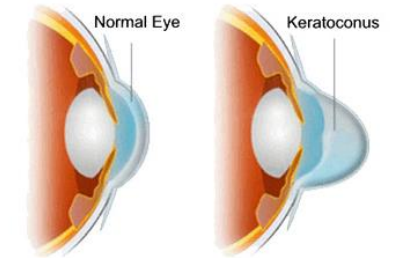
1. Imunitatea de transplant

- Varietatea de răspunsuri imune în funcție de interacțiunile dintre sistemul imun al recipientului și antigenele donatorului:

Tipul de Grefă	Originea Grefei	Numele Grefei	Tipul de Antigen	Tipul de răspuns imun stimulat
Autologă	Același individ	Autogrefă	Autoantigen	În mod normal niciunul; stimulat anormal în boli autoimune
Singeneică	Individ identic genetic, de exemplu frațele geamăn	Izogrefă	Izo-antigen	Izo-imunizare
Alogenică	Individ identic genetic din aceeași specie	Alogrefă	Alo-antigen	Alo-imunizare
Xenogeneică	Individ identic genetic din specie diferită	Xenogrefă	Xeno-antigen	Xeno-imunizare

1. Imunitatea de transplant

Organul transplantat	Exemple de boală
Corneea	Keratoconus, distrofii, keratite
Rinichi	Insuficiență renală terminală
Inimă	Insuficiență cardiacă
Plămâni/Inimă-plămâni	Hipertensiune pulmonară, fibroză chistică
Ficat	Cancer, ciroză, atrezie biliară
Celule stem (MOH/sânge periferic)	Leucemie, imunodeficiențe
Piele (autograft)	Arsuri
Pancreas	Diabet zaharat
Insule pancreatice	Diabet zaharat
Intestin subțire	Cancer, insuficiență intestinală
Celule neuronale	Boală Parkinson
Celule stem hematopoietice	Multe afecțiuni



2. Antigenele de histocompatibilitate

- antigenele responsabile de rejezul țesuturilor de proveniență genetică diferită = **antigene de histocompatibilitate**
- antigenele de histocompatibilitate sunt codate în mai mult de 40 de situsuri genetice, cele responsabile de cea mai puternică reacție de rejezul alogrefei sunt localizate pe complexul major de histocompatibilitate (MHC)
- la om, MHC se numește sistemul antigen leucocitar uman (HLA); alte gene cauzează o reacție imună mai slabă
- genele de MHC sunt exprimate codominant, ceea ce înseamnă că fiecare individ prezintă pe suprafața celulelor ambele produse ale alelelor
- sunt moștenite ca haplotipuri adică două jumătăți de seturi (câte unul de la fiecare părinte)
- moleculele MHC sunt divizate în două clase: clasa I este exprimată pe toate celulele nucleate, iar clasa II doar pe celulele profesionale prezentatoare de antigen (celule dendritice, macrofage activate și limfocite B)

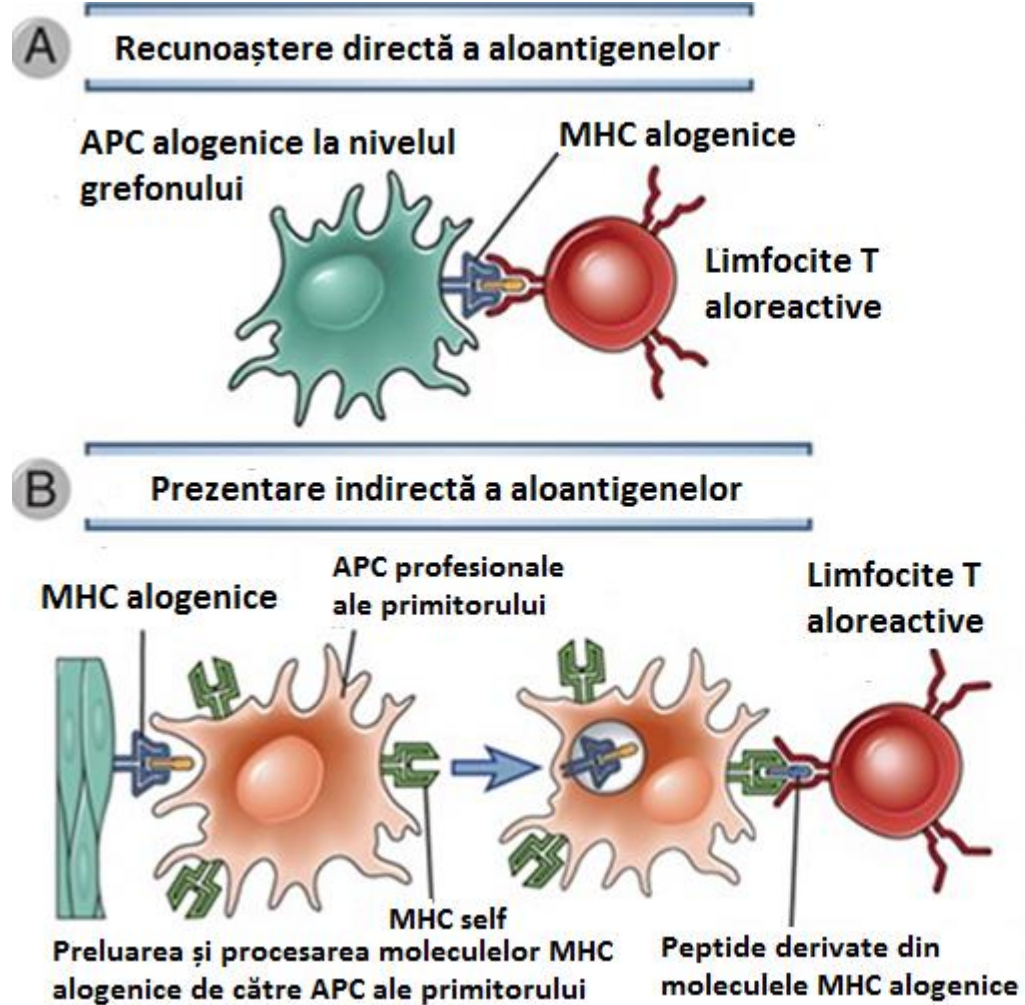
Recapitulare:

Funcția fiziologică a moleculelor MHC este aceea de prezentare a antigenelor limfocitelor T (limfocitele T recunosc antigenele doar dacă sunt prezentate într-un complex alături de molecule MHC); tipul I de MHC este responsabil de prezentarea de antigene intracelulare (antigene virale, tumorale sau antigene self) limfocitele CD8+; clasa II de MHC prezintă antigene extracelulare (antigene bacteriene) limfocitele CD4+.

2. Antigenele de histocompatibilitate

2.1. Recunoașterea aloantigenelor

- **Recunoașterea directă** – limfocitele T recunosc moleculele MHC alogenice neprocesate → **limfocite T aloreactive**
- **Recunoașterea indirectă** – celulele prezentatoare de antigen (APC) ale gazdei procesează moleculele MHC alogenice și le prezintă limfocitelor T → activarea limfocitelor T ale gazdei

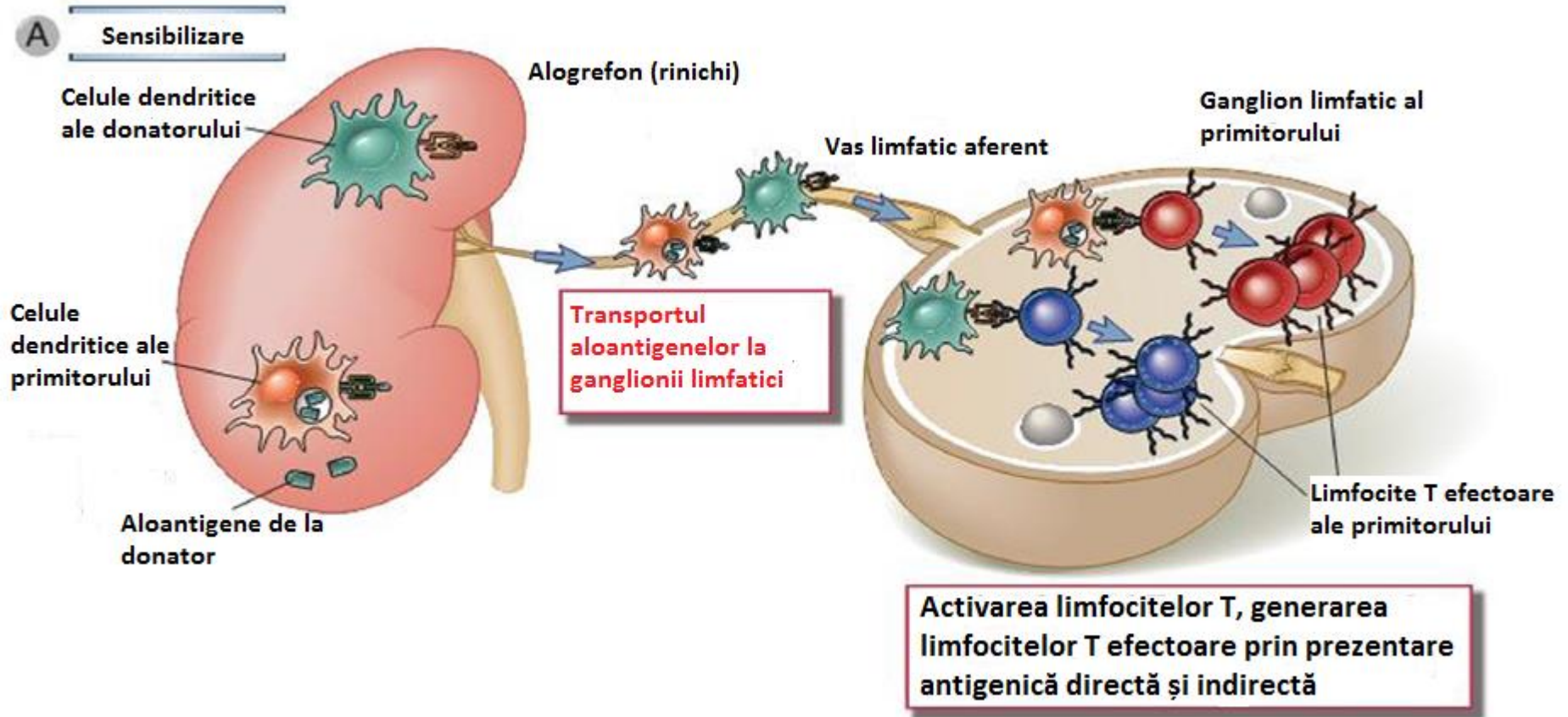


Limfocitele T recunosc moleculele MHC alogenice de pe suprafața APC ale grefonului

Prezentarea peptidelor procesate ale moleculelor MHC alogenice legate de molecule MHC self

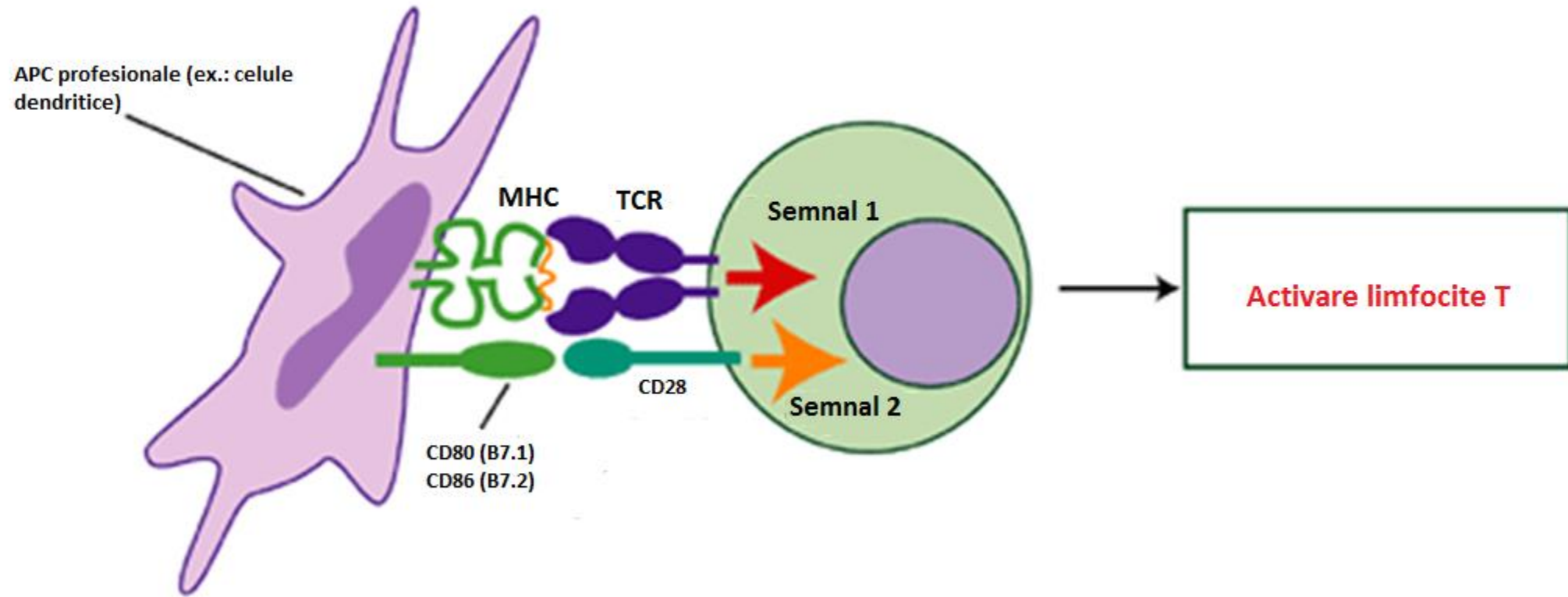
2. Antigenele de histocompatibilitate

2.2. Activarea limfocitelor T aloreactive



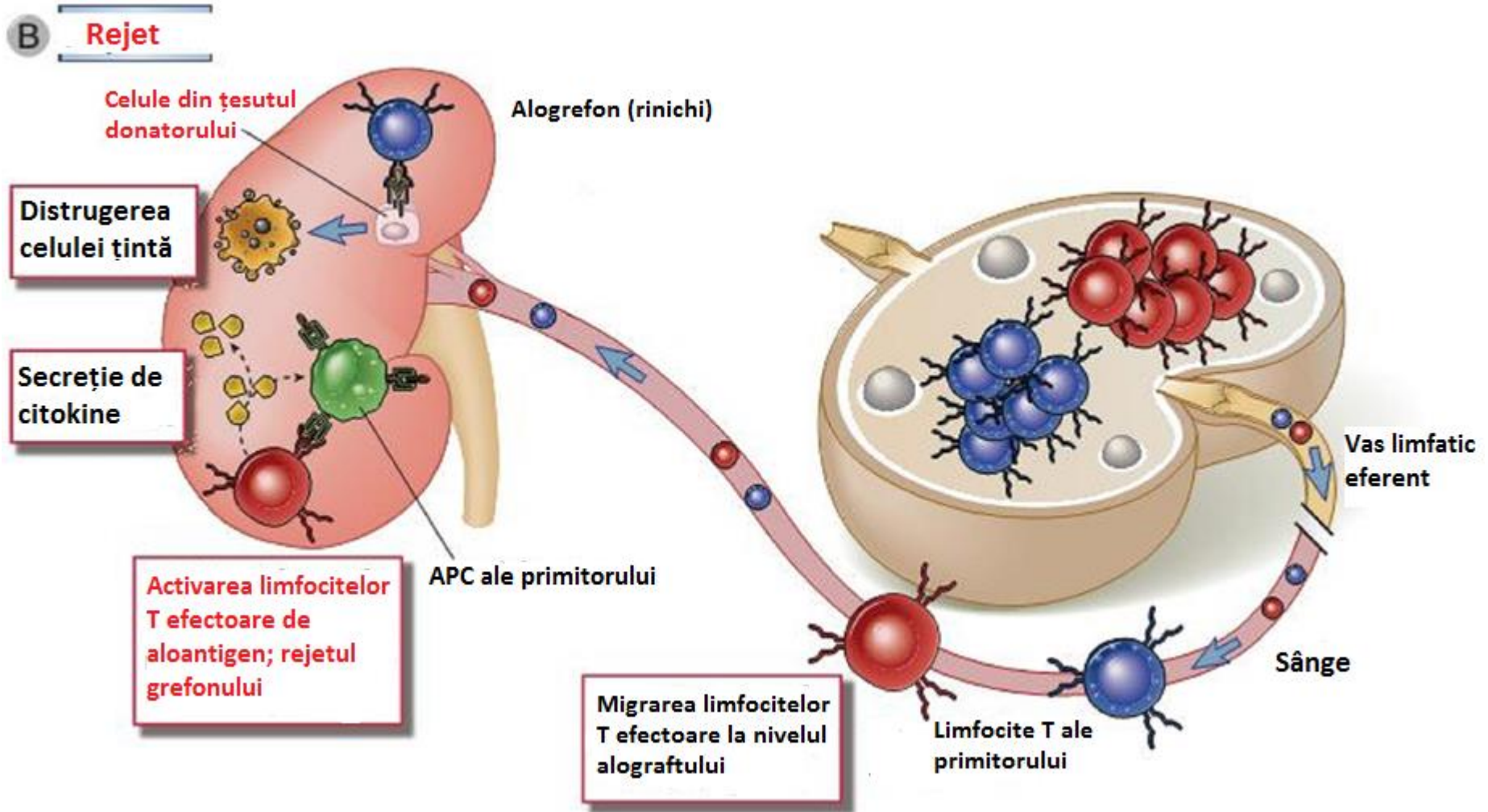
2. Antigenele de histocompatibilitate

2.2. Activarea limfocitelor T aloreactive



2. Antigenele de histocompatibilitate

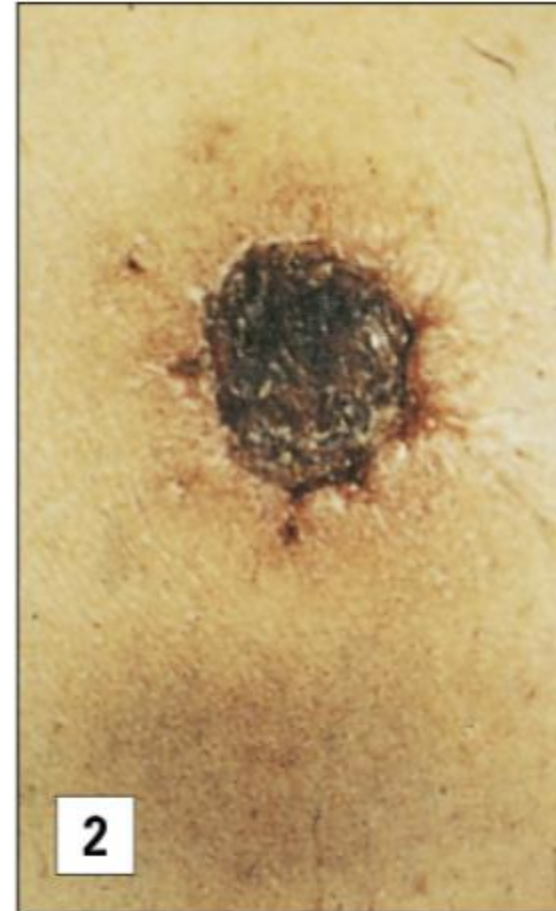
2.3. Distrugerea alograftului



2. Antigenele de histocompatibilitate

2.3. Distrugerea alograftului

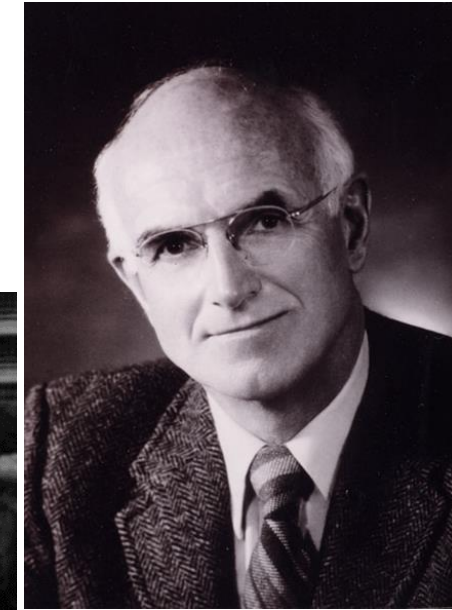
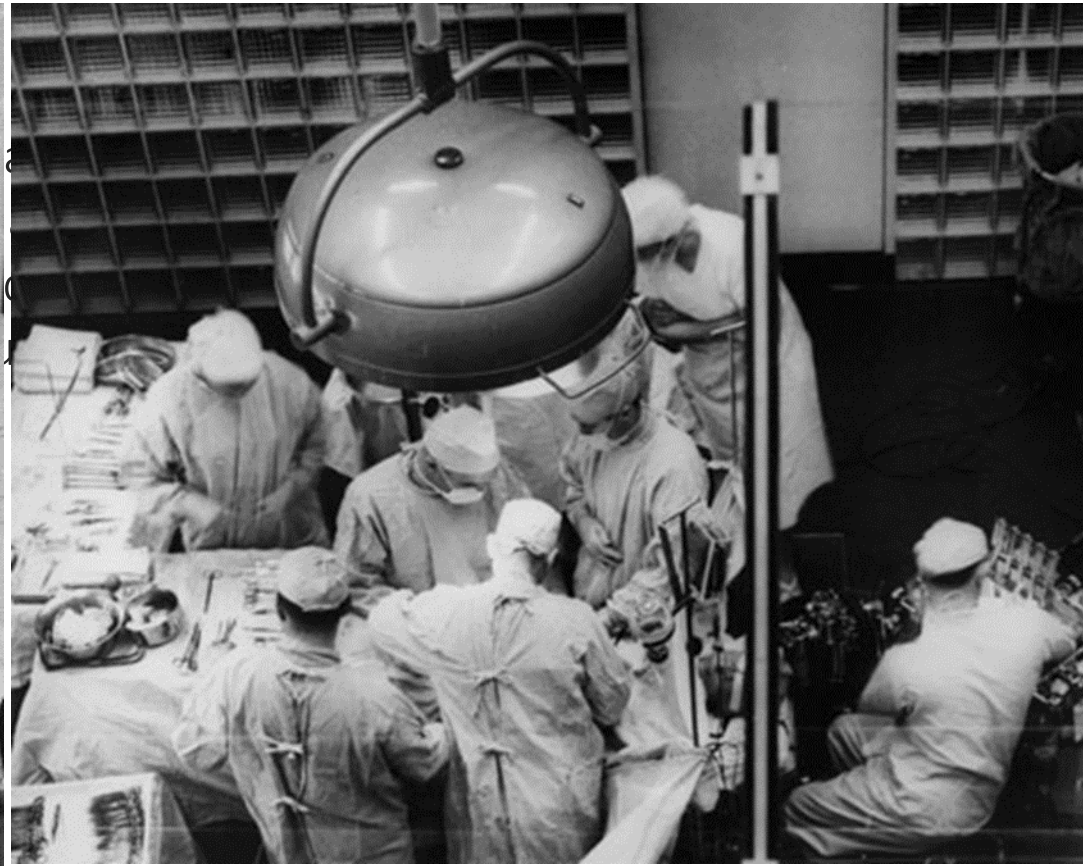
1. Alograft de piele în ziua 5, complet vascularizat
2. Același alograft în ziua 12 este complet distrus – **rejet acut**
3. Al doilea alograft nu se vascularizează și este distrus rapid – **rejet hiperacut**



3. Transplantul de organe solide

Scurt istoric:

- 1881 – primele grefe de piele



4. Tipuri de rejet al grefei – Mecanisme efectoare

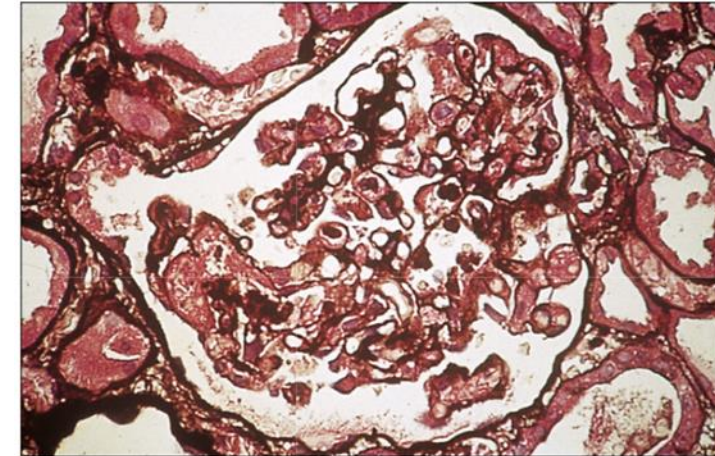
4.1. **Rejet hiperacut** – apare la câteva minute/ore de la transplant și este mediat în principal de anticorpi

4.2. **Rejet acut** – apare la câteva zile/săptămâni și este inițiat de limfocite T aloreactive

4.3. **Rejetul cronic** – apare la luni/ani de la transplant

4.1. Rejetul hiperacut

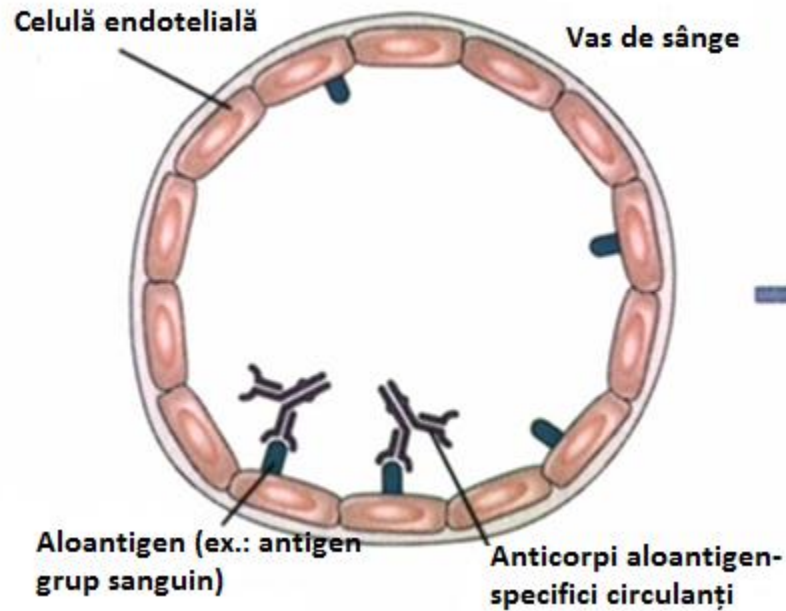
- Recipientul are **anticorpi pre-formați**, care sunt reactivi cu țesutul donatorului
 - A fost sensibilizat la moleculele MHC ale donatorului prin transplante anterioare, transfuzii repetate de sânge, graviditate
 - Poate avea în mod natural anticorpi pre-formați (ca rezultat al incompatibilității de grup sanguin ABO)
- Anticorpii pre-formați se leagă de celulele endoteliale vasculare → răspuns imun efector
- Activarea complementului → moartea celulelor endoteliale sau la activarea acestora → răspuns inflamator, ↑ permeabilității vasculare, coagulare → distrugerea grefonului
- **Prevenirea rejetului hiperacut:**
 - Indivizi compatibili ABO
 - Reacție de cross-match între donator și receptor



Rejet hiperacut. Necroza extensivă a capilarelor glomerulare asociată cu hemoragie interstițială masivă, la 24-48h de la transplant (HE, x200)

4. Tipuri de rejet al grefei – Mecanisme efectoare

4.1. Rejetul hiperacut



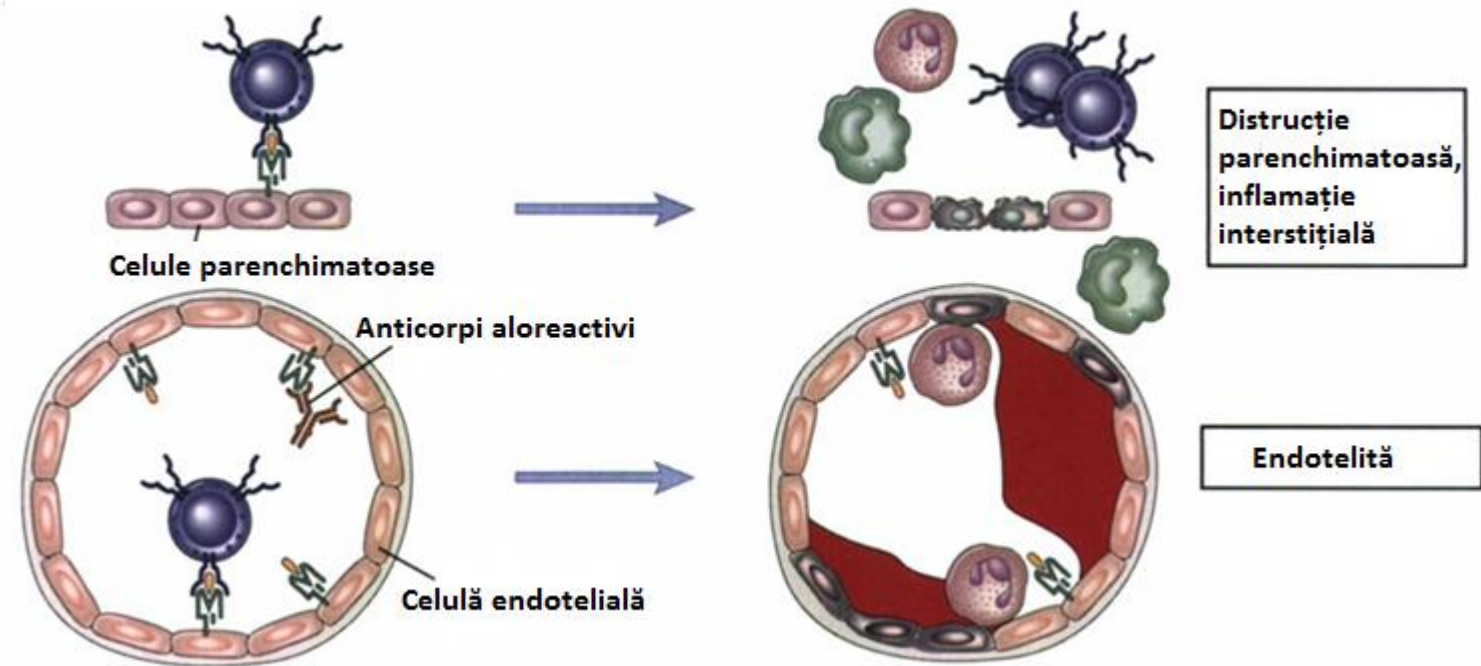
**Activarea
complementului,
distrucție endotelială,
inflamație și tromboză**

4. Tipuri de rejet al grefei – Mecanisme efectoare

4.2. Rejetul acut

- Este determinat de **activarea limfocitelor T alospecifice**, capabile de distrugerea grefonului

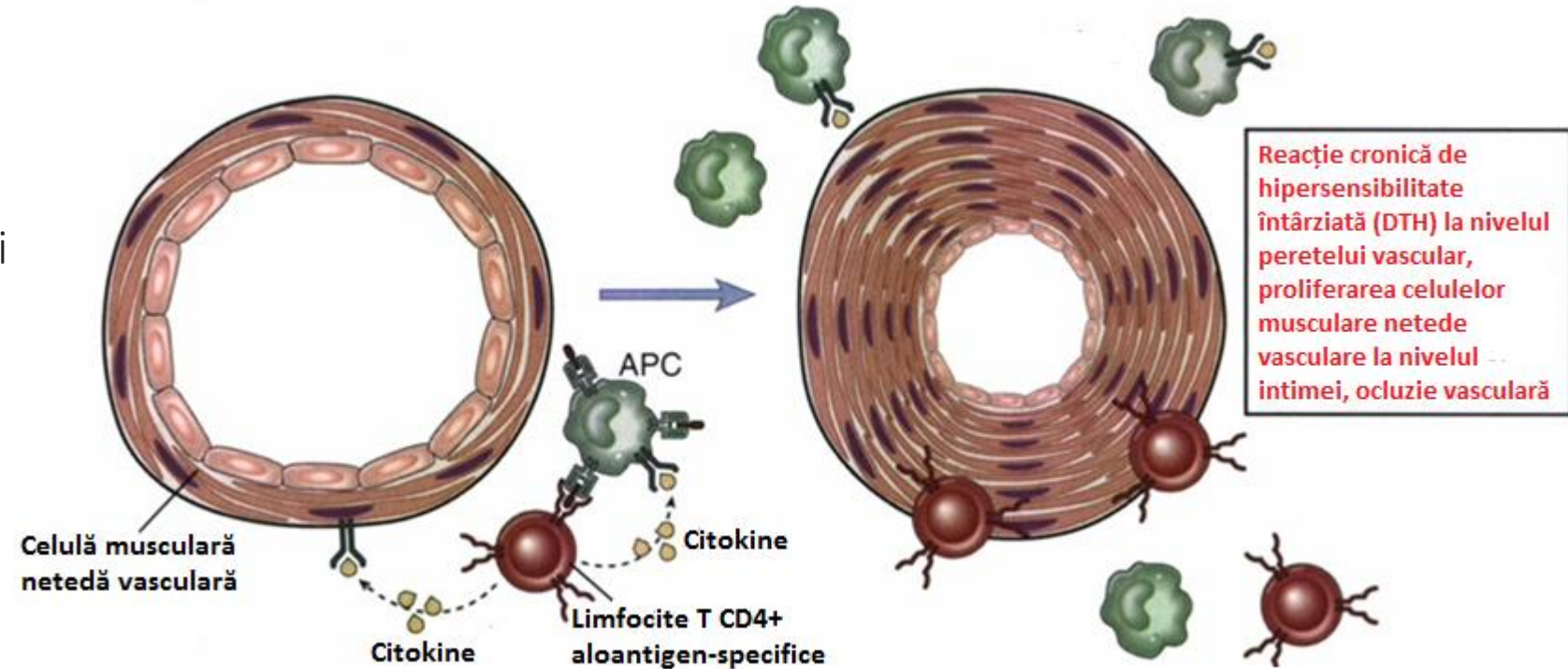
- Rejetul acut este procesul de distrugere a parenchimului organului transplantat și a vaselor de sânge, mediat de limfocitele T aloreactive și de anticorpi
- **Limfocitele T citotoxice (CD8+) aloreactive** cu celulele endoteliale și parenchimotoase mediază injuria tisulară
- Pot participa și anticorpi aloreactivi formați ulterior transplantului → injuria vasculară



4. Tipuri de rejet al grefei – Mecanisme efectoare

4.3. Rejetul cronic

- Există terapii avansate pentru tratarea rejetului acut → principala problemă a alografturilor este rejetul cronic
- În rejetul cronic, lezarea mușchiului neted vascular duce la proliferarea celulară și ocluzie luminală;
- Se datorează **reacțiilor cronice de hipersensibilitate de tip întârziat (DTH) la aloantigene** de la nivelul peretelui vascular



5. Transplantul de celule stem hematopoietice

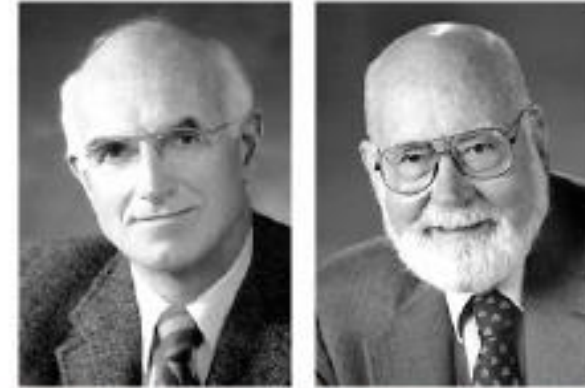
Scurt istoric:

- Transplantul de celule stem hematopoietice (HSC) la șoarece (1950)
- Transplantul de celule stem hematopoietice la câine
- 1930 – Karl Landsteiner – premiul Nobel pentru sistemul sanguin ABO
- 1953 – W.J Dempster – boala grefă contra gazdă (GvHD)
- 1968 – E. Donnall Thomas – primul transplant de măduvă hematogenă

- Transplantul de celule stem hematopoietice la pacienții umani
 - 1959–1963: transplant HSC alogenic la om
 - 1970 - începutul epocii moderne a HSCT

Aplicații:

- la copiii cu imunodeficiențe primare;
- pacienți cu diverse forme de leucemie



Joseph E. Murray

E. Donnall Thomas

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1990 was awarded jointly to Joseph E. Murray and E. Donnall Thomas "for their discoveries concerning organ and cell transplantation in the treatment of human disease"

Transplantul de organe solide vs. Transplantul medular

Transplantul de organe solide

Grefonul – număr mic de celule imunocompetente

Sistemul imun rămâne al gazdei

Terapie imunosupresoare pentru prevenirea rejetului (HvG) toată viața

Transplant medular

Grefa – număr mare de celule imunocompetente

Sistemul imun va fi al donatorului

Terapie imunosupresoare pentru prevenirea GvHD până la instituirea toleranței imunologice (terapie discontinuă)

Rezultate teste de histocompatibilitate 1

Primitor

Nr. Registru 1244

Data primirii probei: 04. 10.2017

Data eliberării rezultatului: 16.10.2017

Nume: potențial primitor de grefă medulară

Diagnostic: leucemie acută limfoblastică

Trimis de dr.

Tip probă: sânge periferic (probă adusă)

Tehnica: PCR-SSP

Potențial donator (familiar)

Nr. Registru 1245

Data primirii probei: 04. 10.2017

Data eliberării rezultatului: 16.10.2017

Nume: potențial donator pentru....

Trimis de dr.

Tip probă: sânge periferic (probă adusă)

Tehnica: PCR-SSP

Fenotip:

A*02 A*24, B*15 B*18,

DRB1*04 DRB1*11, DQB1*03 DQB1*06

Fenotip:

A*24 A*68, B*18 B*25,

DRB1*11 DRB1*16, DQB1*03 DQB1*05

Compatibilitate: 4/8 (incompatibili → tipizare HLA high resolution doar pentru primitor pentru căutare donatori în registrul de transplant)

***PCR-SSP** = polymerase chain reaction with sequence-specific priming

Rezultate teste de histocompatibilitate 2

Primitor

Nr. Registru 1235

Data primirii probei: 12. 07.2017

Data eliberării rezultatului: 20.07.2017

Nume: potențial primitor de grefă medulară

Diagnostic: LAL

Trimis de.dr.

Tip probă: sânge periferic (proba adusă)

Tehnica: SBT*

Potențial donator

Se caută direct în Registrul de Transplant

Fenotip:

A*02:01 A*11:01, B*51:01 B*52:01, C*12:02 C*15:02

DRB1*03:01 DRB1*11:01 , DQB1*02:01 DQB1*03:01

- **Fără donatori familiari** → se tipizează HLA high resolution → se caută donatori în Registrul de Transplant

***SBT** = sequence based typing (secvențializare)

Rezultate teste de histocompatibilitate 3

Primitor

Nr. Registru 1209
Data primirii probei: 21.03.2017
Data eliberarii rezultatului: 10.04.2017
Nume: potential primitor de grefa medulara
Trimis de.dr.
Tip proba: sange periferic (proba adusa)
Tehnica: SBT

Potențial donator 1

Nr. Registru 1211
Data primirii probei: 21.03.2017
Data eliberarii rezultatului: 21.04.2017
Nume: potential donor pentru Trimis de.dr
Tip proba: sange periferic (proba adusa)
Tehnica: SBT

Potențial donator 2

Nr. Registru 1212
Data primirii probei: 21.03.2017
Data eliberarii rezultatului: 21.04.2017
Nume: potential donor pentru Trimis de dr.
Tip proba: sange periferic (proba adusa)
Tehnica: SBT

Fenotip:

A*02:01 A*68:01 , B*18:01
B*44:05, C*02:02 C*07:01
DRB1*01:01 DRB1*11:04,
DQB1*03:01 DQB1*05:01

Fenotip:

A*02:01 A*68:01 , B*18:01 B*44:05,
C*02:02 C*07:01
DRB1*01:01 DRB1*11:04,
DQB1*03:01 DQB1*05:01

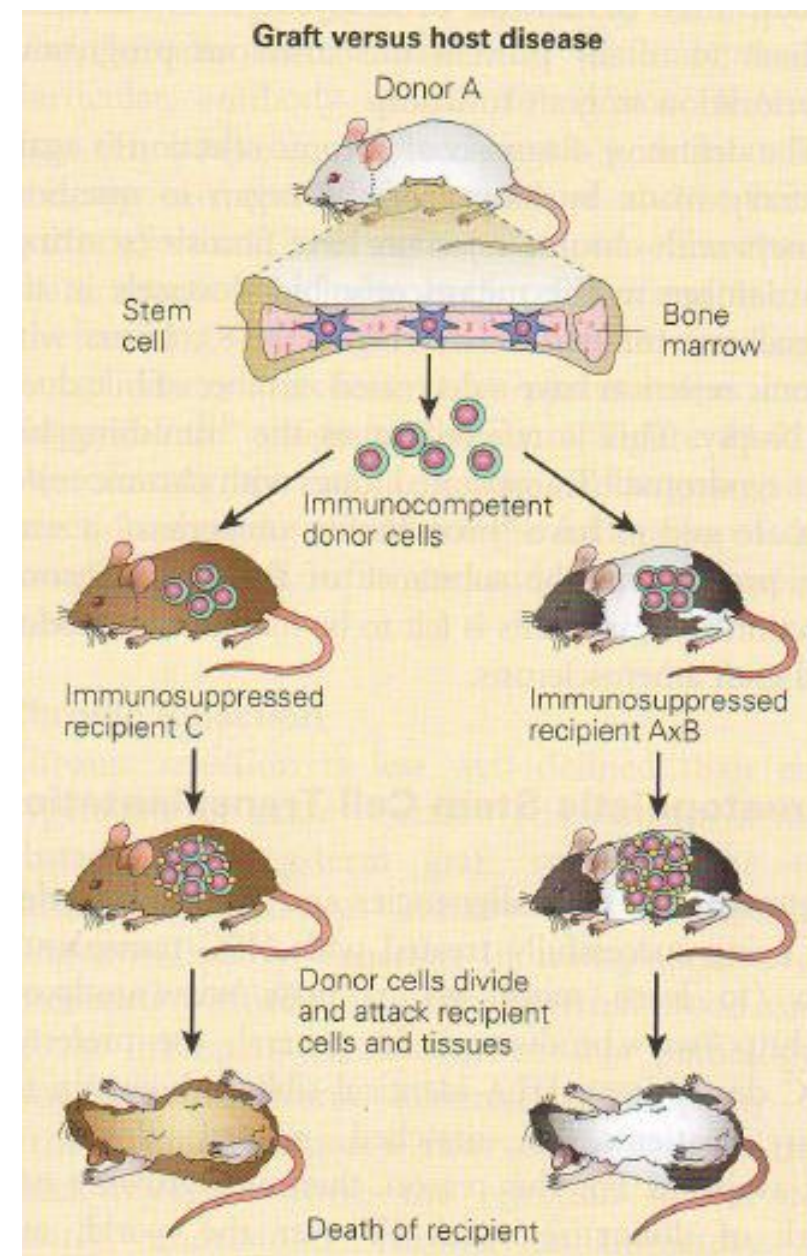
Fenotip:

A*02:01 A*68:01 , B*18:01 B*44:05,
C*02:02 C*07:01
DRB1*01:01 DRB1*11:04,
DQB1*03:01 DQB1*05:01

Compatibilitate: 10/10

6. Boala grefă contra gazdă (GvHD)

- Cea mai importantă problemă în transplantul de celule stem hematopoietice/transplant de măduvă osoasă
- GvDH este similară ca mecanisme cu rejețul grefonului, dar în acest caz limfocitele T ale donatorului recunosc antigenele de histocompatibilitate ale primitorului ca fiind non-self
- Ținte principale ale GvHD: piele, ficat, tractul digestiv
- GvHD are 4 stadii: I (ușor) → IV (foarte sever)
 - **Stadiul I** – prurit cutanat ușor, diaree, enzime hepatice ↑
 - **Stadiul IV** – eritrodermie buloasă generalizată și descuamări cutanate, enzime hepatice ↑↑↑, diaree severă și dureri abdominale → deces



6. Boala grefă contra gazdă (GvHD)

Stadializarea bolii grefă contra gazdă

Stadiu	Tegument	Ficat	Tract digestiv
I	Erupție maculopapulară < 25% s.c.	Bilirubina 2-3 mg/100ml	Diaree > 280 ml/m ² s.c.
II	Erupție maculopapulară 25-50% s.c.	Bilirubina 3-6 mg/100ml	Diaree > 555 ml/m ² s.c.
III	Eritrodermie generalizată	Bilirubina 6-15 mg/100ml	Diaree > 833 ml/m ² s.c.
IV	Eritrodermie generalizată cu formarea de bule și descuamări	Bilirubina > 15 mg/100ml	Dureri abdominale severe

Prevenție și tratament:

- Cea mai bună compatibilitate alelică HLA
- Imunosupresie
- Depleția limfocitelor T mature ale donatorului din produsul transplantat – risc de recăderi ale procesului malign

7. Boala grefă contra leucemie (GvL)

- pacienții care dezvoltă GvHD au o rată mai scăzută de recăderi ale procesului malign → un grad scăzut de GvHD este benefic pentru supraviețuirea pacientului (celulele imune ale donatorului atacă și celulele tumorale reziduale ale primitorului)
- GvL a fost observată în leucemii acute, limfoame maligne, mieloame și tumori solide
- se presupune că pentru anumite afecțiuni, cum ar fi leucemia mielocitară cronică (LMC), efectul GvL este factorul cel mai important pentru care transplantul alogenic are efect curativ

Pregătirea pacienților pentru transplant de HSC (hematopoietic stem cells)

Chimioterapie (chemoterapie) mieloablativă

- elimină celulele maligne și creează mediul propice pentru greșarea HCS de la donator („engraftment”)
- dozele mari de chimioterapie
 - duc la apariția „furtunii citokinice”, care se presupune că duce la creșterea abilității celulelor imune transplantate să recunoască antigenele
 - pot duce la apariția injuriilor tisulare și la expunerea antigenelor criptice (antigene ascunse) în organele susceptibile, cum ar fi tegument, ficat, intestin

În prezent se încearcă **terapia imunosupresoare non-mieloablativă**, care scade apariția GvHD și reduce toxicitatea totală a procedurilor de transplant; se poate aplica cu succes și persoanelor vârstnice

8. Imunosupresia

Scopul principal al imunosupresiei este evitarea declanșării răspunsului aloimun, prin prevenirea activării limfocitelor T și eliberarea ulterioară de citokine și proliferare celulară

Clasa imunosupresoare

Reprezentanți

Inhibitori ai calcineurinei

Tacrolimus (FK506), ciclosporina

Corticosteroizi

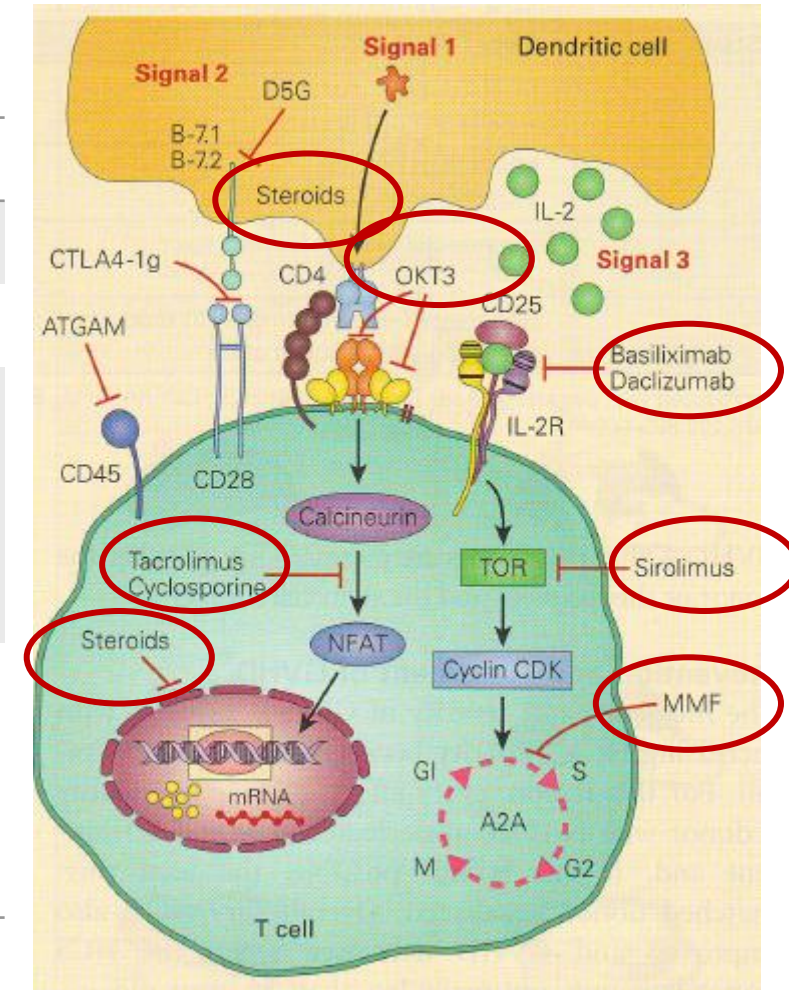
Prednison

Agenți citotoxici

Azathioprina (inhibă sinteza purinelor)
Micofenolat mofetil (MMF) (inhibă sinteza de novo a purinelor, limfocit-specific)
Rapamicina (Sirolimus)

Anticorpi anti-limfocitari

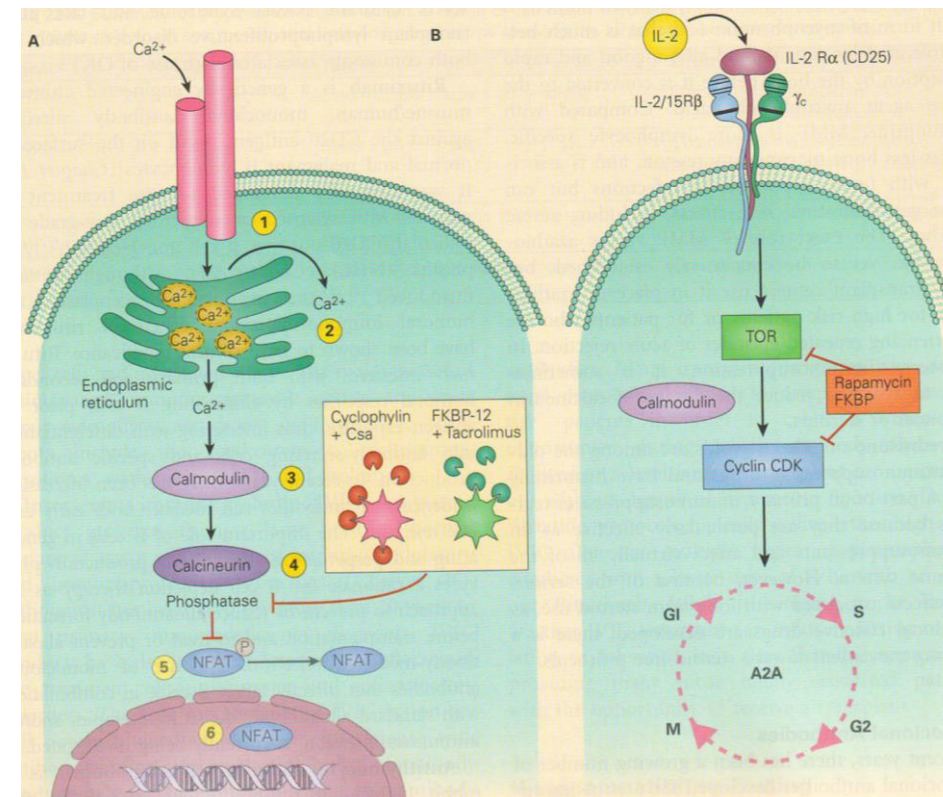
Anti-CD3 (OKT3)
Anti-timocite policlonali (timoglobuline)
Anti-IL-2R (daclizumab, basiliximab)
Anti-CD20 (rituximab)



8. Imunosupresia

Inhibitorii de calcineurină

- Inhibă calcineurina, o fosfatază responsabilă de activarea transcripției IL-2
- **Ciclosporina** se leagă de ciclofilină (imunofilină prezentă în celule variate, inclusiv limfocite T)
- **Tacrolimus** se leagă de FKBP-12 (o altă imunofilină)
- Complexul **imunofilină-medicament** se leagă de calcineurină și blochează defosforilarea factorului de transcripție NFAT (factorul nuclear al limfocitelor T activate = nuclear factor of activated T cells) → blochează migrarea NFAT spre nucleu și inițierea sintezei de citokine (inclusiv IL-2)



8. Imunosupresia

Agenții citotoxici

- **Sirolimus (rapamicină)** – a fost dezvoltat inițial ca antibiotic macrolid, antifungic (produs al bacteriei *Streptomyces hygroscopicus*); se leagă de imunofilina FKBP-12 și inhibă kinaza mTOR, care reglează diviziunea celulară; nu este toxic la nivel renal și este folosit adesea în combinație cu inhibitori ai calcineurinei și/sau MMF pentru a asigura regimuri imunosupresoare fără steroizi (steroid-free immunosuppression)
- **Azatioprina** – medicament folosit mai rar ca chimioterapic, utilizat pentru imunosupresie și în afecțiuni autoimune (artrită reumatoidă, boală inflamatorie intestinală, boală Crohn); este un pro-medicament, convertit în organism în metabolitul activ 6-mercaptopurină; inhibă sinteza purinelor, necesare pentru proliferarea celulelor (LT);
- **Micofenolat mofetil (MMF)** – este similar azatioprinei, inhibând sinteza *de novo* a purinelor, blocând astfel proliferarea limfocitară; este o sare a acidului micofenolic, mai bine tolerată de organism, cu absorbție bună și rapidă; este mai specific pentru limfocite comparativ cu azatioprina
- **Prednison** – corticosteroizii sunt printre cele mai vechi medicamente imunosupresoare; datorită efectelor secundare asociate cu utilizarea pe termen lung a steroizilor, se încearcă înlocuirea acestora în regimurile imunosupresoare de tip steroid-free.

8. Imunosupresia

Medicament

Efecte adverse principale

Corticosteroizi

Hipertensiune, dezechilibru glicemic, dislipidemie, osteoporoză

Ciclosporina

Efecte nefrotoxice, hepatotoxice, hipertensiune, dislipidemie

Tacrolimus (FK506)

Similare ciclosporinei; hirsutism și hipertrofie gingivală reduse

Azathioprina

Supresia MOH

Mycofenolat mofetil (MMF)

Diaree, discomfort al tractului digestiv, infecții cu CMV ↑

Sirolimus (dezvoltat inițial ca anti-fungic din *Streptomyces hygroscopicum*)

Hiperlipidemie, trombocitopenie

OKT3

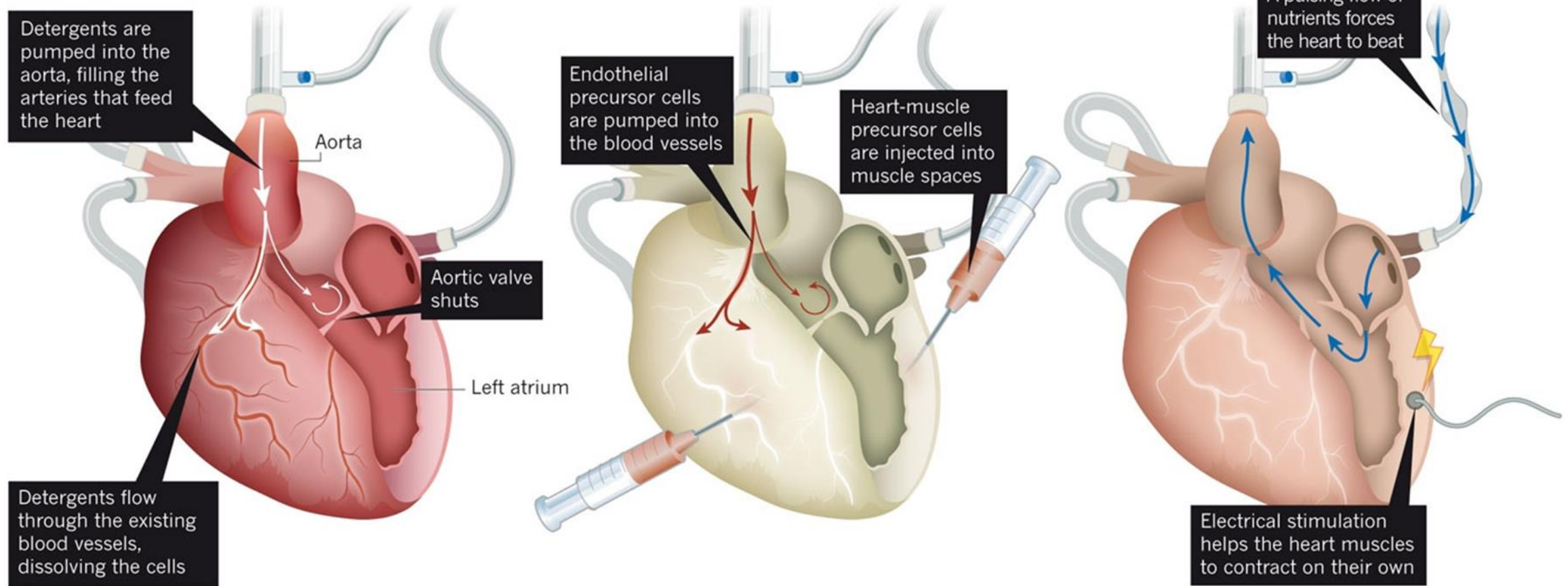
Sindrom de "furtună citokinică" și boli limfoproliferative post-transplant

Timoglobulina

Sindrom de "furtună citokinică" și boli limfoproliferative post-transplant

CUSTOMIZED ORGANS

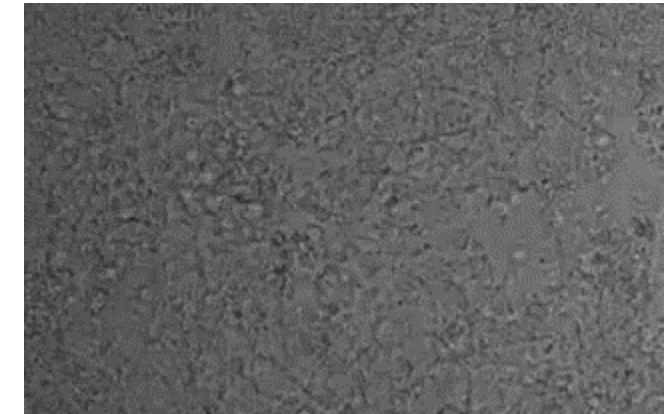
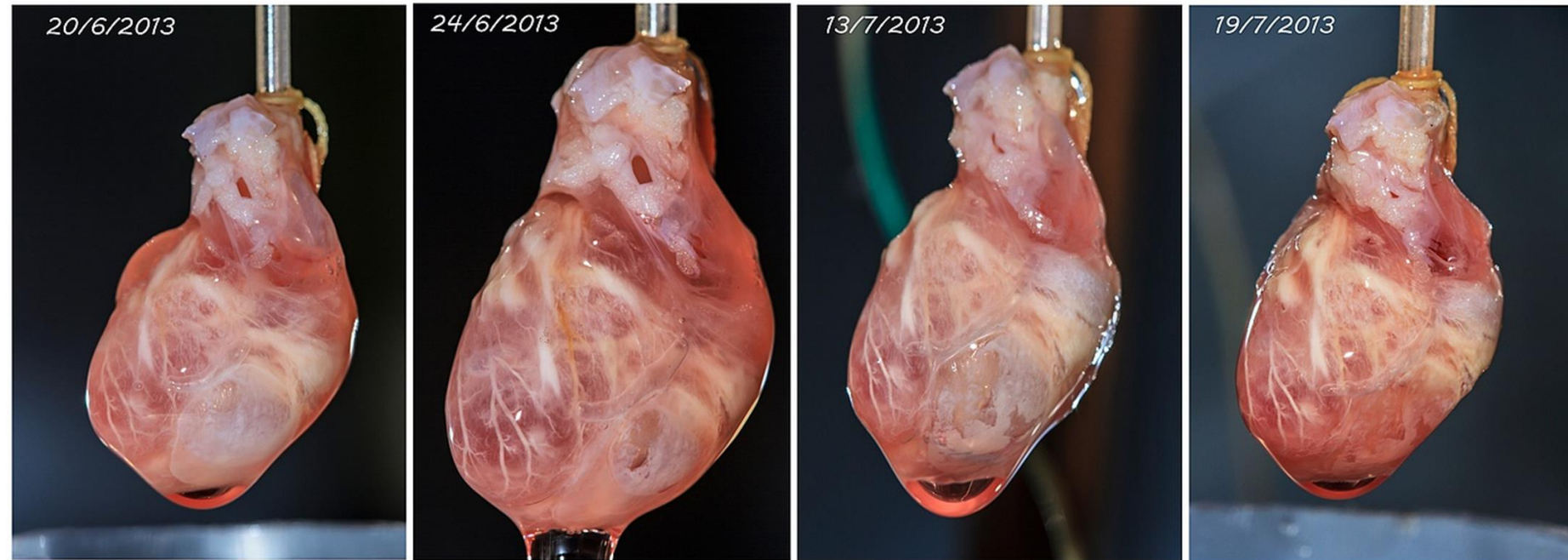
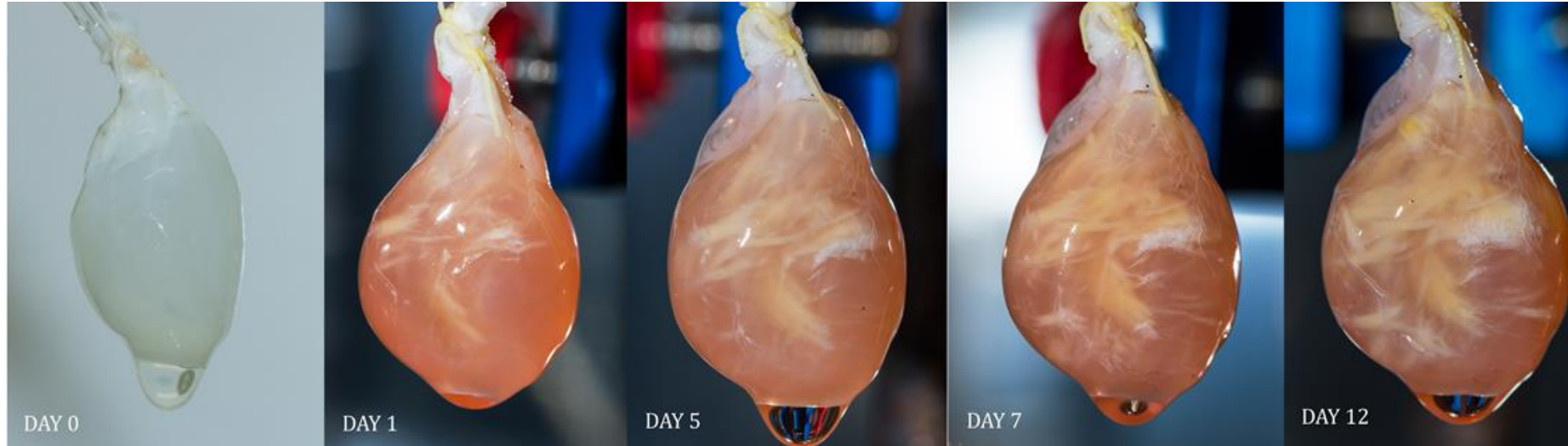
To construct a new heart, researchers first remove all cells from a donor organ (left), leaving a protein scaffold. That is seeded with cells (centre), which mature under the influence of growth factors and mechanical stimulation (right).



Terapii ale viitorului.....în Centrul OncoGen



Terapii ale viitorului.....în Centrul OncoGen



MCQs

1. Un grefon transplantat de la un individ la același individ se numește:

- A. Grefon singeneic
- B. Xenograft
- C. Alograft
- D. Graft autolog (autograft)

2. Activarea complementului, distrugere endotelială, inflamație și tromboză care apar la câteva minute post-transplant sunt caracteristici ale:

- A. Rejet acut
- B. Rejet hiperacut
- C. Rejet tardiv
- D. Rejet cronic

3. Următoarele sunt metode utilizate pentru reducerea reacțiilor de rejet, cu excepția:

- A. Compatibilitate HLA pentru HLA-A, HLA-B, HLA-C
- B. Crossmatching
- C. Screening pentru anticorpii pre-formați
- D. Determinarea nivelului seric de IgG

MCQs

4. Următoarele afirmații sunt adevărate despre GvHD, cu excepția:

A. GvHD este principala limitare în transplantul cu succes al MOH

B. Principalele organe implicate în GvHD sunt: pielea, ficat, intestin

C. GvHD cronică este caracterizată prin fibroză și atrofie

D. Eliminarea limfocitelor T din MOH a donatorului crește rata de reușită a transplantului

5. Care dintre agenții imunosupresori inhibă proliferarea limfocitelor prin inhibarea semnalizării IL-2?

A. Ciclosporina

B. Azathioprina

C. Mycofenolat mofetil

D. Rapamycina

Persoana	Vârsta	Relația cu pacientul	Genotipuri HLA			Fenotipul genic al grupelor sanguine
			A	B	DR	
Doamna X	46	Pacienta	1	8	3	BODd BRh+
			2	44	4	
Domnul X	52	Soț	2	14	8	AOdd ARhr
			3	7	2	
Ana	25	Fiică	2	44	4	AOddARhr
			3	7	2	
Bert	24	Fiu	1	8	3	ABDd ABRh+
			2	14	8	
Chas	21	Fiu	1	8	3	BOdd BRhr
			3	7	2	
Dave	15	Fiu	2	44	4	BODd BRh+
			1	60	9	
Edna	13	Fiică	1	8	3	AODd ARh+
			2	14	8	
Fred	48	Frate	1	8	3	ABDd ABRh+
			2	44	4	
Gary	56	Frate	2	44	4	BODD BRh+
			2	14	15	