



Trattamento della PTLD tipo linfoma di Hodgkin con chemioterapia a dosaggio ridotto e linfociti T citotossici EBV-specifici in un ricevente pediatrico di trapianto cardiaco

Chiara Gagliardone, Ida Nardiello, Alessandra Tolva, Luisa Strocchio, Marco Zecca

Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Trattamento della PTLD tipo linfoma di Hodgkin con chemioterapia a dosaggio ridotto e linfociti T citotossici EBV-specifici in un ricevente pediatrico di trapianto cardiaco

Tra i disordini linfoproliferativi post-trapianto monomorfici Epstein-Barr Virus-correlati (PTLD), la PTLD linfoma di Hodgkin (LH)-type è infrequente ed il suo sviluppo a distanza di anni da una prima PTLD istologicamente diversa è un'eventualità ancora più rara. Poiché le PTLD LH-type sono rare, non esistono linee guida terapeutiche univoche. I pazienti descritti in letteratura sono stati trattati con chemioterapia/radioterapia usata per il LH classico, con prognosi migliore rispetto ad altri tipi istologici di PTLD monomorfe. Il caso clinico descritto è quello di un paziente pediatrico ricevente di trapianto di cuore affetto da PTLD LH-type EBV-correlato, sviluppatosi otto anni dopo la diagnosi di PTLD polimorfica B-cellulare. Lo schema terapeutico adottato (chemioterapia standard per il LH a dosaggio ridotto e infusione di CTL autologhi EBV-specifici), si è dimostrato efficace. A due anni dallo stop-terapia, il paziente è in remissione completa, in terapia immunosoppressiva di mantenimento e con funzionalità d'organo stabile. La strategia adottata potrebbe consentire di riprodurre gli ottimi risultati, in termini prognostici, riportati in letteratura per il trattamento standard delle PTLD tipo LH, con il vantaggio di ridurre il rischio di tossicità d'organo e di rigetto legati al trattamento chemioterapico classico.

Treatment of PTLD type Hodgkin lymphoma with reduced-dose chemotherapy and EBV-specific cytotoxic T lymphocytes in a pediatric heart transplant recipient

Hodgkin lymphoma (HL)-type is an uncommon variant of Epstein-Barr virus (EBV)-related post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD), and development of HL subsequent to other PTLD subtypes in the same transplant recipient is even more unusual. Because of its rarity, indications on the best treatment strategy are limited. Patients have been mostly treated with standard HL chemotherapy/radiotherapy, prognosis seems more favourable than other monomorphic PTLDs. In this report, we describe a paediatric case of EBV-associated, stage IVB HL developing in a heart allograft recipient eight years after diagnosis of B-cell polymorphic PTLD. The patient was successfully treated with adjusted-dose HL chemotherapy and autologous EBV-specific cytotoxic T lymphocytes, without discontinuation of maintenance immunosuppression. At two years from therapy completion, the patient is in complete remission with stable organ function. With this strategy, it may be possible to reproduce the good prognostic data reported for HL-type PTLD, with decreased risk of organ toxicity or rejection.

Introduzione

I disordini linfoproliferativi post-trapianto (post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLD) sono una frequente complicanza dei trapianti di organi solidi e sono la prima causa di sviluppo di neoplasie nei riceventi pediatrici [1-2]. Nonostante sia accertata l'esistenza di PTLD Epstein-Barr Virus (EBV)-negative [3], la maggior parte è EBV-correlata e determina una proliferazione incontrollata di linfociti B. Il rischio di sviluppare una PTLD nei soggetti sottoposti a trapianto cardiaco oscilla tra il 5% e il 15% [1, 4]. Le cellule B sono la linea cellulare più frequentemente interessata tra le varianti di PTLD polimorfiche EBV-correlate; al contrario, le PTLD tipo linfoma di Hodgkin (LH) [5-6] sono estremamente rare in età pediatrica [4, 7-8]. La distinzione immunofenotipica tra la PTLD tipo LH-classico (LH-type) e tipo LH-like, basata sulla positività per CD15 e CD30 e sull'assenza di markers B-cellulari, è rilevante per la gestione clinica della patologia poiché il secondo gruppo (maggiormente correlato con l'immunofenotipo delle PTLD monomorfiche B-cellulari) può essere trattato con il Rituximab, mentre il primo gruppo (CD20 negativo) necessita di un trattamento chemioterapico [9]. Inoltre, la PTLD LH-type sembra avere una prognosi migliore rispetto al tipo LH-like [9, 11]. Le PTLD LH-type descritte nei riceventi pediatrici sono prevalentemente a localizzazione linfonodale e sono state osservate per lo più in pazienti sottoposti a trapianto di fegato e rene.

Descriviamo un caso clinico di PTLD LH-type extranodale EBV-correlato, sviluppatosi in un ricevente pediatrico di trapianto di cuore allogenico otto anni dopo la diagnosi di PTLD polimorfica B-cellulare, efficacemente trattato con chemioterapia a dosaggio ridotto e con infusione di linfociti T citotossici autologhi EBV-specifici.

Caso clinico

Paziente caucasico, maschio.

All'età di 23 mesi il paziente è stato sottoposto a trapianto di cuore per cardiopatia dilatativa. L'immunosoppressione post-trapianto era costituita da Ciclosporina (CsA) e Azatioprina. Nel primo anno dopo il trapianto, il paziente ha sviluppato un'anemia iporigenerativa da inappropriata secrezione di eritropoietina, conseguente alla somministrazione di CsA e trattata con eritropoietina umana ricombinante. L'anno seguente (secondo anno dopo il trapianto cardiaco), ha sviluppato un'infezione primaria da EBV con numero di copie virali elevato, trattata con cinque infusioni di linfociti T citotossici EBV-specifici [12]. Dopo un'iniziale diminuzione di un logaritmo delle copie virali, l'EBV-DNA è progressivamente aumentato nei mesi seguenti. Il piccolo è rimasto clinicamente stabile nonostante i fluttuanti livelli di EBV-DNA fino al sesto anno post-trapianto, quando ha presentato un ingrossamento testicolare monolaterale. La valutazione ecografica ha evidenziato tre lesioni nodulari che, previa resezione ed esame istologico del pezzo operatorio, hanno permesso di porre diagnosi di disordine linfoproliferativo post-trapianto polimorfico CD20⁺ EBV-correlato. Si è intrapreso, pertanto, un trattamento incentrato sulla somministrazione dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 Rituximab (375 mg/m² per 2 volte/settimana) e sull'infusione di CTL autologhi EBV-specifici (due dosi da 20x10⁶ cellule/m²), con il raggiungimento di una remissione completa di malattia. Durante il follow-up, l'Azatioprina è stata sostituita da Everolimus, senza alterazioni della funzionalità d'organo eccetto lieve aumento della creatinina sierica, dovuto all'assunzione di Ciclosporina.

Otto anni dopo la risoluzione della PTLD polimorfica, il paziente è stato nuovamente ricoverato per febbre e cefalea; agli esami ematochimici sono stati evidenziati monocitosi, rialzo dei livelli di LDH (1964 mU/ml) e incremento delle copie di EBV-DNA (rapidamente aumentate nell'arco di cinque

giorni da 20,700 copie/ml a 311,400 copie/ml). A completamento delle indagini diagnostiche, sono stati eseguiti ecografia addominale (ingrandimento splenico senza localizzazioni nodulari focali), TC total body (igroma subdurale in assenza di franchi segni di localizzazione cerebrale) e biopsia ossea (sostituzione del 70% del midollo emopoietico con infiltrato linfoide caratterizzato da cellule atipiche CD30⁺, CD15⁺, PAX5⁺, CD20^{+/-}, CD22⁻, CD45⁻, CD3⁻ ed EBV-LMP1⁺; ibridazione in situ positiva per EBER). Sulla base dei risultati ottenuti, è stata posta diagnosi di PTLD LH-type. Inoltre, al momento della diagnosi sono stati riscontrati ipoalbuminemia (2.7 g/dl), incremento della creatinina sierica (1.8 mg/dl) ed ulteriormente aumento delle copie di EBV-DNA (407,700 copie/ml).

Materiali e metodi

Riattivazione e valutazione dei linfociti T citotossici EBV-specifici

I linfociti T citotossici autologhi EBV-specifici sono stati riattivati ed espansi in vitro utilizzando una metodica descritta in letteratura [13]. In breve, i CTL EBV-specifici sono stati preparati partendo da cellule mononucleate del sangue periferico congelate, raccolte al momento della diagnosi di infezione da EBV e coltivate in X-vivo 20 medium (BioWhittaker, Walkersville, MD) insieme a plasma autologo 2%, in presenza di cellule B linfoblastoidi trasformate da EBV (B-LCL) irradiate. Dopo dieci giorni, le colture sono state stimolate nuovamente con B-LCL autologhe irradiate e, dal quattordicesimo giorno, due volte a settimana sono state aggiunte alla coltura 20 UI/ml di IL-2 ricombinante (Hoffman-La Roche, Basel, Svizzera). Prima della criopreservazione, i linfociti T sono stati analizzati per valutarne la potenza e la sicurezza (rispettivamente, specificità per EBV e mancanza di alloreattività) in un saggio di citotossicità mediante rilascio di ⁵¹Cr, contro un pannello di cellule target che includeva B-LCL autologhe e blasti di PHA autologhi ed allogeni. Infine, le linee cellulari così ottenute sono state valutate per immunofenotipo, sterilità e identità.

Somministrazione dei linfociti T citotossici EBV-specifici e valutazione della risposta terapeutica da un punto di vista clinico e delle copie di DNA virale

I CTL EBV-specifici con le adeguate caratteristiche (potenza, non alloreattività e comprovata sterilità), previo consenso firmato dai genitori, sono state infuse nel ricevente in accordo con le linee guida istituzionali [13]. La risposta clinica è stata valutata tramite biopsia ossea e tomografia computerizzata. La frequenza dei CTL EBV-specifici nel sangue periferico è stata studiata con IFN- γ ELISPOT assay, come descritto in articoli precedentemente pubblicati [13]. Infine, le copie di EBV-DNA sono state misurate tramite la metodica di RT-PCR, come riportato in letteratura [14].

Risultati e discussione

In precedenza, sono stati riportati in letteratura solamente quattro pazienti pediatrici sottoposti a trapianto di organo solido (nessuno di questi trapiantato di cuore) con diagnosi di PTLD LH-type secondaria a PTLD di altro tipo istologico [10, 15-17]. La relazione eziologica esistente tra le due forme di disordine linfoproliferativo post-trapianto rimane tuttora sconosciuta, sebbene i dati finora raccolti indichino la coesistenza di due eventi distinti.

Dopo la completa remissione dalla PTLD polimorfica B-cellulare, è stata modificata la terapia immunosoppressiva, con il passaggio da Azatioprina ad Everolimus, allo scopo di prevenire la ricaduta di malattia; infatti, i dati pre-clinici presenti in letteratura indicano che la Rapamicina, appartenente alla categoria degli inibitori di mTOR, possiede proprietà antiproliferative nei modelli tumorali linfoidi (tra cui i PTLD B-cellulari) [18]. Nonostante l'attuazione di questa modifica terapeutica, il ragazzo ha sviluppato a distanza di anni un secondo disordine linfoproliferativo post-trapianto, facendoci supporre che la terapia con Everolimus possa presentare una minor efficacia nella prevenzione delle PTLD EBV-correlate; nel nostro caso specifico, inoltre, non va tralasciato che il paziente stava contemporaneamente assumendo Ciclosporina e che questo potrebbe aver ostacolato gli effetti antitumorali ed anti-EBV dell'Everolimus. Nonostante non esistano univoche linee guida terapeutiche, in letteratura le PTLD LH-type (prevalentemente conseguenti a trapianto di fegato e rene) sono stati trattati con riduzione o interruzione del trattamento immunosoppressivo di mantenimento e con somministrazione di cinque-sei cicli di chemioterapia secondo lo schema COPP/ABV usato classicamente nei LH primitivi, associato o meno al trattamento radioterapico [8, 10, 15-17]. Tuttavia, a causa dell'importante tossicità cardiaca e della coesistente disfunzione renale del nostro paziente, è stato deciso di proseguire invariata la terapia immunosoppressiva in atto e di adattare la chemioterapia, riducendone il numero di cicli previsti e la dose da infondere (circa il 75% dell'intera dose). Pertanto, è stato somministrato il primo ciclo COPP/ABV come previsto dal seguente schema: Ciclofosfamide 470 mg/m² in giornata (G) +1, Vincristina 1 mg/m² in G+1, Vinblastina 4,5 mg/m² in G+7, Bleomicina 7 mg/m² in G+7, Adriamicina 24 mg/m² in G+7, Prednisone 50 mg/die per un totale di 14 giorni e Procarbazina 100 mg/die alternati a 150 mg/die per un totale di 7 giorni. Al termine della chemioterapia, è stata riscontrata una netta riduzione delle copie di EBV-DNA (54,600 copie/ml) e la scomparsa della componente linfoide con assenza di linfoproliferazione all'analisi istologica della biopsia ossea. La terapia è stata proseguita, quindi, con un secondo ciclo COPP/ABV, a seguito del quale il ragazzo ha presentato un netto peggioramento della funzionalità renale (creatinina sierica 3.2 mg/dl) ed ipertensione, che hanno necessitato di un'intensa idratazione e di una terapia antiipertensiva specifica. Per limitare ulteriormente la tossicità, è stato somministrato un terzo ciclo di chemioterapia con Gentamicina 500mg/m² in G+1 e Vinorelbina 12 mg/m² in G+1 (dosi ridotte del 50% rispetto allo standard previsto). Nelle settimane seguenti, il paziente ha presentato un versamento pleurico e una dilatazione con disfunzione sistolica dell'atrio sinistro, entrambe risolte con la somministrazione di terapia diuretica. La chemioterapia, quindi, è stata interrotta.

Recentemente sono stati identificati alcuni dei fattori prognostici che influenzano negativamente la prognosi dei pazienti affetti da PTLD, quali l'interessamento midollare e del sistema nervoso centrale e l'ipoalbuminemia [8, 19]. Essendo tali fattori presenti nel nostro paziente, allo scopo di massimizzare le potenzialità terapeutiche limitando al contempo la tossicità, sono state abbinare infusioni di linfociti T citotossici autologhi EBV-specifici. Previo confronto delle sottopopolazioni linfocitarie tra i CTL anti-EBV utilizzati per il trattamento della PTLD polimorfa B-cellulare e quelli riattivati in occasione della nuova diagnosi (diversa e favorevole distribuzione nelle linee cellulari più recenti), sono state somministrate 30x10⁶ cellule/m²/dose in quattro dosi mensili. La frequenza dei linfociti T specifici nel sangue periferico del paziente prima dell'inizio della terapia era di 74 spot-forming units (SFU)/10⁵ cellule; al termine della terapia con i CTL, nonostante il trattamento con Everolimus e Ciclosporina a basse dosi, è stata riscontrata una frequenza di linfociti T specifici di 433 SFU/10⁵ cellule. Inoltre, sebbene riducano considerevolmente la potenziale espansione dei CTL infusi, gli inibitori della calcineurina non compromettono in maniera significativa la funzione citotossica di tali linfociti; quindi, il transitorio aumento di cellule T EBV-specifiche potrebbe aver contribuito al controllo delle cellule tumorali sopravvissute alle basse dosi di chemioterapia.

Tramite RT-PCR è stata documentata la diminuzione delle copie di EBV-DNA; la rivalutazione imaging della PTLD ha mostrato assenza di reperti patologici; l'esame istologico della biopsia ossea, eseguita circa un anno dopo la diagnosi di PTLD tipo LH, ha mostrato una remissione completa di malattia; infine, durante il follow-up non sono stati osservati segni di rigetto. I dati ottenuti da un ampio studio retrospettivo con 56 riceventi pediatrici sottoposti a trapianto di cuore con PTLD indicano che la prognosi subottimale di questa complicanza è legata, in parte, ad un fallimento terapeutico e, in parte, a un rigetto allogenico acuto o cronico conseguente alla riduzione/interruzione del trattamento immunosoppressivo [4]. Il paziente è attualmente, a due anni dallo stop-terapia, in remissione completa, con una buona funzionalità cardiaca ed una stabile funzionalità renale (creatinina sierica 1.5 mg/dl) e presenta negatività per le copie di EBV-DNA.

In conclusione, i disordini linfoproliferativi post-trapianto LH-type sono una complicanza rara ma molto seria dei trapianti di organi solidi. Tutti i casi finora riportati in letteratura sono stati efficacemente trattati con la chemioterapia standard dei LH, senza la perdita dell'organo. Nel nostro caso, poiché le condizioni cliniche del paziente non consentivano l'utilizzo della normale dose prevista nei cicli COPP/ABV, abbiamo trattato il paziente con una dose ridotta di chemioterapia associata all'infusione di CTL autologhi EBV-specifici. La strategia adottata potrebbe consentire di riprodurre gli ottimi risultati, in termini prognostici, riportati in letteratura per il trattamento standard delle PTLD tipo LH, con il vantaggio di ridurre il rischio di tossicità d'organo e di rigetto legati al trattamento chemioterapico classico.

Bibliografia

1. Green M, Webber SA. Posttransplant lymphoproliferative disorders. In: *Pediatric solid organ transplantation. Pediatric Clinics of North America*, Philadelphia, WB Saunders, USA, 2003.
2. Comoli P, Ginevri F. Monitoring and management of viral infections in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol* 2012;27:705-717.
3. Nalesnik MA, Jaffe R, Starzl TE et al. The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporin A-prednisone immunosuppression. *Am J Pathol* 1988;133:173-192.
4. Webber SA, Naftel DC, Fricker FJ et al. Lymphoproliferative disorders after paediatric heart transplantation: a multi-institutional study. *Lancet* 2006;367:233-239.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edition. *IARC Press*, Lyon, France, 2008.
6. Nalesnik MA, Randhawa P, Demetris AJ et al. Lymphoma resembling Hodgkin disease after posttransplant lymphoproliferative disorder in a liver transplant recipient. *Cancer* 1993;72:2568-2573.
7. Penn I. De novo malignancies in pediatric organ transplant recipients. *Pediatr Transplant* 1998;2:56-63.
8. Mäcker B, Jack T, Zimmermann M et al. CNS or bone marrow involvement as risk factors for poor survival in post-transplantation lymphoproliferative disorders in children after solid organ transplantation. *J Clin Oncol* 2007;25:4902-4908.
9. Ranganathan S, Webber S, Ahuja S et al. Hodgkin-like posttransplant lymphoproliferative disorder in children: does it differ from posttransplant Hodgkin lymphoma. *Pediatr Dev Pathol* 2004;7:348-360.
10. Douglas VK, Hunger SP. Hodgkin's lymphoma after post-transplant lymphoproliferative disease in a renal transplant recipient. *Pediatr Transplant* 2004;8:87-90.
11. Krishnamurthy S, Hassan A, Frater JL et al. Pathologic and clinical features of Hodgkin lymphoma-like posttransplant lymphoproliferative disease. *Int J Surg Pathol* 2010;18:278-285.
12. Comoli P, Labirio M, Basso S et al. Infusion of autologous EBV-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood* 2002;99:2592-2598.
13. Comoli P, Maccario R, Locatelli F et al. Treatment of EBV-related post-renal transplant lymphoproliferative disease with a tailored regimen including EBV-specific T cells. *Am J Transplant* 2005;5:1415-1422.
14. Baldanti F, Gatti M, Furione M et al. Kinetics of Epstein-Barr virus DNA load in different blood compartments of pediatric recipients of T-cell depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 2008;46:3672-3677.
15. Goyal RK, Mcevoy L, Wilson. Hodgkin disease after renal transplantation in childhood. *J Pediatr Hematol Oncol* 1996;18:392-395.
16. Bierman PJ, Vose JM, Langnas AN et al. Hodgkin's disease following solid organ transplantation. *Ann Oncol* 1996;7:265-270.

17. Gheorghe G, Albano EA, Porter CC et al. Posttransplant Hodgkin lymphoma preceded by polymorphic posttransplantlymphoproliferative disorder: report of a pediatric case and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29:112-116.
18. Majewski M, Korecka M, Kossev P et al. The immunosuppressive macrolide RAD inhibits growth of human Epstein-Barr virus transformed B lymphocytes in vitro and in vivo: a potential approach to prevention and treatment of post-transplantlymphoproliferative disorders. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000;97:4285-4290.
19. Evens AM, David KA, Helenowski I et al. Multicenter analysis of 80 solid organ transplantation recipients with post-transplantation lymphoproliferative disease: outcomes and prognostic factors in the modern era. *J Clin Oncol* 2010;28:1038-1046.