

Base genetica della microangiopatia trombotica post-trapianto di midollo: l'ultimo tassello del puzzle?

Nefrologo in corsia

Nicoletta Mancianti¹, Andrea Guarnieri¹, Sergio Tripodi², Domenica Paola Salvo¹, Fabio Rollo¹, Mariapia Lenoci³, Francesca Toraldo³, Alessandro Bucalossi³, Guido Garosi¹

1 Department of Emergency-Urgency and Transplantation, Nephrology, Dialysis and Transplantation Unit, University Hospital of Siena, Siena, Italy

2 Department of Oncology, Anatomical Pathology Unit, University Hospital of Siena, Siena, Italy

3 Stem Cell Transplant and Cellular Therapy Unit, University Hospital, Siena, Italy



Nicoletta Mancianti

Corrispondenza a:

Nicoletta Mancianti

Department of Emergency-Urgency and Transplantation

Nephrology, Dialysis and Transplantation Unit

University Hospital of Siena, Siena, Italy.

E-mail: nicoletta.mancianti@ao-siena.toscana.it

ABSTRACT

La microangiopatia trombotica associata al trapianto (TA-TMA) è una complicanza del trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) correlata a danno renale e significativa mortalità. Studi recenti indicano che la disregolazione della via alterna del complemento potrebbe essere alla base dello sviluppo di TA-TMA. Attualmente, non esistono strumenti di screening pre-trapianto per identificare i pazienti a rischio. Riportiamo il caso clinico di una donna di 47 anni, sottoposta a HSCT aploidentico complicato da TA-TMA confermato dalla biopsia renale. Per esplorare il meccanismo della TA-TMA, abbiamo eseguito uno studio genetico che ha permesso di identificare la delezione della regione CFHR3-CFHR1 in omozigosi. La paziente sospendeva il trattamento con inibitori della calcineurina (potenziali induttori di TA-TMA) con temporanea introduzione di prednisone fino a completa risoluzione del danno renale e della microangiopatia.

L'identificazione di varianti genetiche che interessano il meccanismo della via alterna del complemento potrebbe essere d'ausilio nella stratificazione del rischio di TA-TMA e nella personalizzazione dell'approccio terapeutico.

PAROLE CHIAVE: microangiopatia trombotica associata al trapianto, suscettibilità genetica, trapianto di cellule ematopoietiche, via alterna del complemento

Introduzione

La microangiopatia trombotica associata al trapianto (TA-TMA) complica il 10-40% dei trapianti di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) [1,2] ed è correlata ad una mortalità significativa (21%-75%) [3]. La TA-TMA è caratterizzata da un danno endoteliale sistemico con conseguente trombosi e deposito di fibrina nel microcircolo, piastrinopenia e anemia emolitica microangiopatica. La maggior parte dei casi di TA-TMA si manifesta entro i primi 100 giorni dopo il trapianto. La diagnosi di TA-TMA deve essere sospettata nei riceventi di HSCT che presentano uno o più parametri clinici e laboratoristici (Tabella I). Nei casi in cui la diagnosi è dubbia, la biopsia renale può essere utile a dirimere con certezza se si tratti di una TA-TMA. L'esecuzione della biopsia renale è tuttavia spesso controindicata dalla presenza di trombocitopenia, che aumenta il rischio di sanguinamento. L'esame istologico rivela un quadro di mesangiolisi con possibile presenza di lesioni arteriolari e glomerulari necrotizzanti associate a trombi arteriolari intraglomerulari [4]. Attualmente, non ci sono dati sulla suscettibilità individuale alla TA-TMA e non sono disponibili strumenti di screening pre-trapianto per identificare i pazienti a rischio di TA-TMA.

Indici di sospetto di TA-TMA	Valori utili ad escludere altre eziologie
<ul style="list-style-type: none"> • Segni di emolisi (LDH elevato, schistociti allo striscio di sangue periferico, diminuzione dell'aptoglobina sierica, test di Coombs negativo) • Incremento della Cr • Proteinuria di nuova insorgenza o in aumento • Ipertensione sproporzionata rispetto a quanto ci si aspetterebbe dalla terapia con CNI e steroidi (es. ≥ 3 farmaci antipertensivi) • Richiesta di maggiore supporto trasfusionale rispetto a quanto precedentemente necessario per mantenere stabile l'Hb e le PLT (PLT $< 50.000/\text{microL}$ o riduzione $\geq 50\%$ rispetto alle conte precedenti) 	<ul style="list-style-type: none"> • ADAMTS13 (PTT) • Studio della coagulazione (CID) • Test di Coombs (anemia emolitica autoimmune) • Studio del chimerismo dei linfociti T (GVHD) • PCR virali (infezioni)
<p><i>Legenda:</i> LDH, lattico-deidrogenasi; PTT, porpora trombotica trombocitopenica; CID, coagulazione intravasale disseminata; CNI, inibitori della calcineurina; GVHD, graft versus host disease; Hb, emoglobina; PLT, piastrine; PCR, polymerase chain reaction.</p>	

Tabella I: Indici di sospetto di TA-TMA e principali diagnosi differenziali

Scopo di questo articolo è esplorare il meccanismo patogenetico sottostante alla TA-TMA attraverso una analisi genetica dettagliata dei fattori del complemento, al fine di identificare eventuali varianti predisponenti.

Caso clinico

Il nostro caso riguarda una donna di 47 anni, sottoposta a HSCT aploidentico per leucemia mieloide acuta. La paziente non presentava altre comorbidità. Il protocollo di condizionamento al trapianto è stato effettuato con una associazione di farmaci antiblastici secondo il seguente schema terapeutico: THIOTEPA (290 mg ev/die giorni -6 e -5); BUSOLFANO (185 mg ev/die giorni -4 -3 e -2); FLUDARABINA (80 mg ev/die giorni -4, -3 e -2). Il regime di condizionamento non determinava fenomeni di tossicità acuta. La terapia immunosoppressiva post-trapianto utile alla profilassi della malattia da trapianto contro il ricevente (GVHD) consisteva in micofenolato mofetile 1000 mg x 2/die

per os dal giorno +1 al giorno + 28 e ciclosporina 1 mg/Kg ev/die dal giorno 0 al giorno +20 e poi passaggio a terapia per os (ciclosporina 150 mg x 2/die) (livelli basali C0 pari a 225 ng/ml). Dopo alcune settimane dal trapianto, la paziente sviluppava anemia emolitica microangiopatica e danno renale acuto stadio I con sedimento attivo (Tabella II). Una ecografia renale mostrava reni di regolari dimensioni, morfologia e profilo. Il parenchima era nella norma per spessore ed ecogenicità. La valutazione ecocolordoppler evidenziava una omogenea rappresentazione della vascolarizzazione intra-renale con resistenze nei limiti (indice di resistenza valutato a livello delle arterie interlobari 0.65).

Parametri	Valori
LDH (VN <220 U/l)	280 U/l
Aptoglobina (VN 35-195 mg/dl)	<0,06 mg/dl
Hb	11 g/dl
Piastrine	114000/uL
Esame delle urine	Microematuria
Sedimento urinario	Emazie dismorfiche 25 p.c.m.
Alfa 1 microglobulina urinaria (VN <12 mg/l)	34 mg/l
Cr basale	0,5 mg/dl
Cr AKI (I stadio)	0,8 mg/dl
<i>Legenda:</i> LDH, lattico-deidrogenasi; VN, valore normale; Hb, emoglobina; Cr, creatininemia; AKI, acute kidney injury.	

Tabella II: Esami di laboratorio del caso clinico della paziente (47 anni)

La paziente veniva sottoposta ad agobiopsia renale. La microscopia ottica mostrava ispessimento e focale sdoppiamento della membrana basale glomerulare associata a lieve atrofia tubulare diffusa e minima fibrosi interstiziale. Un'arteriola presentava una piccola area di ialinosi segmentale e un lieve ispessimento intimale. L'immunofluorescenza risultava negativa. L'esame ultrastrutturale confermava lo sdoppiamento della membrana basale con incremento dello spazio endoteliale. Complessivamente l'esame istologico confermava il sospetto clinico di TA-TMA (Figura 1). Per esplorare ulteriormente il meccanismo della TA-TMA correlata all'HSCT, abbiamo eseguito una approfondita analisi genetica.

L'analisi è stata eseguita su DNA estratto dal sangue periferico della paziente post-HSCT mediante il sequenziamento massivo parallelo (Next Generation Sequencing), su piattaforma Illumina MiSeq Kit HaloPlex Target Enrichment System (Agilent Technologies) con pannello genetico complementemico custom (CFH, MCP/CD46, CFI, C3, CFB, THBD, DGKE, CFHR1, CFHR3, CFHR5). La conferma delle varianti è avvenuta mediante tecnica di sequenziamento secondo il metodo Sanger. L'analisi Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification è stata eseguita sui geni CFH, CFHR3, R1, R2, R5 per la ricerca di macrodelezioni/macroduplicazioni e geni ibridi (kit SALSA MLPA P236 ARMD- MRC-Holland); sensibilità 90%.

Lo studio genetico ha permesso di identificare la delezione della regione CFHR3-CFHR1 in omozigosi relata alla presenza di Ac anti-fattore H. In base ai risultati della biopsia, la paziente sospendeva il trattamento con CNi con temporanea introduzione di prednisone per la profilassi della GVHD. Il prednisone è stato somministrato per os al dosaggio di 0,5 mg/Kg (25 mg/die) con progressivo *décalage* fino a sospensione dopo 4 settimane. L'interruzione del CNi portava alla risoluzione clinica e laboratoristica del danno renale e della microangiopatia.

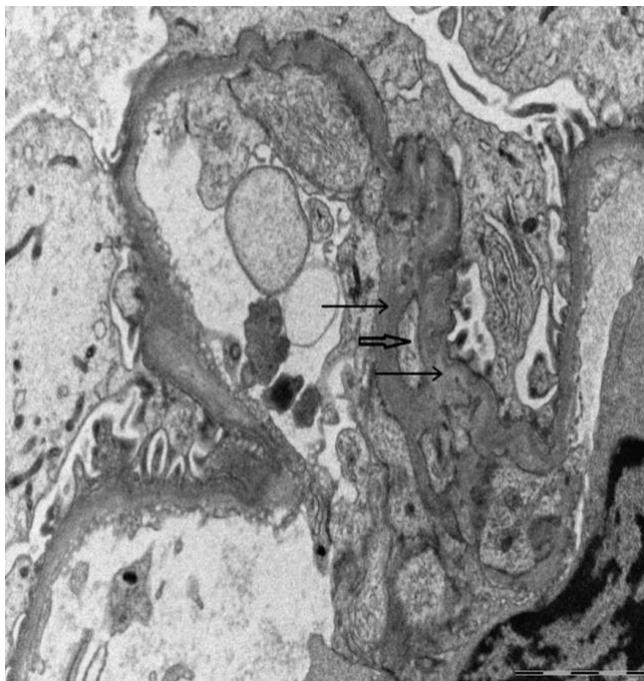


Figura 1: Esame ultrastrutturale: assenza di depositi elettrondensi. Focale sdoppiamento delle membrane ed aumento dello spazio sottoendoteliale per interposizione mesangiale. Quadro compatibile con microangiopatia trombotica. Microscopia Elettronica (x 11000). Frecche sottili: sdoppiamento della membrana basale

Discussione

Studi recenti indicano che il sistema del complemento potrebbe contribuire allo sviluppo di TA-TMA [5,6]. Nel nostro caso, la sospensione del CNI potrebbe aver interrotto il meccanismo patogenetico alla base del danno. Nello studio di Jodele et al. (2) su una coorte di pazienti pediatrici, il 65% dei pazienti con TA-TMA aveva varianti genetiche del complemento rispetto al 9% dei pazienti senza TMA ($P < 0,0001$). In questo studio la delezione della regione CFHR3-CFHR1 identificata nella nostra paziente predispondeva alla TA-TMA, il che suggerisce che la disregolazione della via alterna del complemento sia un meccanismo chiave della patogenesi. Questa ipotesi è suffragata anche dalla buona risposta al blocco del complemento tramite eculizumab osservata in alcuni studi preliminari [7,8]. È probabile che siano necessari fattori di stress ambientali aggiuntivi (CNI, infezioni virali, GVHD) per l'attivazione cellulare endoteliale post-HSCT [9]. Tuttavia, riteniamo che l'identificazione delle persone ad aumentato rischio di TA-TMA abbia utilità clinica. Lo screening genetico pre-HSCT consentirebbe la selezione dei trapiantati ad alto rischio che potrebbero beneficiare di interventi specifici. Poiché i CNI ed il sirolimus sono associati ad un aumentato rischio di TA-TMA, nella profilassi della GVHD potrebbero essere utilizzate strategie alternative (ad es. deplezione ex vivo delle cellule T o uso della fotoferesi) e, nei casi in cui si manifesti una TA-TMA, i nuovi bloccanti del complemento potrebbero essere un'opzione terapeutica razionale.

Conclusioni

L'attivazione della via alterna del complemento potrebbe essere alla base della TA-TMA. Varianti genetiche predisponenti sono verosimilmente parte preponderante del meccanismo di induzione della TA-TMA e la loro identificazione potrebbe essere d'aiuto nella stratificazione del rischio di TA-TMA utile ad attuare un approccio terapeutico personalizzato.

BIBLIOGRAFIA

1. Chapin J, Shore T, Forsberg P, Desman G, Van Besien K, Laurence J. Hematopoietic transplant-associated thrombotic microangiopathy: case report and review of diagnosis and treatments. *Clin Adv Hematol Oncol* 2014, 12:565-73.
2. Jodele S, Zhang K, Zou F, Laskin B, Dandoy CE, Myers KC, Lane A, Meller J, Medvedovic M, Chen J, Davies SM. The genetic fingerprint of susceptibility for transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Blood* 2016; 127: 989-96. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-663435>
3. Brocklebank V, Kavanagh D. Complement C5-inhibiting therapy for the thrombotic microangiopathies: accumulating evidence, but not a panacea. *Clin Kidney J* 2017; 10(5):600-24. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfx081>
4. Hingorani S, Abudayyeh A, Jhaveri KD. Kidney disease following hematopoietic cell transplantation. UpToDate (last updated Sep 09, 2021). <https://www.uptodate.com/contents/kidney-disease-following-hematopoietic-cell-transplantation>
5. Horváth O, Kállay K, Csuka D, Mező B, Sinkovits G, Kassa C, et al. Early Increase in Complement Terminal Pathway Activation Marker sC5b-9 Is Predictive for the Development of Thrombotic Microangiopathy After Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018; 24(5):989-96. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.01.009>
6. Qi J, Wang J, Chen J, Su J, Tang Y, Wu X, et al. Plasma Levels of Complement Activation Fragments C3b and sC5b-9 Significantly Increased in Patients with Thrombotic Microangiopathy After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Ann Hematol* 2017; 96(11):1849-55. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3092-9>
7. Jodele S, Dandoy CE, Lane A, et al. Complement blockade for TA-TMA: lessons learned from a large pediatric cohort treated with eculizumab. *Blood* 2020; 135(13):1049-57. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004218>
8. Dhakal P, Giri S, Pathak R, Bhatt VR. Eculizumab in transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017; 23(2):175-80. <https://doi.org/10.1177/1076029615599439>
9. Young JA, Pallas CR, Knovich MA. Transplant-associated thrombotic microangiopathy: theoretical considerations and a practical approach to an unrefined diagnosis. *Bone Marrow Transplant* 2021; 56(8):1805-17. <https://doi.org/10.1038/s41409-021-01283-0>