

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**Dottorato di ricerca in Fisiopatologia dell'Insufficienza Cardiaca
Ciclo XXIV**

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D1

Settore Scientifico disciplinare: MED/11

**EFFICACIA E SICUREZZA DELLA PROFILASSI
ANTI-CITOMEGALOVIRUS RISPETTO ALLA STRATEGIA
PRE-SINTOMATICA CON VALGANCICLOVIR IN PAZIENTI CON
TRAPIANTO DI CUORE TRATTATI CON EVEROLIMUS O
MICOFENOLATO**

Presentata da: Dott.ssa Teresa Ionico

Coordinatore Dottorato

Prof. Angelo Branzi

Relatore

Prof. Angelo Branzi

INDICE

INDICE	3
RIASSUNTO	4
INTRODUZIONE	6
SCOPO DELLO STUDIO.....	22
MATERIALI E METODI.....	23
RISULTATI.....	26
DISCUSSIONE	29
LIMITI DELLO STUDIO.....	32
BIBLIOGRAFIA	33
TABELLE E FIGURE.....	46

RIASSUNTO

INTRODUZIONE: il Cytomegalovirus (CMV) è l'agente patogeno più frequentemente responsabile di sindromi infettive dopo trapianto di cuore. La rilevanza del CMV dipende dal rischio di sviluppare sia sindromi cliniche organo specifiche legate alla tossicità diretta del virus, sia di favorire un danno immuno-mediato dell'organo trapiantato che può esprimersi come rigetto acuto o come malattia coronarica cronica (CAV). Sebbene i farmaci antivirali utilizzati in regime di profilassi appaiano superiori all'approccio pre-sintomatico nel ridurre gli eventi correlati al CMV, l'impatto dell'effetto anti-CMV dell'everolimus (EVE) in aggiunta alla profilassi antivirale non è stato a tutt'oggi ancora analizzato.

SCOPO DELLO STUDIO: analizzare l'interazione tra le strategie di profilassi antivirale anti CMV e l'uso di EVE o micofenolato (MMF) nell'incidenza di eventi CMV correlati (infezione subclinica, necessità di trattamento, malattia/sindrome infettiva) nei trapiantati di cuore de novo.

MATERIALI E METODI: sono stati inclusi nello studio i pazienti consecutivi sottoposti a trapianto di cuore, e sopravvissuti almeno 6 mesi dall'intervento, trattati con EVE o MMF, provenienti da due diversi centri italiani. Il trattamento antivirale di profilassi o pre-sintomatico è stato effettuato con valganciclovir per via orale o ganciclovir per via endovenosa. L'infezione da CMV è stata monitorata con antigenemia

pp65 e PCR DNA. L'insorgenza di malattia/sindrome infettiva da CMV è stato considerato l'endpoint principale.

RISULTATI: un totale di 193 pazienti (di cui 10% con mismatch sierologico, D+/R-) sono stati inclusi nello studio (42 in EVE e 149 in MMF). Nel complesso, l'infezione da CMV (45% vs. 79%), la necessità di trattamento antivirale (20% vs. 53%), la malattia/sindrome da CMV (2% vs. 15%) ed il picco di replicazione virale (4 vs. 27 pp65cells/20⁵) sono risultati significativamente più bassi nel gruppo EVE che nel gruppo MMF (tutte le P<0.01). La profilassi si è dimostrata più efficace nel prevenire tutti gli outcomes rispetto alla strategia pre-sintomatica nei pazienti in MMF (P 0.03), ma non nei pazienti in EVE. In particolare, i pazienti in EVE seguiti con strategia pre-sintomatica hanno mostrato meno infezioni da CMV (48 vs 70%; P=0.05), e meno malattia/sindrome da CMV (0 vs. 8%; P=0.05) rispetto ai pazienti in MMF riceventi la profilassi.

CONCLUSIONI: La terapia di immunosoppressione con EVE dimostra un impatto clinico rilevante su tutti gli eventi correlati al CMV rispetto al MMF. Il beneficio di una profilassi antivirale risulta conservato solo nei pazienti trattati con MMF mentre l'EVE sembra fornire un'ulteriore protezione nel ridurre gli eventi acuti da CMV senza la necessità di un estensivo trattamento con farmaci antivirali.

INTRODUZIONE

La sopravvivenza a breve termine dopo trapianto di cuore è notevolmente aumentata nel corso delle ultime tre decadi grazie all'evoluzione della terapia immunosoppressiva e al miglioramento della gestione perioperatoria. Tuttavia, la prognosi a lungo termine è ancora fortemente influenzata dalla disfunzione tardiva del graft secondaria alla vasculopatia cronica del graft (cardiac allograft vasculopathy, CAV)^[1]. Sebbene siano stati identificati nella patogenesi della CAV molti fattori di rischio di tipo immunologico, metabolico ed infettivo^[2], attualmente non esistono dei trattamenti specifici ed efficaci per tale patologia. Pertanto la strategia principale si basa sulla prevenzione e sul trattamento dei fattori di rischio capaci di innescare e/o accelerare lo sviluppo della CAV^[3]. Tra questi, il CMV sembra svolgere un ruolo chiave nello sviluppo della CAV^[4], tramite la sua complessa interazione con il sistema immunitario dell'ospite^[5].

Fisiopatologia della vasculopatia del graft (CAV)

La CAV è una patologia vascolare rapidamente progressiva che presenta un'estesa distribuzione lungo tutto l'albero coronarico. A differenza dell'aterosclerosi classica che interessa le coronarie native, essa si presenta raramente con placche aterosclerotiche focali a livello delle

arterie epicardiche mentre si caratterizza soprattutto per una diffusa sclerosi e restrizione del lume vascolare a livello dei rami periferici^[6]. Queste caratteristiche anatomopatologiche della CAV sono state osservate anche a livello della vascolatura di rene, fegato e polmone trapiantati ed affetti da rigetto cronico, suggerendo alla base un comune meccanismo di tipo autoimmune, indipendentemente dal tipo di organo trapiantato^[7-9].

A causa della denervazione del cuore trapiantato, i pazienti affetti da CAV sono tipicamente asintomatici fino a manifestare come prima presentazione morte improvvisa o scompenso cardiaco congestizio. Pertanto la diagnosi precoce, la prevenzione e la comprensione dei meccanismi fisiopatologici sottostanti è necessaria per riuscire ad impostare delle strategie terapeutiche tese a migliorare la prognosi.

Studi anatomopatologici indicano che le lesioni della CAV si caratterizzano per la presenza di infiammazione cronica perivascolare e diffusa proliferazione miointimale causata dalla migrazione di cellule muscolari lisce dalla tonaca media all'intima e dalla deposizione di matrice extracellulare, mantenendo intatta la lamina elastica interna, al contrario di ciò che avviene nella aterosclerosi classica^[10,11] (figura 1). Lo sviluppo di tali lesioni è graduale e la normale angiografia coronarica non è capace di identificare le fasi iniziali della malattia in considerazione della mancanza di stenosi focali. Al momento il gold standard per l'identificazione precoce della CAV è costituito dall'ecografia intravascolare (intravascular ultrasound, IVUS) che permette di quantificare lo spessore dell'iperplasia intimale (figura 2). La

presenza di danno vascolare inteso come spessore intimale massimo (maximal intimal thickness, MIT) > 0.5 mm durante il primo anno dal trapianto identifica un gruppo di pazienti ad alto rischio di morte cardiovascolare e rappresenta un endpoint prognostico surrogato per valutare il possibile beneficio di strategie di prevenzione della CAV^[12].

Il complesso processo che determina tali lesioni coinvolge prima di tutto dei meccanismi autoimmuni che agiscono nel contesto di una serie di fattori di rischio non immunologici (che includono alterazioni metaboliche e infezione da Cytomegalovirus)^[2]. E' da sottolineare che le lesioni della CAV si possono riscontrare su tutto l'albero vascolare coinvolgendo non solo le arterie coronarie ma anche le vene, sviluppandosi dal tratto iniziale dell'aorta ascendente fino alle ramificazioni intramiocardiche. L'importanza del danno immunomediato è sottolineata dal riscontro a livello anatomopatologico della brusca interruzione dell'iperplasia miointimale della radice aortica a livello della linea di sutura tra il graft e l'aorta nativa.

L'eziologia della CAV include una complessa interazione di fattori di rischio immunologici e non immunologici. Gli episodi di rigetto acuto, il danno ischemia/riperfusion, il mismatch HLA e l'infezione da Cytomegalovirus (CMV) sono implicati nell'iniziale sviluppo della CAV, mentre le alterazioni metaboliche sembrano giocare un ruolo maggiore nello sviluppo delle lesioni tardive^[13,14]. Indipendentemente dal trigger iniziale, i fattori di rischio della CAV conducono ad un comune percorso fisiopatologico che determina disfunzione endoteliale

vascolare, che può essere oggettivamente misurata e che spesso precede la comparsa delle lesioni morfologiche.

Correlazione tra infezione da CMV e sviluppo della CAV

Il CMV appartiene alla famiglia degli beta herpes virus ed è ampiamente presente in maniera latente nella popolazione generale, riscontrandosi nei monociti del sangue periferico del 50-90% degli individui.

L'associazione tra l'infezione da CMV e la CAV è stata per la prima volta riportata oltre venti anni fa, nell'era precedente all'utilizzo dei farmaci antivirali quali il ganciclovir^[15-17]. Questi primi studi ossevazionali sono stati condotti quando i metodi di identificazione dell'infezione da CMV erano poco sensibili, basandosi principalmente sulle manifestazioni cliniche della malattia e sulla conferma tramite sezioni istologiche o colture virali. Da queste prime osservazioni si è sviluppato il concetto che il CMV è capace non solo di causare una patologia sistemica o d'organo conseguente al danno virale diretto, ma è inoltre capace di indurre un'attivazione del sistema immunitario nei confronti del graft e determinare così indirettamente rigetto acuto e CAV ^[18-20].

Con lo sviluppo di strumenti diagnostici altamente sensibili per la ricerca del CMV, è stato possibile identificare un numero sempre maggiore di pazienti con infezione virale subclinica^[21,22].

Attualmente sono due le metodiche utilizzate per il monitoraggio dell'infezione da CMV, l'antigenemia pp65 e la PCR DNA.

L'antigenemia è un metodo immuno-citochimico basato sulla ricerca della proteina precoce di struttura pp65, considerata un marker di replicazione virale, direttamente nel nucleo dei polimorfonucleati isolati su sangue periferico e sottoposti a successiva incubazione con anticorpo monoclonale verso la proteina pp65 e visualizzazione mediante microscopio a fluorescenza. Il risultato viene espresso in numero di cellule fluorescenti x 200.000 PMN.

La reazione polimerasica a catena (PCR) è una tecnica di biologia molecolare che permette di identificare anche minime quantità di acido nucleico virale. E' un test altamente sensibile, specifico e rapido per l'identificazione della carica virale.

Il monitoraggio dell'attivazione asintomatica del CMV nel sangue periferico tramite queste metodiche ha permesso di stabilire che il rischio di malattia da CMV è proporzionale ai livelli di DNA virale^[23] e che anche le infezioni asintomatiche influiscono sulla prognosi del graft.

La prima correlazione tra infezione subclinica da CMV e prognosi è stata riportata in uno studio su oltre 400 trapiantati di rene^[24], nel quale Sagedal et al. hanno dimostrato che, in assenza di strategie antivirali sia di profilassi che di pre-emptive, l'infezione da CMV a livello subclinico identificata tramite l'antigenemia pp65 era associata ad un aumentato rischio di morte totale e cardiovascolare. L'incremento di mortalità era intermedio tra quello osservato in pazienti con manifestazioni cliniche dell'infezione da CMV (a prognosi peggiore) e pazienti senza alcuna infezione da CMV (a prognosi migliore). Gli stessi autori hanno anche dimostrato che l'infezione subclinica da CMV nei primi 100 giorni dopo

il trapianto aumentava il rischio di successivi rigetti^[25]. Dati simili sono stati riportati nel trapianto di cuore da parte di un gruppo di ricercatori della Università della California di Los Angeles. In un gruppo di pazienti sottoposti a trapianto di cuore tra il 1994 e il 2008, quelli con un'infezione da CMV asintomatica e non trattata sviluppavano una CAV nella stessa percentuale dei pazienti con infezione sintomatica, ed entrambi i gruppi in un percentuale molto più elevata a 5 anni dal trapianto rispetto al gruppo senza infezione. Inoltre, la sopravvivenza a 5 anni era più bassa in entrambi i gruppi CMV positivi rispetto al gruppo di controllo^[26].

Come verrà discusso in maggior dettaglio più avanti, la prevenzione della malattia da CMV si basa su due principali strategie: la profilassi, che prevede il trattamento con farmaci antivirali di tutti i pazienti “ a rischio” per un determinato periodo di tempo (storicamente 1 mese, attualmente dai 3 ai 6 mesi), e la strategia pre-sintomatica, che prevede la somministrazione di farmaci antivirali solo a quei pazienti che raggiungono un certo livello di replicazione virale nel sangue^[27]. Pertanto i pazienti gestiti con strategia pre-sintomatica sviluppano livelli significativamente più elevati di replicazione subclinica del CMV rispetto a quelli gestiti con strategia di profilassi. Questi due approcci hanno permesso di confrontare la prognosi con riferimento all'infezione asintomatica^[28].

Nei trapiantati di cuore gestiti con strategia pre-sintomatica è stato dimostrato che l'infezione asintomatica da CMV si associa ad un

aumentato rischio di sviluppare una CAV definita come rimodellamento coronarico restrittivo e riduzione del lume ad un anno dal trapianto^[29].

L' infezione asintomatica è frequente anche nei pazienti profilassati, come documentato in uno studio prospettico che ha arruolato pazienti trattati con profilassi con ganciclovir, in più del 90% dei quali è stata documentata un' infezione attiva mediante metodica con PCR. Nella maggioranza dei pazienti che sviluppano l' infezione (80%), il CMV è rilevato solo dopo l' interruzione della profilassi, sollevando la questione dell' importanza della durata e del tipo di profilassi. Per rispondere a tale questione, è stata comparata la prognosi di pazienti sottoposti al regime standard con ganciclovir per via endovenosa per 28 giorni con pazienti D+/R- che hanno ricevuto un trattamento più aggressivo consistente in 3 mesi di (val)ganciclovir e siero iperimmune verso il CMV (CMVIG)^[30]. Nonostante fossero a rischio più elevato di attivazione del CMV a causa del mismatch sierologico, i riceventi trattati con il trattamento aggressivo hanno mostrato una percentuale di infezione ridotta e una comparsa ritardata, e ancor più significativo, un ridotto rischio di rigetto acuto e CAV, in confronto ai pazienti trattati con il regime standard.

Più di recente, perseguendo l' ipotesi che la riduzione delle infezioni asintomatiche tramite una aggressiva strategia anti-CMV potesse ridurre lo sviluppo della CAV nei riceventi CMV positivi, è stata comparata la prognosi di pazienti gestiti con una strategia pre-emptive con un gruppo di pazienti consecutivi trattati per 40 giorni con valganciclovir, e successivamente monitorati ed eventualmente trattati in caso di

positivizzazione del CMV (> 30 pp65 cellule per 10^5 polimorfonucleati). In questo studio, il trattamento aggressivo ha determinato una minore intensità e un ritardo nella comparsa dell' infezione da CMV. In particolare, la strategia di profilassi è stata associata ad un minore incremento nel MIT ad un anno dal trapianto (figura 3)^[28].

Nel loro insieme questi studi supportano il concetto che il CMV ha un ruolo attivo nella fisiopatologia della CAV, e che il danno cronico del graft può svilupparsi anche in assenza di manifestazioni cliniche della malattia.

Meccanismi fisiopatologici del danno mediato dal CMV

Il CMV attua una complessa interazione con il sistema immunitario del ricevente che, in condizioni di immunosoppressione iatrogena, può promuovere uno stato locale infiammatorio, la rottura di meccanismi di tolleranza ed esercitare effetti immunosoppressivi^[31]. Queste conseguenze dell' infezione da CMV influenzano direttamente la risposta immune del paziente trapiantato e possono spiegare la patogenesi della CAV CMV-indotta.

CMV e meccanismi infiammatori

L' interazione del CMV con la risposta infiammatoria dell' ospite è alla base della replicazione virale e dell' infezione attiva. Gli elementi istologici della risposta infiammatoria locale furono riportati da Koskinen et al che per primo descrisse i segni di "endotelite" nei campioni di biopsie di pazienti con infezione da CMV^[18,32]. Il meccanismo principale attraverso il quale il CMV è capace di attivare la risposta infiammatoria è l' attivazione del fattore nucleare κB (NF-κB). Questo fattore di trascrizione è implicato nella regolazione di molti geni per citochine infiammatorie e molecole di adesione. Per l' attivazione della risposta infiammatoria non è necessario l' ingresso del virus all' interno della cellula, ma è sufficiente l' interazione della glicoproteina B, una proteina dell' envelope, con i recettori toll-like dell' ospite^[34,35]. L' interazione virus-cellula permette l' attivazione del NF-κB, che è necessaria per iniziare la trascrizione del CMV^[33,34]. Inoltre l' attivazione del NF-κB da parte di stimoli immuno-infiammatori (ad esempio infezioni o risposte alloimmuni) contribuiscono all' attivazione del CMV nelle cellule che albergano un' infezione latente, inclusi i monociti che si differenziano in macrofagi^[36]. In particolare, l' inibizione farmacologica del NF-κB può ridurre la replicazione virale nelle cellule endoteliali in vitro^[37]. Le citochine e le chemochine indotte dal CMV e rilasciate nel corso della risposta immunitaria attivano le cellule endoteliali determinando una sovraespressione di molecole di adesione, delle proteine MHC di classe II e un' ulteriore produzione di citochine che esacerba l' infiammazione del graft^[38-42]. In aggiunta a stimolare la

sintesi di mediatori infiammatori da parte delle cellule dell'ospite, il CMV codifica anche per chemochine e citochine omologhe^[43]. Si suppone che quest'ultime favoriscano la diffusione virale inducendo la migrazione e la proliferazione cellulare. Particolare importanza è stata attribuita al gene virale US28 che codifica per una proteina che si lega ad un recettore per le chemochine omologo che induce la proliferazione delle cellule muscolari lisce^[44].

Va sottolineato, comunque, che questi meccanismi infiammatori CMV-dipendenti richiedono la risposta allogenica per accelerare il rigetto del graft, come dimostrato da animali con infezione da CMV che ricevono un trapianto singenico e che non sviluppano la malattia. Pertanto l'interazione tra CMV e sistema immunitario dell'ospite risulta essere un fattore cruciale per il danno del graft^[45].

CMV e disfunzione endoteliale

Un effetto diretto dell'attivazione dei mediatori infiammatori a livello del sistema vascolare del graft è la ridotta sintesi di ossido nitrico (NO) da parte dell'endotelio, che diventa rapidamente disfunzionale con la compromissione della vasodilatazione NO mediata^[46]. La disfunzione endoteliale è un meccanismo che precede ed è associato alla aterosclerosi sistemica e del graft^[47,48]. Da sottolineare che nei pazienti trapiantati di cuore l'infezione da CMV è stata correlata sia alla disfunzione endoteliale a livello delle arterie coronariche del graft che a livello della vascolatura sistemica^[49]. Un possibile processo coinvolto nell

' induzione della disfunzione endoteliale da CMV prevede la partecipazione della ADMA (asymmetric dimethylarginine)^[50,51]. L' ADMA è un inibitore endogeno della sintesi di NO che aumenta in condizioni di stress ossidativo intracellulare e amplifica la rottura dell' omeostasi endoteliale e può quindi essere considerato come un marker sistemico dell' alterata funzione endoteliale^[46,52,53]. L' infezione da CMV è capace di incrementare l' ADMA in colture di cellule endoteliali, e pazienti con DNA virale nel sangue periferico presentano più elevate concentrazioni plasmatiche di ADMA e sono più predisposti allo sviluppo della CAV rispetto ai pazienti CMV negativi^[50,51].

CMV e sistema immunitario dell' ospite

Tra gli effetti del CMV nel potenziare la risposta immunitaria dell'ospite nei confronti del graft, di particolare interesse è l'effetto negativo sulla tolleranza al graft, che è stato elegantemente studiato da Cook et al^[54] in un recente lavoro. In un modello murino di cuore trapiantato nel quale la tolleranza è stata raggiunta con trattamento con gallio nitrato, i riceventi con infezione latente da CMV non solo riattivavano l'infezione, ma sviluppavano rigetto acuto portando ad un 80% di perdita del graft, al contrario dell'8% nei pazienti CMV negativi.

Il CMV esegue inoltre dei meccanismi volti a sfuggire al sistema immunitario dell'ospite che, paradossalmente, possono essere coinvolti nel rigetto acuto e nella patogenesi della CAV. In particolare, la mancanza di una immunità cellulare CMV specifica in pazienti sieropositivi sembra favorire una più precoce comparsa ed intensità

dell'infezione^[55-57]. Inoltre i riceventi che presentano una ritardata immunità CMV specifica hanno anche un'aumentata incidenza di rigetto acuto e una più accelerata progressione della CAV identificata all'IVUS, rispetto a quelli con una precoce immunità CMV specifica^[55]. Questi dati suggeriscono che l'immunità CMV specifica svolge un ruolo protettivo nel preservare la funzione del graft, e non induce reazioni di cross reattività. E' quindi possibile speculare che la mancata attivazione di linfociti CD4 sia la conseguenza di una strategia vincente del CMV di sfuggire al sistema immunitario e favorire indirettamente il danno del graft.

Strategie di trattamento e prevenzione dell'infezione da CMV

Sono due le strategie comunemente raccomandate per la prevenzione dell'infezione e della malattia da CMV: la terapia di profilassi e la strategia pre-sintomatica^[27,58]. La profilassi abolisce pressoché del tutto la replicazione virale durante le prime settimane/mesi dal trapianto, quando lo stato di immunosoppressione è più elevato, ritardando pertanto l'eventuale comparsa dell'infezione ad una fase più avanzata in cui lo stato immunosoppressivo e il rischio di rigetto si prevedono minori. Al contrario della profilassi, la strategia pre-sintomatica permette un precoce e basso grado di replicazione virale nell'aspettativa che ciò possa stimolare il sistema immunitario del ricevente contro il virus e ridurre la quantità di pazienti che necessitano di farmaci antivirali^[59]. Mentre le attuali linee guida suggeriscono che entrambe le strategie sono efficaci nella prevenzione della malattia da CMV nei pazienti

sieropositivi^[27], la profilassi è superiore nel limitare la replicazione virale asintomatica. La scelta se limitare o meno la replicazione virale asintomatica è un punto chiave nella scelta della strategia terapeutica ottimale. Sempre maggiori evidenze supportano i benefici in termini di prognosi delle strategie volte a sopprimere e prevenire anche la replicazione asintomatica del CMV.

Ampie metanalisi di studi randomizzati che hanno valutato l'effetto delle strategie di profilassi e pre-sintomatica in riceventi di organi solidi, hanno documentato che mentre entrambe le strategie risultano efficaci nel prevenire la malattia da CMV, la profilassi si associava ad una maggiore sopravvivenza e minori episodi di rigetto, rispetto al placebo^[60,61]. Sebbene vada notato che la piccola numerosità degli studi sulla strategia pre-sintomatica possa averne mascherato l'efficacia a lungo termine, due recenti analisi di studi randomizzati sui trapiantati di rene suggeriscono una maggiore sopravvivenza nei pazienti riceventi la profilassi rispetto a coloro seguiti con un approccio pre-sintomatico^[62,63]. Nei trapiantati di cuore, ma con un disegno di studio non randomizzato, gli approcci aggressivi (basati o su un prolungato regime di profilassi con (val)ganciclovir e CMV Ig, o sulla profilassi con valganciclovir seguita da monitoraggio del CMV e eventuale trattamento aggiuntivo) sono stati associati ad una minore progressione della CAV come evidenziato dal rimodellamento vascolare^[30] e dall'iperplasia intimale all'IVUS^[28].

Oltre ai farmaci antivirali, nuove strategie per limitare l'impatto dell'infezione da CMV sulla funzione del graft riguardano l'effetto antivirale degli inibitori del target nei mammiferi della rapamicina (mTOR), quali il sirolimus e l'everolimus. Questi due farmaci, approvati per la prevenzione del rigetto acuto, hanno dimostrato di ridurre l'infezione da CMV nei riceventi di organi solidi rispetto al tacrolimus o al micofenolato^[64-67]. Soprattutto, entrambi i farmaci riducono la progressione della CAV, come dimostrato dalle misurazioni IVUS dell'iperplasia intimale coronarica^[68,69].

L'effetto anti-CMV degli inibitori del mTOR non dipende da un effetto diretto sulle proteine del CMV, come per il ganciclovir e gli altri antivirali, ma da un effetto indiretto sulla inibizione della proliferazione cellulare. Inoltre, l'inibizione di mTOR sembrerebbe favorire il reclutamento di cellule T memoria^[70-72], che potrebbe essere cruciale nella ricostituzione del sistema immunitario contro il CMV dopo il trapianto.

Diversi studi hanno indagato il ruolo protettivo dell'immunità cellulare specifica anti CMV nella prevenzione dell'infezione virale^[55,57,73]. Indipendentemente dai trattamenti antivirali e di induzione, una precoce ricostituzione dell'immunità cellulare specifica protegge non solo dall'infezione da CMV e dalla necessità di trattamenti, ma anche dal rigetto acuto e dallo sviluppo della CAV. Questi dati suggeriscono l'ipotesi che interventi volti ad aumentare l'immunità specifica anti CMV (ad es. lo sviluppo di un vaccino) possano rappresentare un'ulteriore strategia di prevenzione per l'infezione da CMV e la CAV. Il ruolo specifico della terapia immunosoppressiva con mTOR nel

modulare l'immunità cellulare anti CMV dopo trapianto di cuore è al momento in studio e potrebbe fornire nuove conoscenze sui meccanismi di immunomodolazione che interagiscono con l'attività del CMV.

Oltre al ruolo chiave giocato dall'immunità cellulare, anche la modulazione dell'immunità umorale è di notevole importanza nella prevenzione del danno CMV mediato. E' stato dimostrato che la terapia di associazione con ganciclovir e siero iperimmune (CMV Ig) è superiore alla terapia con solo ganciclovir nella prevenzione del rigetto acuto e della CAV^[74-76]. Sebbene non si possa escludere che la differente durata della profilassi sia un elemento ancora più importante, c'è comunque un'evidenza che il siero iperimmune può fornire un ulteriore beneficio in termini di immunomodolazione della risposta dell'ospite, riducendo quindi il rischio sia di rigetto che di malattia acuta da CMV^[77,78].

Nell'insieme questi studi sottolineano il concetto che il trattamento aggressivo della infezione subclinica da CMV, tramite profilassi con agenti antivirali, ricostituzione del sistema immunitario e selezione di regimi immunosoppressivi di mantenimento, possa efficacemente proteggere la funzione a lungo termine del graft.

Sono pertanto necessari studi clinici randomizzati specificatamente disegnati per confermare i dati osservazionali circa i benefici di un'aggressiva strategia anti CMV, basata sulla scelta dei farmaci antivirali ed immunosoppressori, e per verificare se tali attesi benefici controbilancino i costi e la tossicità dei farmaci.

SCOPO DELLO STUDIO

Dai dati disponibili in letteratura è noto che una strategia di profilassi antivirale si associa ad una minore insorgenza di infezione subclinica da CMV, e quindi ad un minore sviluppo della CAV e ad una migliore prognosi.

Le nuove evidenze circa l'effetto antivirale degli inibitori del mTOR apre una nuova possibilità di strategia di prevenzione dell'infezione da CMV. Tuttavia l'impatto dell'effetto antivirale dell'everolimus sulla profilassi antivirale non è stato a tutt'oggi analizzato.

In questa analisi retrospettiva abbiamo analizzato l'interazione tra la terapia antivirale e l'uso di everolimus (EVE) o micofenolato mofetile (MMF) sulle infezioni da CMV nei trapiantati di cuore de novo.

MATERIALI E METODI

I dati dello studio provengono da un registro di pazienti sottoposti a trapianto di cuore in due centri italiani (Bologna, Padova).

Sono stati utilizzati per l'analisi i dati di pazienti consecutivi trapiantati tra il 2005 ed il 2010, con un follow-up di almeno sei mesi dal trapianto, ed in terapia immunosoppressiva con EVE o MMF.

I pazienti trattati con EVE hanno ricevuto una doppia somministrazione giornaliera del farmaco (dosaggi da 0,25/0,5/0,75/1 mg) in modo da mantenere livelli ematici tra 3 e 8 ng/ml. I pazienti trattati con MMF hanno ricevuto il dosaggio massimale di 1500 mg in doppia somministrazione giornaliera monitorando la conta leucocitaria (riduzione della dose in caso di leucopenia).

In associazione a EVE o MMF, il regime immunosoppressivo è consistito in: ciclosporina al dosaggio di mantenimento di 2-6 mg/kg in doppia somministrazione giornaliera in modo da ottenere i livelli ematici illustrati nella Tabella I; corticosteroidi (prednisone) al dosaggio di mantenimento di 0,2 mg/kg da scalare a 0,05 mg/Kg nel corso del primo anno dal trapianto.

Per quanto riguarda la terapia antivirale, i pazienti gestiti con la strategia di profilassi hanno ricevuto valganciclovir per via orale, a partire dalla prima settimana dopo il trapianto, al dosaggio di 450 mg in doppia somministrazione giornaliera, adeguando il dosaggio alla funzionalità renale, se ben tollerato per 40 giorni. I pazienti positivi al CMV per

antigenemia pp65 o metodica PCR dopo questo periodo di profilassi, hanno ricevuto un ulteriore trattamento con valganciclovir al dosaggio di 900 mg in doppia somministrazione giornaliera (o ganciclovir per via endovenosa al dosaggio di 3-5 mg/kg due volte al giorno nel caso fossero presenti anche i sintomi di una malattia/sindrome da CMV) fino ad 1 settimana dopo la prima determinazione negativa dell'antigenemia o della PCR.

I pazienti gestiti con la strategia pre-sintomatica hanno ricevuto valganciclovir 900 mg in doppia somministrazione giornaliera o ganciclovir 3-5 mg/kg per via endovenosa due volte al giorno (quando associati sintomi di malattia/sindrome da CMV) in caso di antigenemia pp65 di almeno 20 cellule x 10⁵ neutrofilo polimorfonucleati o DNA PCR > 20.000 genomi, in caso di aumento progressivo e continuo dei valori di antigenemia o in caso di sintomi suggestivi per infezione da CMV associati a qualsiasi positività di antigenemia o DNA PCR. Il trattamento è stato continuato fino ad 1 settimana dopo la prima determinazione negativa dell' antigenemia o DNA PCR < 20.000 genomi.

La sierologia per CMV di donatore e ricevente è stata acquisita al baseline. Le informazioni prospettiche sugli eventi da CMV sono state ricavate dalle cartelle cliniche e da database elettronici contenenti i dati specifici sul CMV e le segnalazioni di eventi avversi.

La sieropositività al CMV è stata confermata mediante dosaggio dell'antigenemia pp65 o mediante PCR in accordo ai protocolli locali.

La sindrome da CMV è stata definita dalla presenza di febbre elevata prolungata, astenia, malessere generale, anoressia, artralgie e mialgie in associazione a leucopenia e neutropenia dovute alla mielosoppressione;

la malattia da CMV è stata definita come un disturbo sistemico associato a coinvolgimento d'organo (nefrite, epatite, miocardite, polmonite, pancreatite, colite e/o gastrite, retinite).

RISULTATI

1. Popolazione arruolata nello studio

Sono stati arruolati nello studio un totale di 193 pazienti, tra i 12 ed i 68 anni, suddivisi in 4 gruppi di trattamento: EVE/profilassi n=18; EVE/pre-emptive n=24; MMF/profilassi n=75; MMF/pre-emptive n=76. I diversi gruppi sono risultati omogenei per quanto riguarda le principali caratteristiche dei pazienti (età, sesso, causa dello scompenso cardiaco end-stage, tempo di ischemia dell'organo). Anche le combinazioni donatore/ricevente riguardanti la sierologia per il CMV sono risultate simili tra i vari gruppi. Nella maggioranza dei casi sia donatore che ricevente risultavano positivi per il CMV (D+/R+), mentre in ciascuno gruppo circa un 10% dei pazienti risultava essere ad alto rischio in quanto ricevente negativo con organo CMV positivo (D+/R-).

2. Incidenza di eventi

Rigetto miocardico

L'incidenza di rigetto miocardico documentato tramite biopsia è risultato sovrapponibile nei pazienti riceventi EVE (24%) o MMF (41%) (p 0.57).

Confronto tra EVE e MMF

Nel complesso, confrontando il gruppo in trattamento con EVE e il gruppo in trattamento con MMF, indipendentemente dalla strategia di

profilassi antivirale, si è osservata una incidenza significativamente minore di tutti gli eventi correlati al CMV nel gruppo EVE.

Il tempo medio della prima infezione da CMV è stato di 160 giorni (DS \pm 149) nel gruppo EVE, e 158 giorni (DS \pm 143) nel gruppo MMF.

L'infezione da CMV è risultata del 45% nel gruppo EVE vs. il 79% nel gruppo MMF ($p < 0.01$). La necessità di trattamento antivirale è risultata del 20% nel gruppo EVE vs. il 53% del gruppo MMF ($p < 0.01$). La malattia/sindrome da CMV è risultata del 2% nel gruppo EVE vs. 15% del gruppo MMF ($p 0.04$).

Confronto tra Profilassi e Pre-emptive nei 2 gruppi di trattamento

Andando a valutare l'interazione tra il trattamento antivirale e quello immunosoppressivo, la profilassi si è dimostrata più efficace nel prevenire tutti gli outcomes rispetto alla strategia pre-emptive nei pazienti in MMF, ma non nei pazienti in EVE.

Nel gruppo EVE non c'è stata una differenza tra la strategia di profilassi e la pre-emptive riguardo ai pazienti liberi da eventi CMV correlati (infezione, necessità di trattamento, sindrome/malattia) ($P= n.s.$).

Al contrario nel gruppo MMF si è osservata una significativa differenza per tutti gli outcomes. La percentuale di pazienti liberi da infezione da CMV è risultata essere del 32% nei pazienti in profilassi vs il 12% dei pazienti in pre-emptive ($p < 0.01$), mentre la percentuale di pazienti liberi da sindrome/malattia da CMV è risultata essere del 90% nei pazienti in profilassi vs il 78% dei pazienti in pre-emptive ($p 0.02$).

Confronto tra strategia EVE pre-sintomatica vs MMF profilassi

I pazienti in EVE seguiti con strategia pre-sintomatica hanno mostrato meno infezioni da CMV (48 vs 70%; p 0.05), e meno malattia/sindrome da CMV (0 vs. 8%; p 0.05) rispetto ai pazienti in MMF riceventi la profilassi.

DISCUSSIONE

Il Cytomegalovirus (CMV) rappresenta l'agente patogeno di maggiore rilevanza clinica nei pazienti trapiantati di cuore. La sua riattivazione in uno stato di immunosoppressione determina non solo un danno virale diretto a livello dei singoli organi e a livello sistemico (definito come malattia/sindrome da CMV) ma anche un effetto indiretto tramite le complesse interazioni con il sistema immunitario dell'ospite e i meccanismi della risposta infiammatoria. Tramite questi ultimi meccanismi il CMV svolge un ruolo determinante nello sviluppo della CAV e nell'insorgenza di rigetto acuto, condizionando così pesantemente la prognosi a lungo termine del cuore trapiantato. Numerosi lavori clinici e anatomopatologici hanno documentato la correlazione tra l'infezione da CMV e l'insorgenza e la progressione della CAV. Inoltre è stato dimostrato che non solo la malattia da CMV ma anche gli episodi di infezione subclinica e un elevato tasso di replicazione virale si associano allo sviluppo della CAV e ad una prognosi peggiore. La profilassi antivirale si è dimostrata più efficace nel ridurre le infezioni subcliniche e nel ritardare lo sviluppo della CAV rispetto alla strategia pre-sintomatica, determinando un aumento della sopravvivenza e una riduzione degli episodi di rigetto.

Nuovi scenari per la prevenzione dell'infezione da CMV si aprono con gli inibitori del target nei mammiferi della ripamicina (mTOR), quali il sirolimus e l'everolimus. Questi due farmaci, approvati per la

prevenzione del rigetto acuto, hanno dimostrato di ridurre l'infezione da CMV nei riceventi di organi solidi rispetto al tacrolimus o al micofenolato. Soprattutto, entrambi i farmaci riducono la progressione della CAV. L'effetto anti-CMV degli inibitori del mTOR non dipende da un effetto diretto sulle proteine del CMV, come per il ganciclovir e gli altri antivirali, ma da un effetto indiretto sulla inibizione della proliferazione cellulare. Inoltre, l'inibizione di mTOR sembrerebbe favorire il reclutamento di cellule T memoria, che potrebbe essere cruciale nella ricostituzione del sistema immunitario contro il CMV dopo il trapianto. La capacità degli inibitori di mTOR di limitare l'infezione da CMV sembrerebbe addirittura superare l'effetto protettivo della profilassi con valganciclovir come dimostrato in questo studio osservazionale. L'analisi ha incluso pazienti che hanno ricevuto un trapianto di cuore e sono stati sottoposti a diversi regimi di immunosoppressione e terapia antivirale in vigore presso il nostro Centro. Il gruppo in trattamento con EVE ha sviluppato meno infezione e malattia/sindrome da CMV rispetto al gruppo in MMF. Ma soprattutto, la profilassi si è dimostrata più efficace dell'approccio pre-sintomatico nel ridurre le infezioni da CMV solo nel gruppo in MMF, mentre i pazienti del gruppo EVE avevano un'incidenza così bassa di eventi da non rendere più evidente il vantaggio della profilassi sulla pre-emptive (Figure 4). Pertanto l'utilizzo degli inibitori di mTOR potrebbe rappresentare un efficace approccio per minimizzare il rischio di riattivazione del CMV e di progressione della CAV, riducendo nel contempo la necessità di utilizzare farmaci antivirali. Da questo concetto scaturisce un'implicazione clinica diretta per tentare di personalizzare

l'approccio anti-CMV in base al regime di immunosoppressione scelto: mentre nel trattamento con MMF appare consigliabile un periodo di profilassi di 3 mesi in modo da ottenere un'adequata soppressione delle infezioni subcliniche precoci, invece in un regime di trattamento con EVE un approccio pre-sintomatico potrebbe essere sufficiente per ottenere un equilibrio tra il potenziale effetto tossico dei farmaci antivirali e una efficace riduzione delle infezioni cliniche e subcliniche da CMV.

LIMITI DELLO STUDIO

Il limite di questo studio è rappresentato dal fatto che si tratta di una analisi di tipo osservazionale, retrospettiva. Pertanto l'assegnazione ad un determinato tipo di trattamento immunosoppressivo o antivirale è stata relegata al giudizio clinico così come la concomitante presenza di insufficienza renale nell'immediato post-trapianto può aver limitato l'utilizzo di EVE.

Sono pertanto necessari studi clinici randomizzati che permettano di confrontare i vari regimi di trattamento immunosoppressivo e le loro interazioni con le strategie di trattamento antivirale.

BIBLIOGRAFIA

1. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Waltz DA, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report--2006. *J Heart Lung Transplant* 2006;**25**(8):869-79.
2. Valantine HA. Cardiac allograft vasculopathy: central role of endothelial injury leading to transplant "atheroma". *Transplantation* 2003;**76**(6):891-9.
3. Mehra M. Contemporary concepts in prevention and treatment of cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant* 2006;**6**(6):1248-56.
4. Potena L, Valantine HA. Cytomegalovirus-associated allograft rejection in heart transplant patients. *Curr Opin Infect Dis* 2007;**20**(4):425-31.
5. Abate D, Watanabe S, Mocarski E. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol* 2004;**78**(20):10995-1006.
6. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res* 2006;**99**(8):801-15.
7. Tufveson G, Johnsson C. Chronic allograft dysfunction--chronic rejection revisited. *Transplantation* 2000;**70**(3):411-2.
8. Blakolmer K, Jain A, Ruppert K, Gray E, Duquesnoy R, Murase N, Starzl TE, Fung JJ, Demetris AJ. Chronic liver allograft rejection in a

population treated primarily with tacrolimus as baseline immunosuppression: long-term follow-up and evaluation of features for histopathological staging. *Transplantation* 2000;**69**(11):2330-6.

9. Girgis RE, Tu I, Berry GJ, Reichenspurner H, Valentine VG, Conte JV, Ting A, Johnstone I, Miller J, Robbins RC, Reitz BA, Theodore J. Risk factors for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1996;**15**(12):1200-8.

10. Billingham M. Histopathology of graft coronary disease. *J Heart Lung Transplant* 1992;**11**:s38-s44.

11. Hosenpud JD, Shipley GD, Wagner CR. Cardiac allograft vasculopathy: current concepts, recent developments, and future directions. *J Heart Lung Transplant* 1992;**11**(1 Pt 1):9-23.

12. Kobashigawa JA, Tobis JM, Starling RC, Tuzcu EM, Smith AL, Valentine HA, Yeung AC, Mehra MR, Anzai H, Oeser BT, Abeywickrama KH, Murphy J, Cretin N. Multicenter intravascular ultrasound validation study among heart transplant recipients: outcomes after five years. *J Am Coll Cardiol* 2005;**45**(9):1532-7.

13. Hauptman P, Davis S, Miller L, Yeung A. The role of nonimmune risk factors in the development and progression of graft arteriosclerosis: preliminary insights from a multicenter intravascular ultrasound study. *J Heart Lung Transplant* 1995;**14**:s238-42.

14. Caforio AL, Tona F, Fortina AB, Angelini A, Piaserico S, Gambino A, Feltrin G, Ramondo A, Valente M, Iliceto S, Thiene G, Gerosa G. Immune and nonimmune predictors of cardiac allograft vasculopathy onset and severity: multivariate risk factor analysis and role of immunosuppression. *Am J Transplant* 2004;**4**(6):962-70.

-
15. Grattan M, Moreno-Cabral C, Starnes V, Oyer P, Stinson E, Shumway N. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA* 1989;**261**:3561-66.
 16. Loebe M, Schuler S, Zais O, Warnecke H, Fleck E, Hetzer R. Role of cytomegalovirus infection in the development of coronary artery disease in the transplanted heart. *J Heart Lung Transplant* 1990;**9**:707-11.
 17. Mc Donald K, Rector S, Braunlin E, Kubo S, Olivari M. Association of coronary artery disease in cardiac transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Am J Cardiol* 1989;**64**:359-62.
 18. Koskinen P, Lemstrom K, Bruggeman C, Lautenschlager I, Hayry P. Acute cytomegalovirus infection induces a subendothelial inflammation (endothelialitis) in the allograft vascular wall. *Am J Pathol* 1994;**144**(1):41-50.
 19. Lemstrom K, Sihvola R, Bruggeman C, Hayry P, Koskinen P. Cytomegalovirus infection-enhanced cardiac allograft vasculopathy is abolished by DHPG prophylaxis in the rat. *Circulation* 1997;**95**(12):2614-6.
 20. Streblow DN, Kreklywich C, Yin Q, De La Melena VT, Corless CL, Smith PA, Brakebill C, Cook JW, Vink C, Bruggeman CA, Nelson JA, Orloff SL. Cytomegalovirus-mediated upregulation of chemokine expression correlates with the acceleration of chronic rejection in rat heart transplants. *J Virol* 2003;**77**(3):2182-94.
 21. Gerna G, Percivalle E, Baldanti F, Sarasini A, Zavattoni M, Furione M, Torsellini M, Revello M. Diagnostic significance and clinical impact of quantitative assays for diagnosis of human cytomegalovirus

infection/disease in immunocompromised patients. *New Microbiol* 1998;**21**:293-308.

22. Boeckh M, Huang M, Ferrenberg J, Stevens-Ayers T, Stensland L, Nichols W, Corey L. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;**42**(3):1142-8.

23. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000;**355**(9220):2032-6.

24. Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, Osnes K, Leivestad T, Foss A, Degre M, Fauchald P, Rollag H. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* 2004;**66**(1):329-37.

25. Sageda S, Nordal KP, Hartmann A, Sund S, Scott H, Degre M, Foss A, Leivestad T, Osnes K, Fauchald P, Rollag H. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2002;**2**(9):850-6.

26. Patel J, Kittleson M, Kubak B, Kawano M, Davis S, Moriguchi J, Ardehali A, Kobashigawa J. Asymptomatic Positive CMV Serology Is Associated with Increased Risk for the Development of Transplant Coronary Artery Disease (TCAD): Who Needs Symptoms? *J Heart Lung Transplant* 2010;**29**(2S):s124.

27. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR, Allen U, Humar A. International consensus guidelines on the

management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010;**89**(7):779-95.

28. Potena L, Grigioni F, Magnani G, Lazzarotto T, Musuraca AC, Ortolani P, Coccolo F, Fallani F, Russo A, Branzi A. Prophylaxis versus preemptive anti-cytomegalovirus approach for prevention of allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2009;**28**(5):461-7.

29. Potena L, Grigioni F, Ortolani P, Magnani G, Marrozzini C, Falchetti E, Barbieri A, Bacchi-Reggiani L, Lazzarotto T, Marzocchi A, Magelli C, Landini MP, Branzi A. Relevance of cytomegalovirus infection and coronary-artery remodeling in the first year after heart transplantation: a prospective three-dimensional intravascular ultrasound study. *Transplantation* 2003;**75**(6):839-43.

30. Potena L, Holweg CT, Chin C, Luikart H, Weisshaar D, Narasimhan B, Fearon WF, Lewis DB, Cooke JP, Mocarski ES, Valentine HA. Acute rejection and cardiac allograft vascular disease is reduced by suppression of subclinical cytomegalovirus infection. *Transplantation* 2006;**82**(3):398-405.

31. Mocarski ES, Jr. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol* 2002;**10**(7):332-9.

32. Koskinen P, Krogerus L, Nieminen M, Mattila S, Hayry P, Lautenschlager I. Quantitation of Cytomegalovirus infection-associated histologic findings in endomyocardial biopsies of heart allografts. *J Heart Lung Transplant* 1993;**12**:343-54.

-
33. Kowalik T, Wing B, Haskill J, Azizkhan J, Baldwin A, Huang E. Multiple mechanisms are implicated in the regulation of NF- κ B activity during human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci* 1992;**90**:1107-11.
34. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003;**77**(8):4588-96.
35. Stassen FR, Vega-Cordova X, Vliegen I, Bruggeman CA. Immune activation following cytomegalovirus infection: more important than direct viral effects in cardiovascular disease? *J Clin Virol* 2006;**35**(3):349-53.
36. Laegreid A, Medvedev A, Nonstad U, Bombara MP, Ranges G, Sundan A, Espevik T. Tumor necrosis factor receptor p75 mediates cell-specific activation of nuclear factor kappa B and induction of human cytomegalovirus enhancer. *J Biol Chem* 1994;**269**(10):7785-91.
37. Potena L, Frascaroli G, Grigioni F, Lazzarotto T, Magnani G, Tomasi L, Coccolo F, Gabrielli L, Magelli C, Landini MP, Branzi A. Hydroxymethyl-glutaryl coenzyme a reductase inhibition limits cytomegalovirus infection in human endothelial cells. *Circulation* 2004;**109**(4):532-6.
38. Sedmak DD, Knight DA, Vook NC, Waldman JW. Divergent patterns of ELAM-1, ICAM-1, and VCAM-1 expression on cytomegalovirus-infected endothelial cells. *Transplantation* 1994;**58**(12):1379-85.

-
39. Knight DA, Waldman WJ, Sedmak DD. Cytomegalovirus-mediated modulation of adhesion molecule expression by human arterial and microvascular endothelial cells. *Transplantation* 1999;**68**(11):1814-8.
40. Waldman WJ, Knight DA. Cytokine-mediated induction of endothelial adhesion molecule and histocompatibility leukocyte antigen expression by cytomegalovirus-activated T cells. *Am J Pathol* 1996;**148**(1):105-19.
41. Almeida GD, Porada CD, St Jeor S, Ascensao JL. Human cytomegalovirus alters interleukin-6 production by endothelial cells. *Blood* 1994;**83**(2):370-6.
42. Smith PD, Saini SS, Raffeld M, Manischewitz JF, Wahl SM. Cytomegalovirus induction of tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and mucosal macrophages. *J Clin Invest* 1992;**90**(5):1642-8.
43. Mocarski E. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell Microbiol* 2004;**6**(8):707-17.
44. Melnychuk RM, Streblow DN, Smith PP, Hirsch AJ, Pancheva D, Nelson JA. Human cytomegalovirus-encoded G protein-coupled receptor US28 mediates smooth muscle cell migration through Galpha12. *J Virol* 2004;**78**(15):8382-91.
45. Orloff SL, Streblow DN, Soderberg-Naucler C, Yin Q, Kreklywich C, Corless CL, Smith PA, Loomis CB, Mills LK, Cook JW, Bruggeman CA, Nelson JA, Wagner CR. Elimination of donor-specific alloreactivity prevents cytomegalovirus-accelerated chronic rejection in rat small bowel and heart transplants. *Transplantation* 2002;**73**(5):679-88.

-
46. Weis M, Cooke JP. Cardiac Allograft Vasculopathy and Dysregulation of the NO Synthase Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;**23**(4):567-75.
47. Tona F, Caforio AL, Montisci R, Angelini A, Ruscazio M, Gambino A, Ramondo A, Thiene G, Gerosa G, Iliceto S. Coronary flow reserve by contrast-enhanced echocardiography: a new noninvasive diagnostic tool for cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant* 2006;**6**(5 Pt 1):998-1003.
48. Hollenberg SM, Klein LW, Parrillo JE, Scherer M, Burns D, Tamburro P, Oberoi M, Johnson MR, Costanzo MR. Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death. *Circulation* 2001;**104**(25):3091-6.
49. Simmonds J, Fenton M, Dewar C, Ellins E, Storry C, Cubitt D, Deanfield J, Klein N, Halcox J, Burch M. Endothelial dysfunction and cytomegalovirus replication in pediatric heart transplantation. *Circulation* 2008;**117**(20):2657-61.
50. Potena L, Fearon WF, Sydow K, Holweg C, Luikart H, Chin C, Weisshaar D, Mocarski ES, Lewis DB, Valantine HA, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine and cardiac allograft vasculopathy progression: modulation by sirolimus. *Transplantation* 2008;**85**(6):827-33.
51. Weis M, Kledal TN, Lin KY, Panchal SN, Gao SZ, Valantine HA, Mocarski ES, Cooke JP. Cytomegalovirus infection impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine in transplant arteriosclerosis. *Circulation* 2004;**109**(4):500-5.
52. Sydow K, Munzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 2003;**4**(4):41-51.

-
53. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;**99**(24):3092-5.
54. Cook CH, Bickerstaff AA, Wang JJ, Zimmerman PD, Forster MR, Nadasdy T, Colvin RB, Hadley GA, Orosz CG. Disruption of murine cardiac allograft acceptance by latent cytomegalovirus. *Am J Transplant* 2009;**9**(1):42-53.
55. Tu W, Potena L, Stepick-Biek P, Liu L, Dionis KY, Luikart H, Fearon WF, Holmes TH, Chin C, Cooke JP, Valantine HA, Mocarski ES, Lewis DB. T-cell immunity to subclinical cytomegalovirus infection reduces cardiac allograft disease. *Circulation* 2006;**114**(15):1608-15.
56. Westall G, Kotsimbos T, Brooks A. CMV-specific CD8 T-cell dynamics in the blood and the lung allograft reflect viral reactivation following lung transplantation. *Am J Transplant* 2006;**6**(3):577-84.
57. Gerna G, Lilleri D, Fornara C, Comolli G, Lozza L, Campana C, Pellegrini C, Meloni F, Rampino T. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2006;**6**(10):2356-64.
58. Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U. Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant* 2005;**5**(2):218-27.
59. Emery VC. Prophylaxis for CMV should not now replace pre-emptive therapy in solid organ transplantation. *Rev Med Virol* 2001;**11**(2):83-6.

-
60. Hodson EM, Jones CA, Webster AC, Strippoli GF, Barclay PG, Kable K, Vimalachandra D, Craig JC. Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 2005;**365**(9477):2105-15.
61. Strippoli GF, Hodson EM, Jones C, Craig JC. Preemptive treatment for cytomegalovirus viremia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2006;**81**(2):139-45.
62. Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J, Rohde F. Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. *Am J Transplant* 2008;**8**(5):975-83.
63. Reischig T, Jindra P, Hes O, Svecova M, Klaboeh J, Treska V. Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant* 2008;**8**(1):69-77.
64. Hill JA, Hummel M, Starling RC, Kobashigawa JA, Perrone SV, Arizon JM, Simonsen S, Abeywickrama KH, Bara C. A lower incidence of cytomegalovirus infection in de novo heart transplant recipients randomized to everolimus. *Transplantation* 2007;**84**(11):1436-42.
65. Vigano M, Dengler T, Mattei MF, Poncelet A, Vanhaecke J, Vermes E, Kleinloog R, Li Y, Gezahegen Y, Delgado JF. Lower incidence of cytomegalovirus infection with everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo cardiac transplant recipients: a randomized, multicenter study. *Transpl Infect Dis* 2009.

-
66. Demopoulos L, Polinsky M, Steele G, Mines D, Blum M, Caulfield M, Adamkovic A, Liu Q, Harler MB, Hahn C, Singh A. Reduced risk of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients treated with sirolimus: a pooled analysis of clinical trials. *Transplant Proc* 2008;**40**(5):1407-10.
67. Haririan A, Morawski K, West MS, El-Amm JM, Doshi MD, Cincotta E, Alangaden GJ, Chandrasekar P, Gruber SA. Sirolimus exposure during the early post-transplant period reduces the risk of CMV infection relative to tacrolimus in renal allograft recipients. *Clin Transplant* 2007;**21**(4):466-71.
68. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valantine-von Kaeppler HA, Starling RC, Sorensen K, Hummel M, Lind JM, Abeywickrama KH, Bernhardt P. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med* 2003;**349**(9):847-58.
69. Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, Spratt P, Galbraith A, O'Driscoll G, Macdonald P, Esmore D, Muller D, Faddy S. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. *Circulation* 2004;**110**(17):2694-700.
70. Li Q, Rao RR, Araki K, Pollizzi K, Odunsi K, Powell JD, Shrikant PA. A central role for mTOR kinase in homeostatic proliferation induced CD8⁺ T cell memory and tumor immunity. *Immunity* 2011;**34**(4):541-53.
71. Araki K, Youngblood B, Ahmed R. The role of mTOR in memory CD8 T-cell differentiation. *Immunol Rev* 2010;**235**(1):234-43.

-
72. Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann MF, Larsen CP, Ahmed R. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 2009;**460**(7251):108-12.
73. Abate D, Saldan A, Fiscon M, Cofano S, Paciolla A, Furian L, Ekser B, Biasolo MA, Cusinato R, Mengoli C, Bonfante L, Rossi B, Rigotti P, Sgarabotto D, Barzon L, Palu G. Evaluation of cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immune reconstitution revealed that baseline antiviral immunity, prophylaxis, or preemptive therapy but not antithymocyte globulin treatment contribute to CMV-specific T cell reconstitution in kidney transplant recipients. *J Infect Dis* 2010;**202**(4):585-94.
74. Potena L, Holweg C, Chin C, Luikart H, Weisshaar D, Narasimhan B, Fearon W, Lewis D, Cooke J, Mocarski E, Valentine H. Acute rejection and cardiac allograft vascular disease is reduced by suppression of subclinical cytomegalovirus infection. *Transplantation* 2006;**82**:398-405.
75. Valentine H, Luikart H, Doyle R, Theodore J, Hunt S, Oyer P, Robbins R, Berry G, Reitz B. Impact of cytomegalovirus hyperimmune globulin on outcome after cardiothoracic transplantation. *Transplantation* 2001;**72**(10):1647-52.
76. Ruttman E, Geltner C, Bucher B, Ulmer H, Hofer D, Hangler HB, Semsroth S, Margreiter R, Laufer G, Muller LC. Combined CMV prophylaxis improves outcome and reduces the risk for bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) after lung transplantation. *Transplantation* 2006;**81**(10):1415-20.

-
77. Toyoda M, Petrosyan A, Pao A, Jordan SC. Immunomodulatory effects of combination of pooled human gammaglobulin and rapamycin on cell proliferation and apoptosis in the mixed lymphocyte reaction. *Transplantation* 2004;**78**(8):1134-8.
78. Jordan SC, Vo A, Bunnapradist S, Toyoda M, Peng A, Puliyananda D, Kamil E, Tyan D. Intravenous immune globulin treatment inhibits crossmatch positivity and allows for successful transplantation of incompatible organs in living-donor and cadaver recipients. *Transplantation* 2003;**76**(4):631-6.

TABELLE E FIGURE

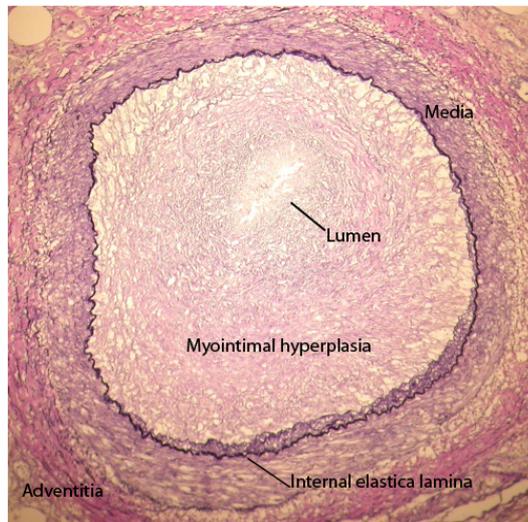


Figura 1. Sezione istologica del ramo circonflesso di paziente deceduto per scompenso cardiaco congestizio a 7 anni dal trapianto. La colorazione evidenzia una lamina elastica interna intatta e una massiva proliferazione intimale costituita da cellule muscolari lisce e matrice extracellulare risultante in una pressochè completa occlusione del lume vascolare (gentile concessione Dott. O Leone).

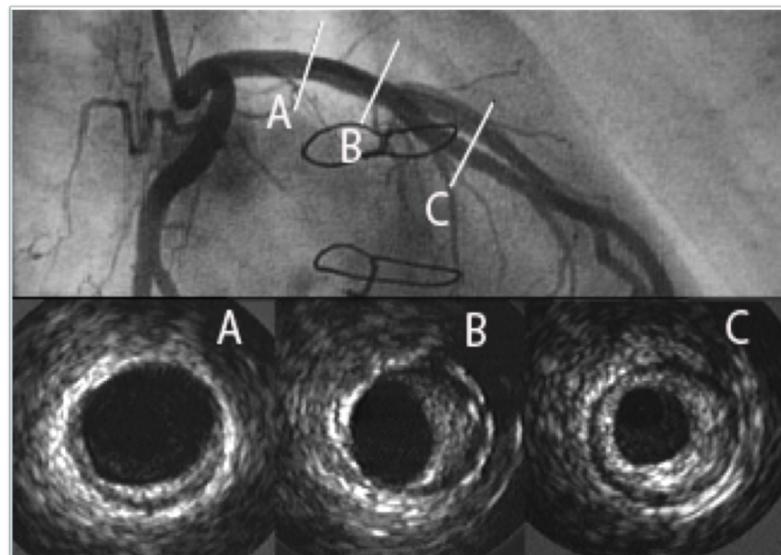


Figura 2. L'arteria coronarica interventricolare anteriore appare di regolare calibre alla normale angiografia coronarica, mentre l'IVUS permette l'identificazione della iperplasia intimale e della riduzione del lume vasale.

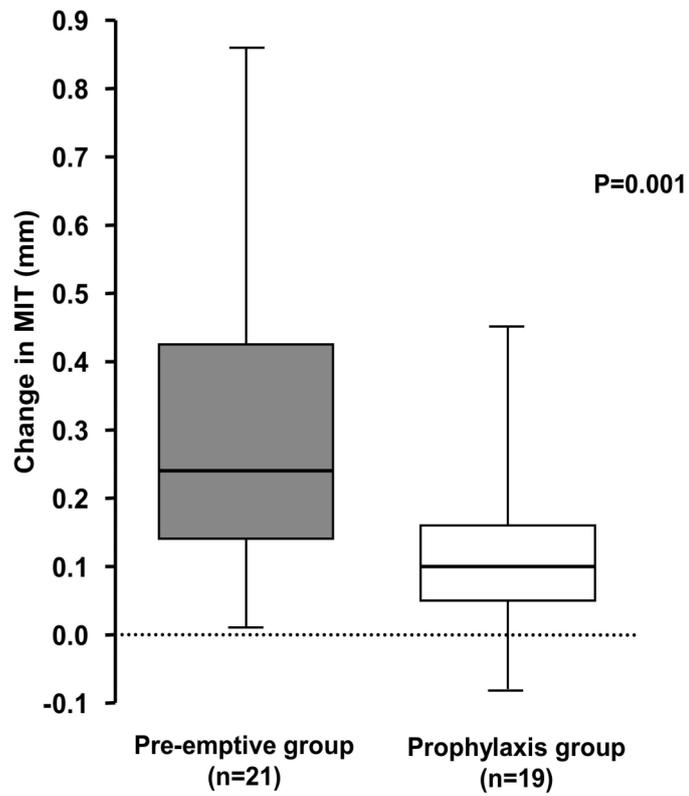


Figura 3. Riduzione del MIT (maximal intimal thickness) ad un anno nei pazienti trattati con profilassi rispetto a quelli trattati con strategia pre-sintomatica.

	Month 1	Month 2	Month 3-4	Month 5-6	Month 7-12
EVE	200-300	150-250	100-200	50-150	50-100
MMF	200-350	200-350	200-300	150-250	100-250

Tabella I. Range terapeutici della ciclosporina a seconda del trattamento con MMF o EVE.

	EVE (42 pazienti)	MMF (149 pazienti)	<i>P</i>
Sesso maschile, n (%)	30 (71%)	128 (85%)	0.57
Età, anni (m ± DS)	49 ± 14	51 ± 14	0.41
CIC post-IMA, n (%)	7 (17%)	49 (33%)	0.17
Tempo ischemia (m ± DS)	203 ± 56	200 ± 71	0.80
D+/R- (%)	4 (9%)	15 (10%)	0.84

Tabella II. Caratteristiche principali dei pazienti nei 2 gruppi di trattamento immunosoppressivo.

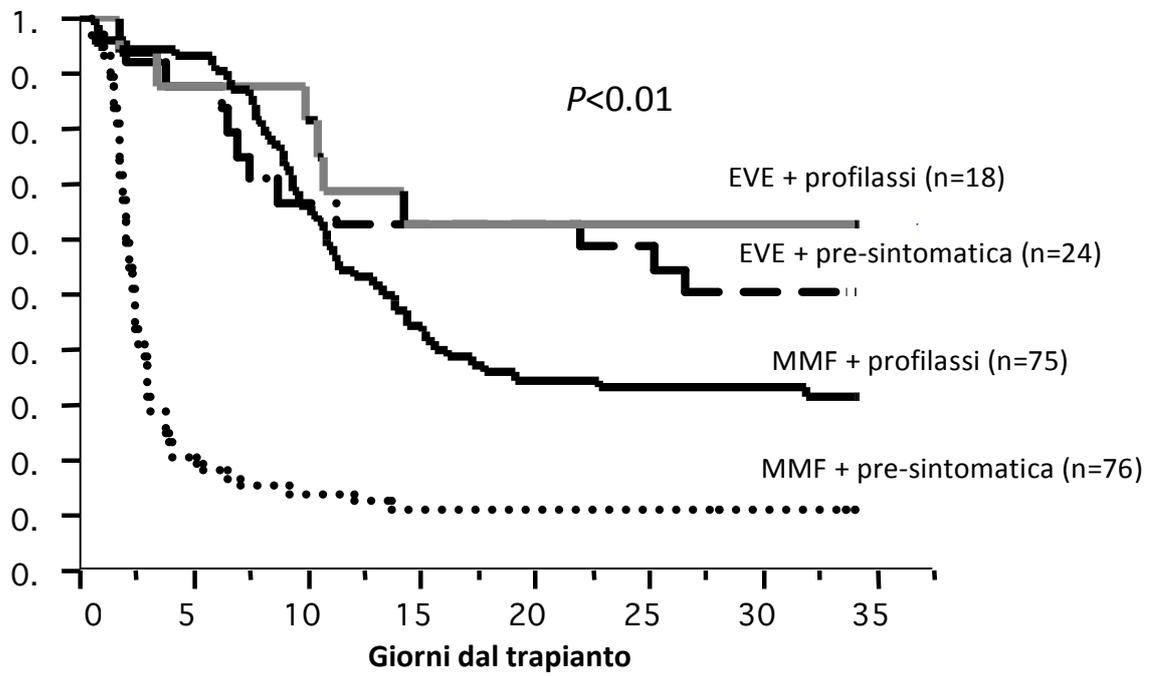


Figura 4. Sopravvivenza libera da infezione da CMV