

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA**

**DIPARTIMENTO DI SALUTE DELLA DONNA E DEL BAMBINO**

**Direttore: Professore Giorgio Perilongo**

**CLINICA ONCOEMATOLOGICA PEDIATRICA**

**Direttrice: Professoressa Alessandra Biffi**

**TESI DI LAUREA**

**IMMUNORICOSTITUZIONE DOPO TRAPIANTO DI CELLULE  
STAMINALI EMATOPOIETICHE IN UNA COORTE DI  
PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA PATOLOGIA EMATO-  
ONCOLOGICA**

**Relatrice: Professoressa Alessandra Biffi**

**Correlatrice: Dottoressa Chiara Mainardi**

**Laureanda: Martina Baldassa**

**Anno Accademico 2021-2022**







# INDICE

<b>1- RIASSUNTO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>2- INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. DEFINIZIONE .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. INDICAZIONE AL TCSE .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. TRAPIANTO AUTOLOGO O ALLOGENICO.....</b>	<b>7</b>
<b>2.4. TIPOLOGIE DI DONATORI E HLA PER TCSE ALLOGENICO</b>	<b>8</b>
<b>2.5. FONTI DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE.....</b>	<b>11</b>
<b>2.6. CRITERI PER LA SELEZIONE DEL DONATORE</b>	
<b>ALLOGENICO .....</b>	<b>13</b>
<b>Compatibilità HLA.....</b>	<b>13</b>
<b>Età del donatore.....</b>	<b>15</b>
<b>Sesso del donatore.....</b>	<b>15</b>
<b>Sierostatus CMV ed EBV.....</b>	<b>15</b>
<b>Compatibilità AB0 .....</b>	<b>15</b>
<b>2.7. REGIMI DI CONDIZIONAMENTO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.8. IMMUNOPROFILASSI.....</b>	<b>19</b>
<b>2.9. INFUSIONE ED ATTECCHIMENTO.....</b>	<b>22</b>
<b>2.10 RICOSTITUZIONE IMMUNOLOGICA POST TRAPIANTO</b>	
<b>ALLOGENICO .....</b>	<b>25</b>
<b>Sistema immunitario innato.....</b>	<b>25</b>
<b>Sistema immunitario acquisito .....</b>	<b>26</b>
<b>2.11. COMPLICANZE DEL TRAPIANTO.....</b>	<b>29</b>
<b>Mucosite.....</b>	<b>29</b>
<b>Sindrome da attecchimento e <i>capillary leak syndrome</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>Danno renale .....</b>	<b>30</b>
<b>Danno epatico e sindrome da ostruzione sinusoidale .....</b>	<b>31</b>
<b>Complicanze endoteliali .....</b>	<b>32</b>
<b>Graft <i>failure</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>Rigetto .....</b>	<b>33</b>
<b>Malattia del trapianto contro l'ospite acuta (aGvHD).....</b>	<b>34</b>
<b>Malattia del trapianto contro l'ospite cronica (cGvHD).....</b>	<b>36</b>

Tumori secondari .....	39
Disordini endocrinologici e fertilità .....	40
Recidiva di malattia .....	41
Complicanze infettive.....	42
2.12.    STUDIO DELLA RICOSTITUZIONE IMMUNOLOGICA: STATO DELL'ARTE.....	45
3-    OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	49
4-    MATERIALI E METODI.....	50
4.1. DESCRIZIONE COORTE E PROCEDURA .....	50
4.2. ANALISI STATISTICA DI RICOSTITUZIONE IMMUNOLOGICA .....	54
4.3. ANALISI DI SOPRAVVIVENZA .....	56
5-    RISULTATI.....	58
5.1. RISULTATI DELL'APPLICAZIONE DEL MODELLO STATISTICO .....	61
Età.....	63
Donatore.....	65
Sorgente cellulare .....	65
aGvHD.....	66
Riattivazione CMV.....	67
Dose cellulare CD34+ infusa .....	67
5.2. ANALISI DI SOPRAVVIVENZA .....	68
6-    DISCUSSIONE.....	69
6.1. RUOLO DELL'ETÀ .....	69
6.2. RUOLO DELLA SORGENTE DI CSE.....	70
6.3. RUOLO DEL DONATORE .....	71
6.4. RUOLO DELLA GvHD ACUTA.....	71
6.5. RUOLO DEL CITOMEGALOVIRUS.....	72
6.6. RUOLO DELLA DOSE CELLULARE CD34+ .....	73
6.7. ANALISI DI SOPRAVVIVENZA .....	74
7-    CONCLUSIONI .....	75
8-    APPENDICE.....	79
9-    BIBLIOGRAFIA.....	83

## 1- RIASSUNTO

**Presupposti dello studio.** Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche è un'opzione terapeutica per diverse patologie, neoplastiche e non, molte delle quali ad insorgenza in età pediatrica.

La procedura comporta la soppressione dell'emopoiesi di un ricevente con chemio e/o radioterapia ad alte dosi ed il successivo ripristino delle normali funzioni midollari ed immunitarie mediante l'infusione di CSE.

Un'adeguata ricostituzione immunitaria dopo TCSE impatta sull'*outcome* della procedura e può essere influenzata da diversi fattori.

**Obiettivi dello studio.** In questo studio abbiamo indagato l'effetto di alcune caratteristiche del paziente e della procedura trapiantologica sulla ricostituzione immunologica e sulla sopravvivenza, in una coorte di pazienti pediatrici affetti da patologia emato-oncologica, in termini di crescita della conta di linfociti e sottopopolazioni linfocitarie nei dodici mesi post-TCSE.

**Materiali e metodi.** Sono state revisionate retrospettivamente le cartelle cliniche di 157 pazienti, con età < 25 anni, sottoposti a TCSE presso l'Oncoematologia pediatrica di Padova tra il 2011 e il 2021. L'analisi è stata condotta applicando un modello statistico ad effetti misti che tiene conto dell'eterogeneità delle variabili fisse (sorgente cellulare, donatore, TBI, ATG, sierologia donatore/ricevente, sesso e dose cellulare CD34+ infusa) e random (GvHD acuta e cronica, riattivazione CMV ed EBV e altre complicanze infettive) e stimata mediante la massima verosimiglianza.

Per le analisi di sopravvivenza è stato applicato il metodo di *Kaplan-Meier* stimando la differenza fra le curve con il *log-rank test*.

**Risultati.** Si sono dimostrate significative nel modificare le tempistiche di ricostituzione immunologica: età del paziente al trapianto (se < 10 influisce positivamente sulla conta di linfociti, CD3+, CD4+, CD8+, CD19+), tipo di donatore (MSD migliore nella ricostituzione di linfociti, CD3+, CD4+), sorgente di CSE (BM migliora la conta di CD8+; UCB migliora la conta di CD19+ e CD16+), GvHD acuta (influisce negativamente sulla conta di linfociti, CD4+, CD19+), riattivazione di CMV (influisce positivamente sulla conta di linfociti, CD19+, CD16+), dose cellulare di CD34+ (influisce positivamente sulla conta dei CD16+ se > 5,89).

L'aver ricevuto TBI o sieroterapia, l'aver sperimentato riattivazione di EBV, eventi settici o infettivi fungini, GvHD cronica e sierologia donatore/ricevente non sono risultati avere un impatto sull'incremento numerico dei linfociti e dei loro *subset*. Per quanto riguarda l'*overall survival*, l'aver raggiunto valori normali per età della sottopopolazione CD19+ a 12 mesi dal trapianto potrebbe dare un vantaggio limite in termini di sopravvivenza (*p-value* 0,057). Per tutti gli altri *subsets* non sono stati rilevati vantaggi significativi.

**Conclusioni.** Nonostante gli *outcome* del TCSE in pazienti pediatriche siano decisamente migliorati negli anni, sviluppare nuove strategie per garantire una ricostituzione immunologica adeguata dopo il trapianto potrebbe avere una rilevanza clinica.

Nell'ottica dell'immunoricostituzione:

- Il nostro studio conferma come *gold standard* la scelta di un donatore familiare compatibile, quando disponibile, seguito da MUD da registro.
- In caso di TCSE urgente, le unità di sangue cordonale rappresentano una valida possibilità poiché il loro utilizzo potrebbe associarsi ad una migliore immunoricostituzione relativamente ad alcune sottopopolazioni linfocitarie.
- Vanno implementate le strategie di profilassi antiinfettiva ed immunoterapia adottiva soprattutto nei pazienti peripuberi, adolescenti e giovani adulti.
- Nel prevenire e trattare la GvHD si dovrebbero preferire strategie che limitino l'immunosoppressione.

Tutti questi provvedimenti hanno come obiettivo una rapida ricostituzione immunologica che potrebbe correlare con una sopravvivenza migliore, ma sono necessari studi prospettici per approfondire l'analisi.



## 1.1. ABSTRACT

**Background.** Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a potentially curative treatment option for a variety of malignant and nonmalignant hematologic diseases of pediatric age. Conditioning causes immunosuppression followed by infusion of HSC to reconstitute the bone marrow and to enhance the immune recovery.

Adequate immune reconstitution post-HSCT has an impact on outcome of procedure and can be affected by several factors.

**Objectives.** The aim of the analysis is to estimate the role of patient's age, source of HSC, type of donor, conditioning regimen, serotherapy, post-HSCT infections and GvHD on immune recovery in a cohort of Pediatric Oncohematological patients through a sequential monitoring of lymphocyte and subsets once a month for a year post-HSCT.

**Methods.** We retrospectively reviewed the reconstitution of lymphocyte subsets and survival of a group of 157 children who underwent HSCT in Padua between 2011 and 2021 and had at least one followed up in our clinic. Given the multilevel structure of the data, it was considered necessary to use a linear mixed-effects model with fixed (cellular source, type of donor, TBI, ATG, serology, sex and CD34+ cellular dose) and random effects (acute and chronic GvHD, CMV – EBV infections, sepsis and invasive fungal infections); as an estimation method we use RELM.

We also conduct an analysis about survival using *Kaplan-Meier* method and *log-rank test*.

**Results.** Variables associated with modifications of the time of immune-reconstitution were: patient's age (if <10 influences positively lymphocytes count, CD3+, CD4+, CD8+, CD19+); type of donor (MSD improve lymphocyte reconstitution, CD3+, CD4+); HSC source (BM increase the count of CD8+, UCB increase CD19+, CD16+ count), acute GvHD (influences negatively lymphocytes count, CD4+, CD19+); reactivation of CMV (influences positively lymphocytes count, CD19+, CD16+); CD34+ cellular dose (influences positively CD16+ cells count if > 5,89). Receiving TBI or serotherapy, reactivation of EBV, septic events or invasive fungal infections, chronic GvHD and donor/receiver serology didn't have a significative impact on the increase of lymphocytes and their subsets. Considering the overall survival, reaching normal values by age of

CD19+ at 12 months after transplantation seems to give minimal benefits in terms of survival (p-value 0,057).

For all the other subsets, reaching normal values between 10<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentile by age, didn't give any benefit in terms of overall survival, TRM, EFS.

**Conclusions:** Despite HSCT's outcomes in paediatric patients improved, developing new strategies to guarantee an adequate immune reconstitution after transplantation could provide clinical advantages.

From the immune recovery perspective:

- Our data confirm that a matched sibling donor if available is the gold standard, otherwise MUD from register.
- In case of urgent TCSE, cordon blood units are a valid choice that could associate with a better immune reconstitution for some lymphocytes subpopulation.
- It is necessary to improve anti-infective prophylaxis strategies and adoptive immune-therapy in peri-puberal, adolescents and young adult patients.
- In preventing and treating GvHD it is better considering strategies that limit immune suppression.

Strategies to enhance posttransplant immune recovery and to improve survival in HSCT patients are warranted.

Our study showed a possible impact of immune recovery on OS only for CD19+ population; a prospective analysis will provide better insight on the topic.

## 2- INTRODUZIONE

### IL TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

#### 2.1. DEFINIZIONE

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) è una procedura complessa che comporta la soppressione dell'emopoiesi di un ricevente con chemio e/o radioterapia ad alte dosi ed il successivo ripristino delle normali funzioni midollari ed immunitarie mediante l'infusione di un prodotto cellulare derivante da un donatore (TCSE allogenico) o precedentemente raccolto dal ricevente stesso (TCSE autologo).

#### 2.2. INDICAZIONE AL TCSE

Il TCSE rappresenta un'opzione terapeutica per diverse patologie, neoplastiche e non neoplastiche, molte delle quali ad esordio in età pediatrica.

Le principali indicazioni al TCSE sono riassunte nella seguente tabella.

<p><b>I. Emopatie maligne</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Leucemia linfoblastica acuta ad alto rischio di recidiva</li> <li>- Recidiva di leucemia linfoblastica acuta (in seconda o terza remissione completa morfologica)</li> <li>- Leucemia mieloide acuta</li> <li>- Leucemia mielomonocitica giovanile (JMML)</li> <li>- Sindromi mielodisplastiche</li> </ul>
<p><b>II. Emopatie non maligne</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Immunodeficienze congenite:               <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Immunodeficienza severa combinata (SCID)</li> <li>b. Agammaglobulinemia congenita</li> <li>c. Sindrome di DiGeorge</li> <li>d. Sindrome di Wiscott-Aldrich</li> </ul> </li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disordini ematologici: <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Anemia aplastica severa</li> <li>b. Drepanocitosi</li> <li>c. Beta-talassemia</li> <li>d. Anemia di Fanconi</li> <li>e. Sindrome di Shwachman-Diamond</li> <li>f. Sindrome di Blackfan-Diamond</li> <li>g. Malattie metaboliche ereditarie e malattie lisosomiali</li> <li>h. mucopolipidosi</li> <li>i. mucopolisaccaridosi</li> </ul> </li> <li>- Linfocitocitosi emofagocitica familiare</li> </ul>
<p><b>III. Neoplasie extra-midollari</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neuroblastoma ad alto rischio</li> <li>- Tumori del SNC ad alto rischio (i.e. medulloblastoma, PNET)</li> <li>- Tumore a cellule germinali ad alto rischio</li> <li>- Linfoma di Hodgkin o non-Hodgkin recidivato/refrattario</li> <li>- Tumore di Wilms recidivato/refrattario</li> <li>- Sarcomi dei tessuti molli ad alto rischio (metastatici all'esordio)</li> </ul>

*Tabella I - Principali indicazioni al TCSE*

La patologia neoplastica rappresenta l'indicazione più frequente al TCSE in età pediatrica.

Dati ricavati da registri internazionali quali "Automated Childhood Cancer Information System (ACCIS)" ed "EUROCARE" ci informano sulla prevalenza delle principali neoplasie pediatriche in pazienti fino a 15 anni: leucemie 34%, tumori solidi cerebrali 23%, linfomi 12%. Le diagnosi più frequenti sono leucemia linfoblastica acuta, astrocitoma, neuroblastoma, linfomi non-Hodgkin, nefroblastoma.

L'incidenza è variabile tra 130 e 160 casi per milione, in lieve aumento negli ultimi 20 anni, in aumento anche la sopravvivenza che si attesta attorno all'81% a 5 anni dalla diagnosi, in Europa e USA (migliorati i protocolli terapeutici)<sup>(1)</sup>.

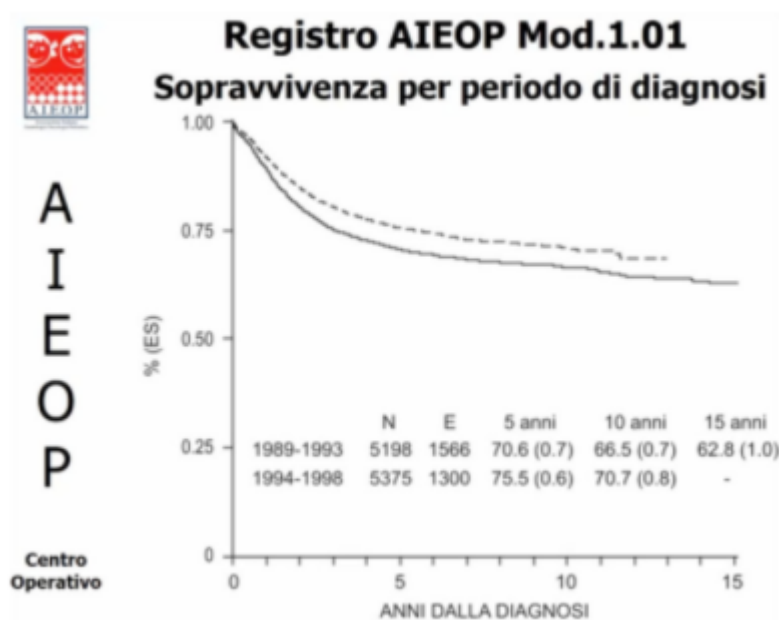


Figura 1- Sopravvivenza per periodo di diagnosi. Registro AIEOP Mod.1.01

### 2.3. TRAPIANTO AUTOLOGO O ALLOGENICO

Per *trapianto autologo* si identifica una procedura caratterizzata da somministrazione di chemioterapia ad alti dosaggi (condizionamento) in un paziente con neoplasie ematologiche quali linfomi e mielomi o neoplasie solide con lo scopo di eliminare tutte le cellule tumorali, a cui segue l'infusione di cellule staminali ematopoietiche (CSE) precedentemente raccolte dal paziente stesso mediante leucoaferesi e congelate per conservarle sino al loro utilizzo. Il *rescue* con cellule staminali dopo scongelamento abbrevia i tempi di recupero della profonda aplasia che consegue al condizionamento e riduce considerevolmente il rischio di acquisire infezioni e di ospedalizzazione del paziente.

Questo tipo di trapianto è privo di complicanze immuni perché donatore e ricevente si identificano nella stessa persona.

Il *trapianto allogenico* invece è una forma di immunoterapia il cui razionale risiede sia nell'effetto antineoplastico, mieloablativo ed immunoablativo della

terapia di condizionamento, sia nel riconoscimento immunomediato da parte delle cellule derivate dal donatore di eventuali cellule tumorali residue nel ricevente malato; tale processo prende il nome di *Graft vs Tumor*<sup>(2)</sup>.

Queste caratteristiche rendono la procedura trapiantologica un'opzione terapeutica sia per le patologie ematologiche oncologiche sia per alcune emopatie non maligne, immunoematologiche o disordini congeniti del metabolismo.

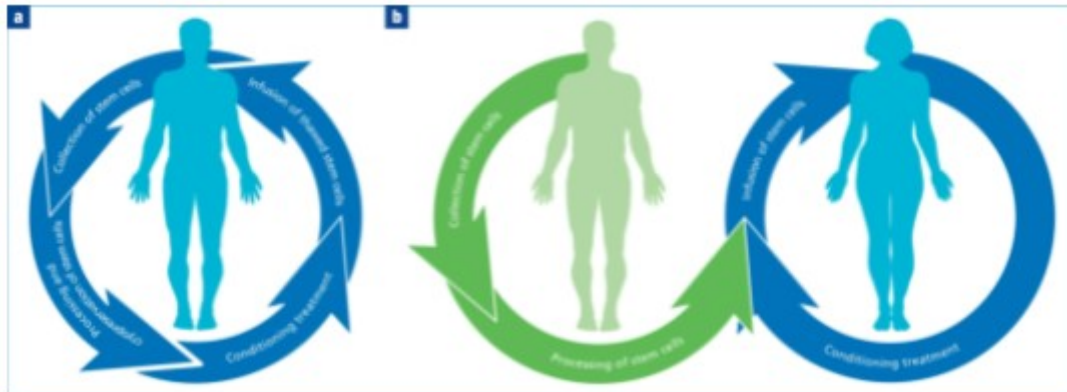


Figura 2- TCSE a. Autologo b. Allogenico

#### 2.4. TIPOLOGIE DI DONATORI E HLA PER TCSE ALLOGENICO

Le CSE nel trapianto allogenico provengono da una persona differente dal ricevente, con cui il paziente può o meno avere un rapporto di parentela,<sup>(3)(4)</sup> e questo implica che ci debba essere una certa compatibilità immunofenotipica tra i due così da ridurre le complicanze immunomediate.

La compatibilità donatore/ricevente è mediata dal sistema maggiore di istocompatibilità (MHC, *Human Leukocyte Antigen*, HLA, nell'uomo).

Dal punto di vista genetico, il complesso HLA è localizzato nel braccio corto del cromosoma 6 (6p21.3), con una lunghezza di circa 4 Mbp, contenente oltre 260 geni con funzioni immunologiche quali processamento e presentazione dell'antigene<sup>(5)</sup>.

Tali geni sono raggruppati in tre classi e sono caratterizzati da un elevato polimorfismo, il che significa che nella popolazione esiste una variabilità allelica molto elevata per i diversi loci, in particolare per i loci HLA-A, -B e -DRB1.

Regione MHC	Sequenze geniche
Classe I	HLA-A, -B, -C
Classe II	HLA-DR, -DQ, -DP
Classe III	Fattori del complemento, <i>TNF</i>

Figura 3- classi HLA

I geni HLA sono espressi in maniera codominante e la loro ereditabilità segue le precise regole mendeliane; ne deriva che la probabilità a priori che due fratelli siano geneticamente identici per HLA è del 25%.

Studi sulla funzione dei linfociti T e sui rigetti di trapianto di tessuti hanno evidenziato che il riconoscimento delle cellule nucleate del nostro corpo dipende dalla presenza sulla loro superficie di un gruppo specifico di glicoproteine codificate proprio dai geni HLA. La presenza, sulla membrana cellulare, delle proteine codificate dal complesso HLA identifica in modo univoco le cellule *self* dell'organismo e le distingue dalle estranee *non self*.

A seconda della struttura e della funzione si possono distinguere due classi di HLA: i geni HLA di prima classe sono espressi in tutte le cellule nucleate del nostro corpo e le identificano come *self*.

I geni della classe HLA II sono espressi solo sulle cellule del sistema immunitario (monociti, macrofagi e linfociti B) e vengono riconosciuti dai linfociti T *Helper*.

I linfociti T sono in grado di individuare un antigene ed eliminarlo solamente se il patogeno viene presentato ai linfociti T stessi da parte di cellule specializzate (APC). Le APC fagocitano il patogeno, lo elaborano e ne espongono dei frammenti (antigeni) sulla loro superficie in associazione alle glicoproteine codificate dall'HLA: in questo modo l'antigene è accessibile ai linfociti T che si attivano contro il patogeno e lo distruggono.

La tipizzazione del complesso HLA è di fondamentale importanza quando si vuole effettuare un trapianto di tessuto: il donatore deve presentare un certo grado di compatibilità immunologica con il ricevente tale da ridurre il rischio di rigetto, e minimizzare il rischio di sviluppare malattia del trapianto contro l'ospite detta *Graft versus Host Disease (GvHD)*.

La compatibilità immunologica dipende in primo luogo dal grado di somiglianza donatore-ricevente in specifiche sequenze genetiche dell'HLA.

Quando vengono diagnosticate patologie che potrebbero richiedere un TCSE, si procede rapidamente con un'analisi genetica che permette la tipizzazione di tutti i loci HLA di maggior interesse in ambito trapiantologico; una volta ottenuto il referto si potrà comparare la genetica del paziente con quella di potenziali donatori familiari o inseriti nella banca dati dei donatori da registro, alla ricerca del *match* migliore.

Inizialmente le analisi genetiche venivano condotte su sierologia tipizzando un numero limitato di loci; l'introduzione di tecniche di biologia molecolare quali la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) a metà del 1980 portò allo sviluppo di numerosi metodi rapidi e puntuali per il *typing* dell'HLA.

Il donatore allogenico di cellule staminali ematopoietiche può essere:

1. un familiare identico: fratello o sorella geneticamente identici al paziente sulla base della tipizzazione HLA (*matched sibling donor*, MSD), la scelta è preferibile in termini di compatibilità immunologica ma è disponibile in una bassa percentuale di casi;
2. familiare non identico: familiare con alcune differenze sulla tipizzazione HLA oppure con un solo aplotipo HLA in comune (compatibilità pari al 50%) (donatore aploidentico). In questo caso, considerata l'elevata disparità immunologica tra donatore e ricevente, le cellule ematopoietiche del donatore subiscono una manipolazione *in vivo* o *ex vivo* per consentire l'attecchimento e ridurre il rischio di complicanze immuni nel ricevente;
3. volontario adulto da registro internazionale dei donatori: può risultare perfettamente identico al paziente o presentare poche differenze HLA accettabili (*matched unrelated donor*, MUD). La probabilità di trovare un donatore MUD varia tra i differenti gruppi etnici, con una percentuale più alta nei caucasici (>75%) ma molto bassa per pazienti africani o del centro-sud America (16%); tale differenza potrebbe anche dipendere dalla ridotta quantità di donatori iscritti ai registri nei paesi in via di sviluppo rispetto a donatori residenti nelle *high-income Countries* <sup>(6)</sup>.



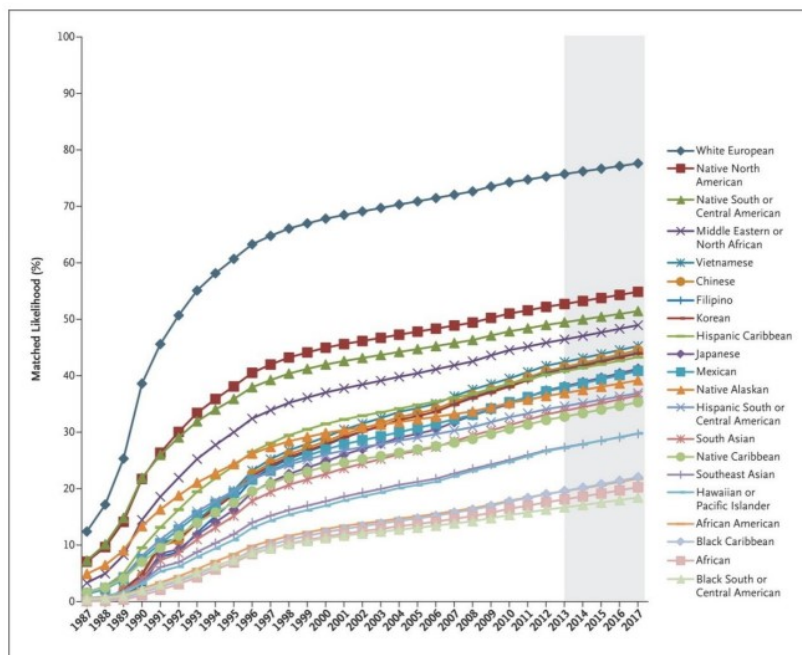


Figura 4- Probabilità di trovare un donatore non-related 8/8 a secondo dell'origine etnica<sup>6</sup>

## 2.5. FONTI DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

Nella pratica clinica si possono utilizzare tre fonti di cellule staminali ematopoietiche con caratteristiche in parte differenti fra loro: CSE midollari (BM), da sangue periferico (PBSC) o da sangue di cordone ombelicale (UCB).

Le cellule staminali da sangue midollare vengono prelevate mediante la procedura di espianto: con una siringa si eseguono prelievi multipli a livello delle ossa della cresta iliaca del bacino aspirando una quota sufficiente di sangue, la procedura può essere eseguita in anestesia locale o generale. Le complicanze a cui può andare incontro il donatore dipendono maggiormente dall'anestesia, soggetti che dovessero avere un concreto rischio anestesilogico non vengono candidati alla donazione a loro stessa tutela.

Le cellule staminali possono essere raccolte anche da sangue periferico grazie ad una procedura definita aferesi. Tale metodica non richiede di eseguire un'anestesia nel donatore e si può eseguire in regime ambulatoriale. Prima di procedere con la raccolta delle CSE è necessario stimolare il donatore con fattori di crescita (generalmente G-CSF o Plerixafor), così da mobilitare i precursori ematopoietici nella circolazione periferica. A seguito della mobilitazione si procede con la raccolta aferetica che ha lo scopo di isolare e raccogliere dal

sangue del donatore solo i leucociti e di reimmettere in circolo la restante componente ematica.

La donazione può avvenire anche sottoforma di unità di sangue cordonale (UCB): si tratta di una fonte alternativa di cellule staminali ematopoietiche utilizzabili per il trapianto; la quantità di cellule staminali ottenibili da un unico cordone è inferiore rispetto a quella ottenibile con le precedenti procedure, per cui è adatto per trapianti pediatrici. Il sangue cordonale viene prelevato al momento del parto previo consenso dei genitori del nascituro alla donazione solidaristica. Qualora l'unità raccolta soddisfi i requisiti per il bancaggio, viene crioconservata e i dati relativi alla donazione inseriti nel database dei registri donatori. In rari casi c'è indicazione ad una raccolta dedicata di sangue del cordone per donazione intrafamiliare.

Il sangue di cordone ombelicale è stata una sorgente di CSE ampiamente utilizzata in pediatria soprattutto in passato ma, dato che fornisce una quantità di precursori ematopoietici inferiore rispetto ad altre fonti, nell'adulto è spesso necessario utilizzare due o più unità affinché il trapianto abbia successo.

Ciascuna sorgente di CSE permette di ottenere *Graft* con una differente composizione cellulare e quindi con diverse caratteristiche a cui si associano specifici vantaggi e svantaggi in relazione all'*outcome* del TCSE.

Il pool di CSE midollari comprende molti precursori ematopoietici e poche cellule *committed*, di conseguenza, si verifica un attecchimento più lento ed un rischio di malattia del trapianto contro l'ospite (*Graft-versus-Host Disease*, GvHD) ridotto rispetto ad altre fonti.

Il prodotto cellulare ottenuto mediante aferesi comprende, oltre a precursori ematopoietici CD34+ in numero significativamente più elevato rispetto alle altre fonti di CSE, anche linfociti T, NK e monociti. In assenza di manipolazione, ciò facilita un attecchimento rapido del *Graft* ma predispone il ricevente ad un rischio aumentato di sviluppare GvHD. Ciò si traduce, allo stesso tempo, in un potenziamento dell'effetto *Graft versus Tumor*: esiste letteratura a supporto della riduzione del rischio di recidiva di malattia post-trapianto con l'utilizzo di PBSC come sorgente di CSE<sup>(7)</sup>.

Il sangue cordonale possiede il vantaggio di essere una fonte di cellule ematopoietiche relativamente immature, il che permette di tollerare una disparità HLA donatore-ricevente maggiore; scegliendo tale fonte per la donazione non ci

sono inoltre rischi per il donatore. Gli svantaggi associati all'utilizzo di questa fonte di CSE comprendono l'esiguità del numero di CSE ottenibili con una singola unità (questa la ragione per cui l'uso è più comune nel paziente pediatrico) e quindi un attecchimento in genere lento, nonché l'impossibilità di ottenere in futuro ulteriori prodotti cellulari dallo stesso donatore, ad esempio per un secondo trapianto o per immunoterapia adottiva.

## 2.6. CRITERI PER LA SELEZIONE DEL DONATORE ALLOGENICO

Qualora per uno stesso paziente siano disponibili più donatori di CSE, la selezione viene effettuata sulla base di molteplici fattori.

In genere un MSD rappresenta l'opzione di scelta, qualora disponibile.

Negli altri casi, le tempistiche del trapianto, l'età, il performance status e la patologia del paziente orientano verso un donatore *unrelated* piuttosto che aploidentico.

Qualora siano disponibili più donatori MUD, i criteri di selezione principali sono i sottoelencati, non necessariamente in ordine gerarchico.

### Compatibilità HLA

La disparità HLA è associata a delle complicanze quali:

1. *Graft Failure* (rigetto)
2. Ricostituzione immunologica ritardata
3. *Graft versus Host Disease (GvHD)*

È ovviamente preferibile la scelta del donatore con il minor numero di *mismatch* HLA: è ben noto dalla letteratura che all'aumentare del numero di disparità HLA si riduce la sopravvivenza ed aumenta la mortalità trapianto-correlata. In generale il *match* 8/8 (HLA-A, B, C, DRB1) rappresenta il minimo livello di compatibilità associato ad una più elevata percentuale di sopravvivenza post TCSE.

Comparando l'andamento clinico di pazienti riceventi *match* 8/8 ai riceventi 7/8 e 6/8 si osserva un calo del 10% di sopravvivenza per ogni *mismatch* aggiuntivo e questo si verifica indipendentemente dall'età del paziente, dalla gravità della malattia o dalla deplezione preventiva delle cellule T, sottolineando come il ruolo dell'HLA sia centrale nel confermare la compatibilità donatore ricevente<sup>(8)</sup>.

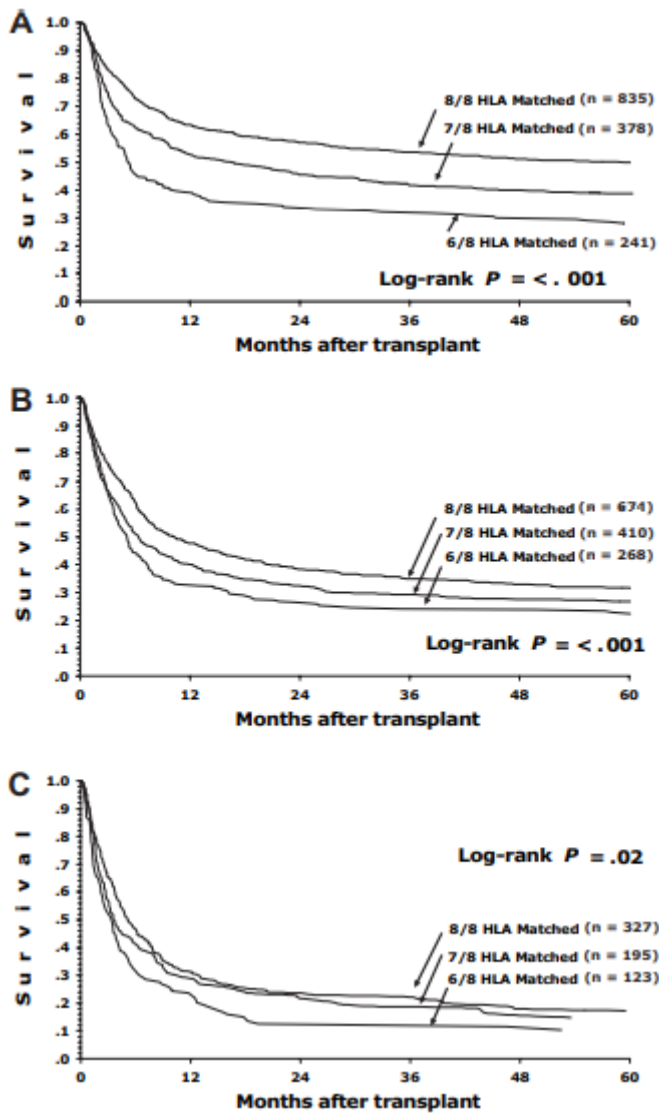


Figura 5- Ruolo del "match" sulla Sopravvivenza<sup>(8)</sup>

Anche la sede di eventuali *mismatch* ha un impatto sull'*outcome* del trapianto: esistono delle combinazioni (relative soprattutto al *locus* DPB1) che sono state identificate mediante dei modelli matematici basati su studi retrospettivi come "non permissive" in quanto peggio tollerate da un punto di vista clinico. Esse si associano maggiormente a complicanze alloimmuni sia nel senso *Host-versus-Graft* che *Graft-versus-Host*. Tali *mismatch* andrebbero preferibilmente evitati<sup>(9)</sup>.

### **Età del donatore**

Una proprietà importante delle CSE è il *self-renewing* ossia la capacità di dividersi in due cellule di cui almeno una mantiene le caratteristiche indifferenziate della cellula madre.

Alcuni studi suggeriscono che anche le cellule staminali ematopoietiche invecchino fisiologicamente all'aumentare dell'età e di conseguenza si assista ad un progressivo declino della loro funzione. Un altro evento che potrebbe verificarsi con maggiore frequenza in CSE di individui non più giovani è lo sviluppo di aberrazioni che possono essere mantenute nelle cellule figlie che vanno in contro a differenziazione aumentando la probabilità di comparsa di neoplasie ematologiche<sup>(10)</sup>.

In Italia possono candidarsi a diventare donatori di midollo osseo tutte le persone in buona salute, di età compresa tra i 18 e i 35 anni, che pesino almeno 50 kg. Una volta iscritti al registro italiano dei donatori (IBMDR) si può donare fino ai 55 anni, limite imposto dall'*aging* fisiologico del compartimento staminale.

Per tutti i motivi sopracitati, in caso di più donatori MUD con analoga compatibilità HLA, è preferibile scegliere il più giovane.

### **Sesso del donatore**

Un donatore maschio è preferibile rispetto ad una donatrice femmina<sup>(11)</sup>: le donne, infatti, sono generalmente a rischio di sviluppare alloimmunizzazioni in seguito a gravidanze.

### **Sierostatus CMV ed EBV**

La migliore combinazione risulta essere data da donatore e ricevente entrambi negativi per le IgG di CMV ed EBV. Al contrario, se il ricevente è positivo per le IgG di CMV/EBV, il rischio di riattivazione virale post-trapianto è elevato, soprattutto se il donatore risulta negativo poiché non può donare l'immunità verso CMV/EBV<sup>(12)</sup>.

### **Compatibilità AB0**

Quando possibile, al fine di minimizzare il rischio di un ritardato attecchimento della serie eritroblastica, è preferibile selezionare un donatore compatibile con il sistema AB0 del paziente, tuttavia, non esiste una correlazione statisticamente

significativa tra compatibilità ABO e aumento della sopravvivenza post-trapianto tanto da poter essere considerato un elemento non cruciale nella scelta del donatore.

## 2.7. REGIMI DI CONDIZIONAMENTO

Il condizionamento consiste in una chemio e/o radioterapia ad alte dosi somministrata nell'arco di alcuni giorni, seguita dall'infusione di cellule staminali ematopoietiche. Storicamente il condizionamento viene eseguito per tre motivi:

- 1- eradicare la neoplasia maligna mediante azione antineoplastica se questa è l'indicazione al trattamento;
- 2- assicurare un'adeguata immunosoppressione per facilitare l'attecchimento del *Graft* e prevenire un eventuale rigetto o GvHD;
- 3- creare delle nicchie vuote nel midollo osseo del ricevente in modo tale che le CSE infuse possano trovare spazio per insediarsi e proliferare.

Il meccanismo d'azione della terapia di condizionamento è di mielodeplezione attraverso cui vengono eliminate le cellule staminali del paziente provocando aplasia talvolta irreversibile, e di linfodeplezione per eliminare le cellule del sistema linfatico.

Gli alchilanti come il Melphalan, Busulfano e Carmustina hanno un'azione prevalentemente mieloablativa mentre, Fludarabina e Ciclofosfamide hanno azione principalmente immunosoppressiva.

Altri farmaci che vengono impiegati nel condizionamento sono degli antimetaboliti come la Citarabina, l'Etoposide e il Carboplatino.

In associazione alla chemioterapia può essere utilizzata la radioterapia che viene modulata sulla base dell'indicazione al trapianto. L'irradiazione può interessare tutto il corpo (*Total body Irradiation*, TBI) o essere riservata a particolari distretti anatomici. Ad esempio, l'irradiazione delle stazioni linfonodali (*Total nodal Irradiation*, TNI) è generalmente indicata a scopo immunosoppressivo. Storicamente la TBI in combinazione con la Ciclofosfamide è stato il regime di condizionamento più utilizzato in pazienti pediatrici con leucemia acuta.

In ambito pediatrico l'irradiazione *Total body* con lo scopo di eliminare le cellule tumorali si esegue alla dose di 10-12 Gy mentre, si utilizzano dosi minori se l'obiettivo è liberare nicchie nel midollo (2-3 Gy) o provocare un'immunosoppressione (3-6 Gy).

La TBI garantisce sia un effetto mieloablativo sia immunosoppressivo facilitando l'attecchimento del *Graft* in combinazione con un adeguato effetto antineoplastico; purtroppo si associa a svariati effetti collaterali che possono comparire dopo qualche giorno (a breve termine: stanchezza, eruzioni cutanee, alterazioni di vari organi e apparati con mucositi, polmoniti interstiziali, sindrome veno-occlusiva, cistite emorragica, caduta dei capelli, alterazioni dello stato emotivo) o dopo un periodo di tempo maggiore (a lungo termine: difetti della crescita nei bambini, alterazioni endocrinologiche, rischio di infertilità e di neoplasie secondarie). Nel 2018, uno studio ha dimostrato come il frazionamento di dose (prassi comune in molti centri) conferisse un vantaggio in termini di ridotta tossicità mantenendo l'efficacia del trattamento, sovrapponibile alla somministrazione in dose unica<sup>(13)</sup>.

La causa più comune di fallimento terapeutico in pazienti trapiantati è la recidiva di malattia: è stato osservato che aumentare la dose di radiazioni somministrate durante il condizionamento risulta efficace per ridurre il rischio di recidiva di malattia, tuttavia, si associa ad una tossicità maggiore a lungo termine aumentano la probabilità di mortalità correlata al trapianto (TRM) senza dare un beneficio statisticamente significativo sull'*overall survival* (OS)<sup>(14)</sup>.

La TBI ha il vantaggio, rispetto ai farmaci, di non avere limitazioni d'effetto in riferimento a particolari santuari farmacologici (sistema nervoso centrale, testicolo), essa è tuttavia gravata da una significativa tossicità in acuto e a distanza.

La variabilità dei protocolli di condizionamento dipende innanzitutto dall'indicazione (neoplasia maligna o patologia non neoplastica), nonché dal *performance status* del paziente e dalle eventuali comorbidità.

Si distinguono tre categorie principali di protocolli di condizionamento, sulla base dell'intensità degli effetti della chemio-radioterapia sul midollo ematopoietico:

- Regimi mieloablativi (*mielo-ablative conditioning*, MAC): il trattamento causa una prolungata e profonda citopenia, generalmente irreversibile e fatale, che necessita dell'infusione di cellule staminali ematopoietiche per assicurare la ripresa del comparto midollare. I condizionamenti mieloablativi possono essere basati sulla TBI o sull'utilizzo di combinazioni di farmaci alchilanti. I protocolli attuali utilizzano come farmaci principalmente Busulfano e Ciclofosfamide in combinazione; vari

studi hanno dimostrato che questa terapia combinata BU/CY ha un'efficacia equivalente alla TBI + CY come condizionamento pre-trapianto allogenico in corso di leucemia mieloide acuta ma si preferisce ancora eseguire TBI + CY come condizionamento per la leucemia linfatica acuta<sup>(15)</sup>. Il Busulfano può essere somministrato per via orale oppure endovenosa: ha un assorbimento per via orale molto variabile e si associa a tossicità elevata e malattia veno-occlusiva se la concentrazione plasmatica diventa eccessivamente elevata, viceversa, un basso livello ematico del farmaco è associato ad aumento del rischio di rigetto di trapianto o di recidiva di malattia. Quasi tutti i centri eseguono quindi il *Targeted Drug monitoring* (TDM), ovvero il dosaggio somministrato viene modulato sulla base della busulfanemia dopo la prima dose in modo da raggiungere un livello *target* che è specifico a seconda dell'indicazione al TCSE. Altri farmaci sono stati introdotti nei regimi di condizionamento mieloablativi in combinazione variabile con la CY e TBI con l'intento di aumentare l'intensità dell'effetto e limitare la tossicità (Melphalan, Thiotepa, Etoposide, Treosulfano).

Questo approccio chemioterapico venne sviluppato nel 1983 come alternativa alla TBI con lo scopo di ridurre l'incidenza di complicanze a lungo termine indotte dalle radiazioni.

- Regimi non mieloablativi (*non-mieloablative conditioning*, NMA): tali protocolli sono stati primariamente ideati per rendere accessibile la procedura di TCSE anche a pazienti con età superiore a 50 anni in cui si osserva un aumento del rischio di tossicità e TRM<sup>(16)</sup>; tali pazienti hanno spesso comorbidità che impediscono l'esecuzione di un regime ablativo.

Tipicamente l'utilizzo di un NMA si associa a minima citopenia che è generalmente reversibile (non è necessario un *rescue* con CSE) e a tossicità moderata. Permette comunque di ottenere una buona immunosoppressione tramite un meccanismo di immuno-ablazione fondamentale per un completo attecchimento delle CSE del donatore; l'attecchimento è facilitato da un *graft* ricco di linfociti T e CD34<sup>+</sup> del donatore<sup>(17)</sup>.

Un esempio di regime non ablativo consiste nella somministrazione di Fludarabina combinata con Ciclofosfamide<sup>(18)</sup>.



La definizione di regime non mieloablativo si riferisce solo al processo di condizionamento: infatti il trapianto in sé potrebbe essere comunque mieloablativo perché i linfociti T del *Graft*, provenienti dal donatore, in molti casi eliminano nel lungo termine tutte le cellule ematopoietiche del ricevente permettendo l'instaurarsi di un chimerismo 100% donatore.

- Regimi a ridotta intensità (*reduced intensity conditioning, RIC*)

Tali protocolli si distinguono sia dai MAC che dai NMA poiché il recupero ematologico può avvenire spontaneamente a partire dalle cellule staminali ematopoietiche residue nel paziente e la citopenia causata dalla procedura può essere reversibile ma è generalmente prolungata. C'è quindi la necessità di un supporto con CSE per ridurre il rischio di mortalità e morbilità. Tali procedure consistono nella somministrazione di una dose ridotta, almeno del 30%, di alchilanti o TBI. Tipicamente prevedono la somministrazione combinata di Fludarabina con uno tra Melphalan, Busulfano, Thiotepa o TBI.

La mortalità trapianto correlata risulta ridotta con questo tipo di protocollo rispetto al regime mieloablativo <sup>(19)</sup>.

## 2.8. IMMUNOPROFILASSI

L'immunoprofilassi consiste nella somministrazione di farmaci immunosoppressivi al paziente, nel periodo precedente l'infusione di CSE (contemporaneamente al condizionamento) e successivo. Tali farmaci sono indispensabili nel prevenire complicanze quali lo sviluppo di GvHD e rigetto.

A partire dalla metà degli anni '80 la somministrazione di un inibitore della calcineurina (CNI) in associazione a Metotrexate (MTX) è stata ampiamente impiegata per la prevenzione della GvHD<sup>(20)</sup>.

Gli inibitori della calcineurina (Ciclosporina A e Tacrolimus) inibiscono l'attivazione di specifici fattori di trascrizione della famiglia NFAT (*nuclear factor of activated T-cell*), determinando una ridotta trascrizione di IL-2 e quindi una minor attivazione dei linfociti T effettori. La terapia con CNI generalmente viene avviata dall'inizio del condizionamento e viene proseguita per un periodo variabile a seconda dell'indicazione al trapianto (almeno 3-6 mesi in caso di patologia oncologica e almeno 12 mesi per patologia non-oncologica), della fonte di cellule staminali (almeno 30 giorni nel TCSE da sangue cordonale) e del

decorso clinico (insorgenza di GvHD). I possibili effetti tossici della terapia con CNI sono molteplici e comprendono danno renale, neurotossicità e danno endoteliale.

Il MTX è un antimetabolita analogo del folato che inibisce la proliferazione cellulare, contrastando perciò il danno d'organo da risposta allo-immune. L'immunoprofilassi con MTX prevede la somministrazione di 3 o 4 dosi di farmaco dopo l'infusione delle CSE, rispettivamente ai giorni +1, +3, +6, +11. La prima dose viene generalmente somministrata a 15 mg/m<sup>2</sup> mentre le successive a 10 mg/m<sup>2</sup>. A questi dosaggi la principale possibile complicanza della terapia con MTX è un peggioramento della mucosite e dell'epatotossicità eventualmente indotte dagli alchilanti utilizzati nel condizionamento.

Altri farmaci impiegati per la profilassi della GvHD sono le immunoglobuline anti-timociti (ATG), Micofenolato mofetile (MMF), inibitori di mTOR (Sirolimus), Ciclofosfamide, inibitori di JAK2, fotochemioterapia extracorporea, farmaci biologici quali Etanercept e Tocilizumab.

Le ATG sono un farmaco di primaria importanza in ambito trapiantologico, si tratta di immunoglobuline policlonali di coniglio purificate e pastorizzate. Esistono due formulazioni, caratterizzate da diversa capacità linfodepletiva e diverse proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche: le globuline anti-linfociti T umani (ATG *Grafalon*) sono ottenute da conigli immunizzati con cellule *Jurkat*, mentre le ATG *Thymoglobulin* sono ottenute da conigli immunizzati con timociti umani. Come per gli immunosoppressori precedentemente descritti, anche le ATG vengono somministrate con lo scopo di prevenire la GvHD ed il rigetto prima o contemporaneamente alla terapia di condizionamento. Entrambe le formulazioni sono attive non solo contro i linfociti T eventualmente residui dopo condizionamento, ma anche contro i neutrofili, i monociti, i linfociti B, le cellule NK e altre cellule non immuni (es. cellule endoteliali). Date le differenti modalità di produzione, le percentuali relative di anticorpi e quindi le specificità sono differenti e ciò giustifica l'utilizzo differenziato a seconda dell'indicazione e tipo di TCSE <sup>(21)</sup>.

Essendo Le ATG immunoglobuline di derivazione murina, si associano ad una certa tossicità immunomediata con possibili reazioni anche gravi come l'anafilassi, febbre, rash, brividi, ipotensione, tachicardia, sintomi gastrointestinali o respiratori e artralgie. Sembra che la dose e la velocità di somministrazione

possano incidere sulla comparsa di queste reazioni avverse ma non esiste ancora un consenso comune su quale sia la velocità di infusione raccomandata in pazienti pediatrici; più lungo è il tempo di somministrazione maggiore è il tempo in cui il paziente è soggetto a sviluppare reazioni avverse<sup>(22)</sup>.

Nel prevenire la GvHD, la combinazione ATG e CsA/MTX/MMF si è dimostrata significativamente superiore rispetto ai soli farmaci immunosoppressori, inoltre, i trapiantati riceventi ATG hanno dimostrato un'OS maggiore e una TRM minore rispetto ai non riceventi ATG<sup>(23)</sup>.

Anche l'uso della Ciclofosfamide nel periodo post infusione ha positivamente influenzato l'esito del trapianto: questo farmaco è capace di bloccare l'azione dannosa delle cellule linfocitarie preservando contemporaneamente le cellule staminali e dimostrandosi capace di limitare l'insorgenza di GvHD acuta e cronica<sup>(24)</sup>; trova largo impiego a seguito di trapianto da donatore aploidentico.

Un approccio alternativo alla terapia farmacologica consiste nella linfo-deplezione selettiva mediante manipolazione del *Graft* pre-infusione. Questa metodica ha contribuito ad aumentare l'impiego di CSE da donatori aploidentici.

La manipolazione del *Graft* deve necessariamente seguire le linee guide della *European Pharmacopoeia* ed il prodotto ottenuto deve essere autorizzato alla distribuzione. La procedura sussiste nel selezionare cellule staminali CD34<sup>+</sup> mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali che legano selettivamente tali cellule (tecnica *Miltenyi Biotec CD34<sup>+</sup> reagent system*); metodo che permette di ottenere un *Graft* ricco di CD34<sup>+</sup> e povero di linfociti T grazie al quale si riduce il rischio di sviluppare GvHD anche in trapianti aploidentici.

Risultati importanti si sono ottenuti grazie alla deplezione dei linfociti T realizzata mediante tecniche immuno-magnetiche (anticorpi disegnati contro epitopi specifici e coniugati con sfere magnetiche per catturare le cellule *target*):

- La deplezione di CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> permette di ridurre il rischio di GvHD e allo stesso tempo preservare un numero adeguato di cellule NK nel *Graft* per un rapido attecchimento;
- La deplezione di TcR  $\alpha/\beta$  dal *Graft* riduce la quota di linfociti alloreattivi e il rischio di GvHD, tale procedura si può associare alla deplezione di CD19<sup>+</sup> per ridurre il rischio di malattia linfoproliferativa post trapianto (PTLD).

Gli schemi di immunoprofilassi attualmente in uso riducono ma non eliminano il rischio di GvHD severa, che continua ad essere una significativa causa di morbilità dopo allo-TCSE, inoltre, l'immunosoppressione protratta aumenta il rischio di infezione, altra complicanza potenzialmente *life-threatening*, e contribuisce al rischio di recidiva di malattia. Sono attualmente in fase di studio diverse strategie alternative per la prevenzione della GvHD, tra cui l'impiego di farmaci biologici con attività antinfiammatoria (Tocilizumab) e la manipolazione del microbiota intestinale <sup>(25)</sup>.

## 2.9. INFUSIONE ED ATTECCHIMENTO

Le CSE sono un prodotto ematico che non deve mai essere irradiato, può essere necessario centrifugare il materiale raccolto per eliminare il sopranatante così da ridurre il volume da infondere in pazienti pediatrici. Il lavaggio del *Graft* è utile per rimuovere gli agenti coagulanti ed è eseguito con soluzione fisiologica. La deplezione degli eritrociti viene effettuata in caso di incompatibilità di gruppo sanguigno, così come può rendersi necessaria una selezione positiva o negativa e rimozione di specifiche popolazioni cellulari (mediante metodiche immunomagnetiche), come nel caso dei trapianti aploidentici.

L'infusione del *Graft* tramite catetere venoso centrale (CVC) inserito in vena succlavia o giugulare richiede un tempo variabile di alcune ore; le cellule dopo essere state infuse attraversano il circolo polmonare e splenico per poi migrare in nicchie midollari (*Homing*) dove proliferano e differenziano avviando il processo di ricostituzione ematopoietica.

L'attecchimento è il periodo necessario affinché compaiano stabilmente elementi maturi ritrovabili in periferia ed è definito dai seguenti valori:

- polimorfonucleati neutrofilici  $> 500/\text{mm}^3$  per tre giorni consecutivi
- piastrine  $> 50\ 000/\text{mm}^3$  per tre giorni consecutivi ad almeno 1 settimana di distanza dall'ultima trasfusione di PTL

La produzione di piastrine è l'*endpoint* della megacariocitopoiesi ed è un evento cardine per definire l'attecchimento del *Graft* che generalmente si verifica nell'arco di 2-3 settimane dopo la procedura. La funzione piastrinica è recuperata precocemente nei pazienti sottoposti a trapianto da sangue periferico rispetto ai riceventi sangue cordonale nei quali l'attecchimento piastrinico è ritardato<sup>(26)</sup>.

Dal giorno +1 dal trapianto si eseguono emocromi seriati per indagare i valori piastrinici: se il valore riscontrato è minore di  $10\,000/\text{mm}^3$  il paziente potrebbe sviluppare sanguinamenti spontanei che lo metterebbero a rischio per la vita (soprattutto se intracranici o alveolari), per cui si decide di trasfondere il paziente con piastrine fintanto che i valori misurati non superino tale *cut-off*<sup>(27)</sup>.

Talvolta può accadere che il paziente sia refrattario all'attecchimento piastrinico con valori che rimangono costantemente molto bassi anche a distanza di mesi dal trapianto con costante rischio di sanguinamento, le cause possono essere:

1. Non immunomediate: febbre, sepsi, coagulazione intravascolare disseminata, sindrome da occlusione sinusoidale, GvHD, ATG, splenomegalia, antibiotici.
2. Immunomediate: presenza di anticorpi che distruggono le piastrine infuse. Tali pazienti dovranno essere trasfusi con piastrine il più compatibili possibili per l'HLA.

Come per le piastrine, anche gli eritrociti possono richiedere settimane o mesi per normalizzarsi dopo il trapianto, motivo per cui può essere necessario supportare il paziente con delle trasfusioni di emazie concentrate se i valori di Hb scendono sotto 7-8 g/dl.

Il volume trasfuso viene calcolato in base al valore *target* di emoglobina che vogliamo raggiungere, il valore di partenza e il peso del paziente pediatrico.

*Volume (mL RBC): Target Hb after transfusion (g/dL) – pretransfusion Hb (g/dL) × 4 × weight (kg)*

Qualora il paziente necessitasse di numerose trasfusioni, si potrebbe sviluppare iperferritinemia e sovraccarico marziale con aumentato rischio di epatotossicità e mortalità trapianto-correlata.

Per documentare l'attecchimento si esegue l'analisi del chimerismo ematopoietico che consiste nella determinazione della proporzione di cellule di derivazione da donatore e derivazione da ricevente, nel sangue periferico e midollare, ricercando *markers* polimorfici e analizzando i frammenti di restrizione mediante metodiche di biologia molecolare quali *real-time-PCR*.

In alcune patologie non maligne è accettabile una situazione di chimerismo misto (immunodeficienze, osteopetrosi, talassemia, anemia aplastica, anemia falciforme), purché la quota di cellule di derivazione dal donatore sia sufficiente ad implementare l'ematopoiesi e le competenze immunitarie, nonché a

normalizzare la produzione enzimatica<sup>(28)</sup> mentre, nell'ambito delle patologie maligne si mira ad ottenere un chimerismo 100% donatore.

L'evidenza molecolare di cellule residue del ricevente nel primo periodo post-trapianto generalmente si riconduce alla proliferazione di cellule ematopoietiche normali del ricevente stesso; il loro successivo incremento spesso evolve verso la recidiva della malattia ematologica sottostante.

L'analisi della malattia residua minima, mediante tecniche molecolari o citofluorimetriche, è un esame più sensibile e specifico (poiché indaga *markers* malattia-specifici) per la diagnosi di recidiva rispetto allo studio del chimerismo ematopoietico, a cui in genere si affianca qualora sussista il sospetto clinico. Esistono, ma sono rari, casi di chimerismo misto a lungo termine in patologia oncologica senza recidiva di malattia.

Recentemente, l'analisi del chimerismo ha assunto ancora più importanza nel programmare interventi terapeutici per evitare il rigetto di trapianto e la recidiva di malattia. Le opzioni terapeutiche per convertire un chimerismo misto in completo comprendono la riduzione/sospensione dell'immunosoppressione, qualora questa sia ancora in atto, ed infusioni multiple di linfociti del donatore (DLI) a dosi crescenti ( $10^4$  e  $10^6$  cellule/kg) a seconda del tipo di donatore e del grado di *mismatch* HLA; maggiore è la dose di linfociti infusa, minore è il rischio di rigetto e di recidiva di malattia ma maggiore è il rischio di GvHD<sup>(29)</sup>.

## 2.10 RICOSTITUZIONE IMMUNOLOGICA POST TRAPIANTO ALLOGENICO

### Sistema immunitario innato

Le componenti del sistema immunitario innato (monociti, granulociti, cellule dendritiche e cellule *Natural Killer* NK) difendono l'organismo dalle infezioni; dopo TCSE, raggiungono valori normali generalmente entro un mese.

Successivamente all'infusione, si instaura un periodo di profonda neutropenia che dura circa 2-3 settimane prima che i neutrofili ricompaiono nel sangue periferico. La ricostruzione neutrofilica è generalmente più rapida in pazienti che ricevono cellule staminali da sangue periferico e da midollo rispetto ai riceventi sangue cordonale nei quali l'attecchimento avviene in media dopo i 30 giorni dal trapianto.

I neutrofili sono i globuli bianchi più numerosi riscontrabili nel sangue, sono granulociti e proteggono l'organismo da infezioni batteriche e fungine; nella fase neutropenica tali infezioni insorgono frequentemente. Se si osserva un ritardo di attecchimento dei neutrofili è possibile somministrare ai pazienti fattori di crescita per granulociti (G-CSF) ma, indipendentemente dall'uso di fattori stimolanti, tali cellule possono rimanere disfunzionali per alcuni mesi.

Le cellule *Natural Killer* (NK) sono globuli bianchi coinvolti sia nelle risposte immunitarie innate sia acquisite: difendono l'organismo da patogeni limitando o eradicando l'infezione ancora prima che si instauri una risposta linfocitaria T e B, esse riconoscono ed uccidono le cellule tumorali e le cellule infettate da virus mediante l'HLA di classe 1.

Le NK sono le prime a ricomparire nel sangue periferico dopo il trapianto acquisendo la loro piena funzione nell'arco di 2-4 settimane, soprattutto in riceventi *Graft* midollare o cordonale; un eventuale ritardo di ricostruzione è frequentemente osservabile in riceventi cellule staminali da sangue periferico e si associa a maggior sviluppo di infezioni.

Le cellule dendritiche (DC) sono le più importanti cellule in grado di presentare l'antigene nei linfonodi ai linfociti. Il sangue periferico è la fonte di cellule staminali con maggior numero di DC garantendo minor rischio di sviluppare infezioni post-trapianto ma alto rischio di sviluppare forme severe di GvHD<sup>(30)(31)</sup>.

### **Sistema immunitario acquisito**

I linfociti B sono le cellule protagoniste della risposta umorale: a seguito di stimolazione da un antigene specifico, possono proliferare e trasformarsi in plasmacellule (capaci di produrre anticorpi) e cellule della memoria.

La ricostruzione del compartimento cellulare B, dopo TCSE, avviene grazie alla proliferazione di cellule progenitrici che hanno raggiunto le nicchie midollari dopo l'infusione dando origine a linfociti B *naïve* che, maturando, lasciano il midollo osseo per entrare in circolo e localizzarsi negli organi linfoidei dove terminano la loro maturazione.

La maggioranza dei pazienti raggiunge livelli normali di B dopo 3 mesi dal trapianto ma la maturazione completa non si ottiene prima di 6-12 mesi accompagnandosi a maggior suscettibilità verso infezioni batteriche durante tutto il periodo.

La completa ripresa dei linfociti B dopo 3 mesi dal trapianto risulta più rapida nei pazienti che ricevono sangue midollare piuttosto che sangue periferico perché nel midollo ci sono un numero maggiore di progenitori.

I trapiantati hanno un valore di immunoglobuline significativamente minore rispetto alla popolazione sana e quindi una risposta antigene-specifica deficitaria per oltre un anno, indipendentemente dal tipo di sorgente cellulare utilizzata, predisponendo il paziente ad infezioni da batteri capsulati.

La capacità di produrre IgG antigene-specifica da parte di linfociti B della memoria viene gradualmente riacquisita tra il primo e secondo anno post TCSE mentre, il deficit di IgA può persistere per anni dopo il trapianto. Le immunoglobuline A vengono secrete nelle mucose e proteggono dalle infezioni a questo livello: in carenza di IgA il paziente può sviluppare ricorrenti infezioni gastrointestinali e sino-polmonari.

Complessivamente si è osservato che il raggiungimento di valori normali di immunoglobuline nei pazienti trapiantati è ritardato dall'insorgenza di quadri medio-gravi di GvHD o nei riceventi siero anti-timocitario.

Un paziente trapiantato perde tutte le immunità acquisite nell'infanzia, le vaccinazioni sono riproposte dopo 3-6 mesi dalla procedura così da promuovere una ricostruzione immunologica adeguata. È meglio evitare di vaccinare pazienti che assumono rituximab o immunoglobuline, che sviluppino severe forme di GvHD o che assumono farmaci immunosoppressivi; in questi casi non solo la



vaccinazione non sarebbe efficace ma il paziente potrebbe sviluppare la malattia per cui lo si sta vaccinando se il vaccino fosse costituito da patogeni vivi attenuati. I linfociti T giocano un ruolo importante sia nel sistema immunitario innato, sia nel sistema immunitario acquisito, essi maturano nel timo dove riarrangiano il loro recettore di superficie (TCR). Si distinguono principalmente in linfociti T citotossici ( $CD8^+$ ), responsabili dell'immunità cellulo-mediata, attivi contro patogeni intracellulari come i virus o contro le cellule tumorali, e linfociti T *Helper* ( $CD4^+$ ) che riconoscono ed espongono *markers* di superficie svolgendo un ruolo importante nel riconoscimento e nella cooperazione tra cellule immunitarie. I linfociti T sono generalmente implicati nel rigetto di trapianto.

La loro ricostruzione post TCSE si estrinseca in due fasi:

- La prima fase è timo-indipendente e dipende dall'espansione clonale dei linfociti T maturi trasferiti dal donatore al paziente mediante il *Graft*. Tale evento è garantito da un'ambiente linfopenico, abbondanti citochine stimolanti quali IL2 e il deficit di linfociti T regolatori che, se presenti, ne bloccherebbero l'espansione. L'espansione periferica dei linfociti T riguarda tipicamente i T  $CD8^+$  che aumentano esponenzialmente di numero; questi  $CD8^+$  oligoclonali non sono stati selezionati tramite un meccanismo di tolleranza del *self* a livello timico e potrebbero favorire la comparsa di GvHD acuta.
- La seconda fase è timo-dipendente: le cellule  $CD34^+$  infuse durante la procedura, raggiungono le nicchie midollari dove proliferano e si avviano verso un processo di maturazione che termina nel timo con lo sviluppo di un ampio *repertoire* di recettori transmembrana e la selezione di linfociti T non auto-reattivi. Nel passaggio di linfociti T immaturi attraverso il timo si realizza un *cross-talk* tra linfociti stessi (provenienti dal donatore) e le cellule epiteliali timiche del paziente, qui vengono eliminati per apoptosi quei linfociti con alta affinità per le cellule *self*, responsabili di eventi autoimmunitari post trapianto come GvHD.

Numerosi fattori possono disturbare l'ambiente timico e rallentare la ricostruzione immunitaria T: chemio-radioterapia, terapia steroidea, infezioni.

Le cellule  $CD8^+$  tendono a normalizzarsi entro un anno dal trapianto mentre i T  $CD4^+$  si normalizzano più lentamente, per questo motivo si verifica un'inversione

del rapporto CD4/CD8 (v.n. 1,3-1,5) che persiste per molti anni fino alla completa ripresa di funzionalità del timo.

Un buon marker surrogato per valutare l'espansione di linfociti T maturati nel timo sono i frammenti "*T cell receptor excision circles*" (TRECs) ritrovabili in circolo; valori di TRECs maggiori di 2000 copie/mm<sup>3</sup> ad un anno dal trapianto si associano ad aumentata sopravvivenza dei pazienti e miglior risposta immunitaria. La dose cellulare di CD34<sup>+</sup> infusa correla con la conta dei CD4<sup>+</sup> post TCSE: il sangue periferico è una sorgente cellulare molto ricca di queste cellule motivo per cui la ripresa linfocitaria T è più veloce in questi pazienti a differenza di coloro che ricevono sangue midollare o cordonale.

Il deficit nella ricostituzione immunitaria del compartimento T comporta lo sviluppo di infezioni opportunistiche, fenomeni allo-immuni (GvHD) e aumento della mortalità associata a recidiva di malattia<sup>(30)(31)</sup>.

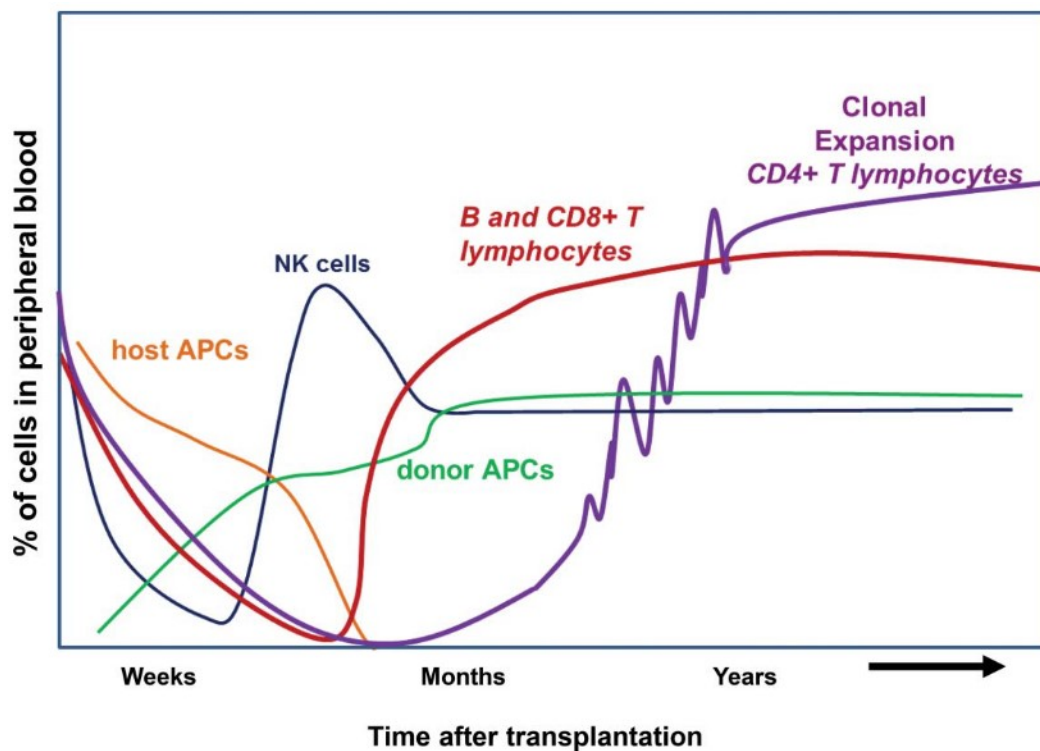


Figura 6-Tempo di ricostruzione immunologica<sup>(30)</sup>

## 2.11. COMPLICANZE DEL TRAPIANTO

Le complicanze del TCSE si distinguono in precoci quando insorgono entro cento giorni dalla procedura: nausea e vomito sono fra gli effetti collaterali più debilitanti nei primi giorni dopo il TCSE principalmente a causa della chemio/radioterapia, altre complicanze sono la mucosite, la sindrome da attecchimento, la sindrome da ostruzione sinusoidale, il danno d'organo (fegato e rene soprattutto), microangiopatia trombotica, *Graft failure e poor Graft function*, rigetto e GvHD acuta e cronica.

A distanza dal trapianto possono verificarsi complicanze tardive quali ipogonadismo, difetti di accrescimento, cataratta, insufficienza multiorgano e tumori secondari per cui il paziente verrà seguito nel follow up a lungo termine.

Le complicanze infettive e la recidiva di malattia possono verificarsi in ogni momento dopo il TCSE.

### **Mucosite**

La mucosite rappresenta una complicanza molto frequente del condizionamento, sia dopo TCSE autologo che allogenico: gli agenti citotossici provocano un danno alle cellule proliferanti dello strato basale delle mucose e ne determinano una temporanea perdita di integrità e della funzione di barriera protettiva contro i patogeni, favorendo l'instaurarsi di infezioni opportunistiche. Presentazioni tipiche sono il dolore addominale, la diarrea e la stomatite. La gestione prevede l'avvio precoce della nutrizione parenterale, il supporto analgesico con farmaci oppioidi e l'uso di antibiotici in caso di rialzo febbrile.

### **Sindrome da attecchimento e *Capillary leak Syndrome***

La fase di attecchimento dei granulociti neutrofili può essere complicata da due sindromi infiammatorie acute, ovvero la sindrome da attecchimento e la *Capillary leak syndrome*. Entrambe queste entità sono dovute al rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL1, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) in risposta al contatto tra le cellule del donatore e i tessuti del ricevente. Queste complicanze possono manifestarsi sia dopo TCSE autologo che allogenico.

La *capillary leak syndrome* è la più frequente fra le due e si manifesta soprattutto dopo un regime di condizionamento mieloablattivo. Essa si manifesta clinicamente con incremento ponderale, edema generalizzato, ipotensione, insufficienza renale

pre-renale, ascite, versamento pleurico e pericardico. Tipicamente la *capillary leak syndrome* insorge da 1 a 3 giorni prima della ripresa dei neutrofilo, documentata da una conta assoluta dei neutrofilo nel sangue periferico misurabile. La gestione clinica prevede cure di supporto volte ad una negativizzazione del bilancio idrico mediante l'uso di diuretici, mentre non è routinario l'utilizzo di steroidi.

La presentazione clinica della sindrome da attecchimento può variare da un quadro moderato ad auto-risoluzione con eritema cutaneo e febbre elevata, a quadri più severi con incremento ponderale acuto, edema polmonare o altri segni di danno d'organo (fegato, rene) talora con encefalopatia. La Sindrome da attecchimento insorge in genere poco dopo l'inizio della ripresa dei neutrofilo. Il trattamento prevede una terapia *short-course* con steroidi per via endovenosa (in genere di durata inferiore ai 7 giorni), insieme con terapie di supporto in particolare rivolte ad un ottimale gestione del bilancio dei fluidi mediante l'impiego di diuretici<sup>(32)</sup>.

### **Danno renale**

Il rene è un organo frequentemente oggetto di tossicità nel primo periodo post trapianto. Molti pazienti sottoposti a TCSE presentano già un certo grado di disfunzione renale preesistente che può peggiorare dopo il trapianto. L'interessamento renale può essere dovuto a danno tubulare, compromissione del flusso ematico renale e ad ostruzione o irritazione delle vie escrettrici. Il danno renale compromette la capacità di mantenere l'equilibrio acido-base e il bilancio idro-elettrolitico, così come la clearance di potenziali agenti tossici. I principali responsabili del danno renale sono i farmaci impiegati nel primo periodo post trapianto quali gli inibitori della calcineurina, agenti antimicotici (in particolare l'Amfotericina B liposomiale), antibiotici (aminoglicosidi) e agenti antivirali (Aciclovir, Foscarnet, Ganciclovir). Agenti impiegati nel condizionamento quali gli alchilanti e l'irradiazione corporea totale possono altresì causare una nefrotossicità significativa. La cistite emorragica secondaria all'infezione da BK virus rappresenta una possibile complicanza post TCSE.

### **Danno epatico e sindrome da ostruzione sinusoidale**

La patogenesi del danno epatico dopo il TCSE è ascrivibile a diversi fattori, tra cui farmaci epatotossici (antibiotici, immunosoppressori, chemioterapici), nutrizione parenterale totale, sovraccarico marziale e stato settico. Le più comuni forme di epatotossicità post trapianto, sono: l'ipertransaminasemia (più spesso asintomatica ad auto-risoluzione, ma può indicare un danno d'organo significativo), la sindrome da ostruzione sinusoidale (SOS), la GvHD acuta epatica e le infezioni che coinvolgono il fegato.

La *sindrome da ostruzione sinusoidale* è caratterizzata da epatomegalia, ittero e ascite che si osservano dopo il TCSE. Tra i fattori di rischio per lo sviluppo di questa complicanza si annoverano l'età del ricevente e il sesso, il trapianto allogenico con *mismatch* HLA e il condizionamento mieloablativo. La presentazione clinico-laboratoristica della sindrome in genere insorge nel primo mese dopo il trapianto mentre, la gravità del quadro è variabile da forme più lievi a forme *life threatening*.

I criteri storicamente impiegati per la diagnosi della SOS nei pazienti pediatrici sono<sup>(33)</sup>:

- rialzo della bilirubina totale (> 2mg/dL);
- l'epatomegalia con dolore in ipocondrio destro;
- sovraccarico di liquidi con incremento ponderale acuto (>5% del peso corporeo).

Il *workup* diagnostico comprende l'ecografia epatica con studio *doppler* del flusso portale e l'unica opzione terapeutica approvata consiste nella somministrazione di Defibrotide, un agonista del recettore dell'adenosina che svolge un ruolo protettivo nei confronti dell'endotelio.

Nelle forme moderate e severe è di fondamentale importanza una giudiziosa gestione della fluidoterapia massimizzando la diuresi e garantendo una buona perfusione renale, talora può essere necessario ricorrere all'utilizzo di diuretici, alla paracentesi o alla terapia renale sostitutiva<sup>(34)</sup>.

### **Complicanze endoteliali**

La microangiopatia trombotica associata al trapianto (*transplant associated thrombotic microangiopathy*, TA-TMA) è una complicanza che riconosce come momento patogenetico fondamentale una disfunzione endoteliale causata da alti livelli di mediatori dell'inflammazione quali IL1 e TNF- $\alpha$ .

Clinicamente è caratterizzata da anemia microangiopatica, trombocitopenia, insufficienza renale con ipertensione e sintomi neurologici.

I fattori di rischio per la TA-TMA sono l'utilizzo di inibitori della calcineurina, regimi di condizionamento mieloablativi, GvHD, infezioni, età avanzata e sesso femminile.

Il trattamento farmacologico prevede l'utilizzo di inibitori del complemento come l'Eculizumab poiché sembra che vi sia una disregolazione della cascata del complemento alla base del danno endoteliale<sup>(35)</sup>.

### **Graft failure**

Il mancato attecchimento dei precursori ematopoietici dopo il trapianto viene definito *Graft failure*. Se ne distinguono due tipi:

- *Primary Graft failure*: non avvenuto attecchimento di neutrofili e piastrine al giorno +28 nel caso di TCSE da sangue midollare e periferico o al giorno +42 nel caso TCSE da sangue cordonale;
- *Secondary Graft failure*: perdita dell'attecchimento dei neutrofili dopo un iniziale attecchimento. È definito da una conta di neutrofili inferiore a 500/mm<sup>3</sup> (non attribuibile a infezione, farmaci o progressione di malattia) per tre giorni consecutivi con una perdita del chimerismo del donatore.

L'incidenza della *Graft failure* è variabile tra 1 e 3% per l'autotrapianto e tra 2 e 20% per l'allograpianto, a seconda della fonte di cellule staminali (rischio maggiore nel trapianto da sangue cordonale fino al 20%) e del tipo di donatore (rischio del 2% nel trapianto da donatore MSD e del 9-12% per il trapianto MUD). Il mancato attecchimento rappresenta una condizione ad elevata morbilità e mortalità. In tale circostanza gli interventi possibili sono la somministrazione di una dose supplementare (*booster*) di cellule CD34+ del donatore, l'infusione di linfociti del donatore (DLI) o la stimolazione dei precursori ematopoietici con G-

CSF. Se queste misure non risultassero efficaci c'è indicazione all'esecuzione di un secondo TCSE per il ripristino dell'emopoiesi<sup>(36)</sup>.

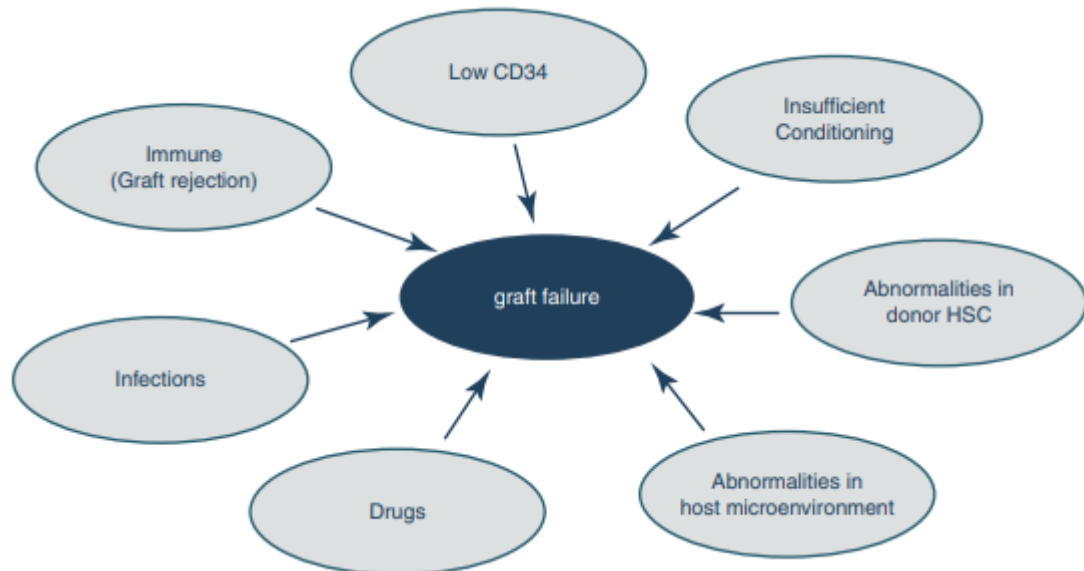


Figura 7 - Eziologia multifattoriale del Graft failure<sup>36</sup>

### Rigetto

Il rigetto rappresenta una causa di *Graft failure* dopo TCSE allogenico immunologicamente mediata dalla risposta linfocitaria *Host-versus-Graft*, probabilmente rivolta contro antigeni minori di istocompatibilità. Il rigetto può essere precoce entro un mese dall'infusione in assenza di attecchimento (*Primary Graft rejection*) o più tardivo, successivamente ad un iniziale attecchimento (*Secondary Graft rejection*). I meccanismi che determinano le varie tipologie di rigetto sono diversi e possono essere legati alla presenza/produzione di anticorpi (rigetto umorale) o dall'attivazione diretta di cellule del sistema immunitario, i linfociti (rigetto cellulare). Nel caso del rigetto cronico la causa è probabilmente multifattoriale<sup>(37)</sup>.

L'introduzione della terapia con i farmaci immunosoppressori, le ATG e l'infusione di linfociti del donatore (DLI) hanno ampiamente aumentato la sopravvivenza dopo i trapianti riducendo il rischio di rigetto; l'uso di tali farmaci, tuttavia, può determinare una condizione di immunodepressione con conseguente aumentata suscettibilità alle infezioni.

### **Malattia del trapianto contro l'ospite acuta (aGvHD)**

La malattia del trapianto contro l'ospite acuta (*Acute Graft versus Host Disease*) rappresenta la principale causa di morbidità e mortalità dopo il TCSE allogenico. Essa è conseguente all'attecchimento e all'attivazione di linfociti T del donatore contro antigeni del ricevente, siano essi appartenenti al complesso maggiore di istocompatibilità o a complessi di istocompatibilità minori.

L'eziopatogenesi prevede tre fasi: inizialmente un danno tissutale multiorgano indotto dal condizionamento provoca l'esposizione di antigeni cellulari presentati dalle APC a cui segue, dopo l'infusione, la proliferazione di linfociti T del donatore che si attivano contro gli antigeni del ricevente esplicando la loro funzione citotossica e pro-infiammatoria liberando IL1 e TNF- $\alpha$  e causando necrosi tissutale estesa.

I fattori di rischio implicati in questa complicanza sono principalmente la presenza di disparità riguardante diversi loci HLA e la somministrazione di TBI ad alte dosi<sup>(38)</sup>.

La clinica varia da forme lievi ed autolimitanti a forme severe responsabili del decesso del paziente con danni a carico degli epitelii.

Gli organi bersaglio e la sintomatologia clinica sono:

- cute e mucosa (rash eritematosi, bolle e desquamazione);
- fegato (colestasi con ittero ed aumento transaminasi);
- tratto gastrointestinale (anoressia, nausea, vomito, diarrea acquosa/infiammatoria, dolori addominali).

Esiste una stadiazione di gravità organo-specifico e, in caso di GvHD multisistemica, i vari fattori si combinano a dare il *grading* complessivo<sup>(39)</sup> che ha significato prognostico, come riportato nella seguente tabella.



<b>Stadio</b>	<b>Cute (Rash maculo- papulare % SC)</b>	<b>Fegato (BT mg/dL)</b>	<b>Tratto gastro- intestinale (feci mL/die)</b>
0	Assenza di Rash	<2	<500 mL/die
1	25%	2-3	500-1000 mL/die
2	25-50%	3.1-6	1.000-1.500 mL/die
3	>50%	6.1-15	>1.500 mL/die
4	Eritroderma generalizzato, bolle/desquamazione	>15	Dolore addominale severo +/- ileo +/- sanguinamento
<b>Grading</b>			
I	<b>Stadio 1-2</b>	-	-
II	<b>Stadio 3</b>	<b>Stadio 1</b>	<b>Stadio 1</b>
III	+/- Stadio 1-3	<b>Stadio 2-3</b>	<b>Stadio 2-4</b>
IV	<b>Stadio 4</b>	<b>Stadio 4</b>	+/- Stadio 1-4

*Tabella II -Classificazione della GvHD acuta*

Il trattamento dell'aGvHD dipende essenzialmente dalla gravità con cui si manifesta: nelle forme esclusivamente cutanee è possibile usare steroidi topici mentre le forme più avanzate richiedono una terapia con alte dosi di metilprednisolone 2/mg/kg/die per 7-14 giorni seguito da scalo graduale<sup>(40)</sup>, esponendo il paziente ad un alto rischio infettivo che necessariamente deve essere prevenuto mediante profilassi antimicrobiche.

Non esiste consenso circa il trattamento delle forme di aGvHD corticoresistenti o che recidivano allo scalo/sospensione dello steroide (corticodipendenti), le opzioni disponibili sono state discusse nella sezione "immunoprofilassi"; si ricorda che la scelta dell'agente da utilizzare è influenzata da molteplici fattori (caratteristiche della GvHD, *performance status* e comorbidità del paziente, esperienza del Centro).

### Relazione tra aGvHD e cGvHD

Le manifestazioni cliniche sono determinanti nel definire se la sindrome di GvHD sia acuta o cronica. In passato questa distinzione veniva fatta puramente su un criterio temporale (insorgenza prima o dopo i cento giorni dal trapianto) mentre le classificazioni più recenti si focalizzano su altri criteri identificando anche quadri intermedi di *overlap*:

- GvHD acuta classica, con sintomatologia precedentemente indicata che compare entro cento giorni dal trapianto;
- GvHD ad insorgenza tardiva o persistente, è caratterizzata da sintomi tipici della forma acuta che compaiono dopo i cento giorni dal trapianto o persistono oltre questo tempo, in assenza di sintomi riconducibili a GvHD cronica discussi nel prossimo paragrafo;
- GvHD cronica classica senza *overlap* con la forma acuta;
- GvHD cronica con *overlap* con la forma acuta.

Il termine *overlap* si riferisce alla presenza di 1 o più manifestazioni tipiche di aGvHD in paziente con diagnosi di cGvHD (possono essere già presenti alla diagnosi o svilupparsi successivamente). Nelle forme miste si tende ad osservare la risoluzione del quadro acuto più rapidamente tramite trattamento farmacologico mentre il quadro cronico tende a persistere<sup>(41)</sup>.

### **Malattia del trapianto contro l'ospite cronica (cGvHD)**

La malattia del donatore contro il ricevente cronica, parimenti alla forma acuta, costituisce la principale causa di mortalità non correlata a recidiva nei primi anni dopo il TCSE. Nonostante i miglioramenti in ambito trapiantologico, l'incidenza di cGvHD è in aumento e i fattori di rischio associati sono: donatore *mismatched* o aploidentico, l'età più elevata dei riceventi, utilizzo di PBSC come fonte cellulare e l'aumento della sopravvivenza dei pazienti<sup>(42)</sup>.

La fisiopatologia della cGvHD implica multiple interazioni tra linfociti T e B alloreativi e disfunzionali, attivazione del sistema immunitario innato (macrofagi, cellule dendritiche e neutrofili) e di *pathway* pro-fibrotici. Tale quadro è caratterizzato da uno squilibrio tra l'elevato numero di effettori dell'immunità che inducono l'infiammazione e il *deficit* di meccanismi regolatori che possano mantenere la tolleranza immunologica.

Questa deregolazione immunitaria provoca danni tissutali che esitano nell'attivazione dei fibroblasti, deposizione di collagene, fibrosi e danno multiorgano irreversibile.

Gli organi più colpiti sono cute, occhi, mucosa orale, fegato, polmoni, tratto gastrointestinale, articolazioni e genitali.

A livello muco-cutaneo possono comparire lesioni simil *lichen-planus*, sclerosi, eritemi ed ulcere, vitiligine, lesioni papulosquamose, distrofia ungueale e alopecia che sono alterazioni tipiche della GvHD cronica. Spesso le mucose di bocca e genitali subiscono alterazioni sclerotizzanti ed ipercheratosiche con comparsa di sindrome secca poiché le ghiandole esocrine riducono le loro secrezioni determinando xerostomia e secchezza vaginale che si accompagnano a dolore.

Negli occhi si riduce la lacrimazione e insorgono congiuntiviti, fotofobia e cataratta.

Il danno epatico può manifestarsi con colestasi, aumento delle transaminasi ed evoluzione verso cirrosi mentre a livello gastrointestinale si evidenziano disfagia, nausea e vomito, diarrea cronica e malassorbimento; nei casi più gravi si instaura un'insufficienza pancreatica.

Le complicanze polmonari comprendono bronchioliti e alveoliti che esitano in fibrosi interstiziale e polmoniti ostruttive. In questo contesto, lo sviluppo di fibrosi polmonare in corso di cGvHD sembra essere correlato ad una continua stimolazione antigenica che esita in infiammazione cronica e riparazione aberrante del danno tissutale.

La diagnosi definitiva di cGvHD polmonare si esegue tramite esame istopatologico su biopsia transbronchiale e i pazienti devono essere seguiti in *follow up* per una continua valutazione della funzionalità polmonare residua mediante spirometrie. La riduzione della FEV1, rispetto ai valori normali per pazienti pediatrici, è l'indice utilizzato per definire la gravità dell'interessamento polmonare.

La patologia polmonare è aggravata dal sovrapporsi di altre condizioni tipiche della cGvHD quali la miopatia che riduce la forza dei muscoli respiratori, la sclerosi cutanea con effetto restrittivo e il deficit di IgA che proteggono le mucose dal rischio infettivo.

La clinica è variabile da forme asintomatiche o con lieve dispnea a quadri con tosse, dispnea grave e intolleranza all'attività fisica, se il danno progredisce il

paziente sviluppa gravi difficoltà respiratorie anche a riposo e ossigeno dipendenza. Spesso la diagnosi è tardiva e ciò influisce anche sulla prognosi poiché non vi sono trattamenti efficaci per quadri polmonari francamente fibrotici<sup>(43)(44)</sup>.

La cGvHD può manifestarsi anche con fascite che porta a ridotta mobilità articolare, miosite e debolezza muscolare con crampi e dolori diffusi. Quadro esacerbato dall'assunzione di glucocorticoidi che a loro volta causano miopatia.

Nel complesso la gravità della cGvHD dipende sia dal numero di organi coinvolti dal danno immunomediato sia dal grado di disfunzionamento dei singoli organi; l'interessamento polmonare è emblematico nel definire quadri con gravità maggiore.

La sintomatologia clinica e i test di laboratorio/radiologici/istologici sono dirimenti per definire la gravità complessiva della cGvHD e delinearne una classificazione.

In *appendice 1* sono riportati gli score per definire il grado di coinvolgimento dei singoli organi attribuendo un valore 0-3 a seconda della gravità mentre, in tabella III sono riportati di stadi di classificazione della cGvHD.

Nelle forme lievi di cGvHD il danno è limitato alla cute e può essere trattato con steroidi topici o fototerapia; nelle forme moderate o gravi sono danneggiati almeno tre organi ed è richiesto un trattamento sistemico con steroidi (MPDN 1 mg/kg/die) eventualmente in combinazione con CNI o altri farmaci immunosoppressori e biologici in seconda linea. Non esistono anche in questo caso delle indicazioni terapeutiche standard.

Stadio (Global Severity of chronic GvHD)	Organi Coinvolti	Danno Polmonare
Lieve	1 o 2 organi coinvolti (score di danno massimo 1)	No interessamento polmonare
Moderata	3 o più organi coinvolti (score di danno massimo 1) o Almeno un organo coinvolto (non polmone) con score di danno 2	Danno polmonare assente o Danno polmone di score 1 in assenza di altri organi coinvolti
Severa	Almeno un organo coinvolto con score di danno 3	Danno polmonare di score 2 o 3

*Tabella III - Classificazione della GvHD cronica*

### **Tumori secondari**

I tumori secondari sono responsabili del 5-10% delle morti nei due anni successivi al trapianto, frequentemente si tratta di disturbi linfoproliferativi correlati a EBV (PTLD), neoplasie ematologiche, tumori solidi<sup>(45)</sup>.

La PTLD consiste nella proliferazione incontrollata di cellule neoplastiche (linfociti e plasmacellule) in un contesto di immunosoppressione post trapianto, causata dalla latenza virale del virus di Epstein-Barr. Si manifesta con linfadenomegalia ed epatosplenomegalia e alti livelli di EBV-DNA nel sangue, in prima linea di trattamento si usa il Rituximab, un anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene CD20 esposto sui linfociti B, chemioterapia e riduzione dell'immunosoppressione.

Il condizionamento, la chemioterapia post trapiantologica e la radioterapia *Total body* sono caratterizzati dall'essere particolarmente citotossici predisponendo il paziente a sviluppare neoplasie ematologiche secondarie quali leucemie mieloidi

ma anche neoplasie solide spesso a carico di tessuti ghiandolari, cervello e tessuti molli (sarcomi).

La tiroide è un organo ghiandolare in cui originano spesso tumori solidi secondari per cui è raccomandato un controllo annuale post-TCSE mediante palpazione per identificare eventuali noduli. Ecografia e *Fine Needle Aspiration Cytology* si eseguono qualora fossero presenti neoformazioni sospette. Nonostante i pazienti sottoposti a TBI o radiazioni del distretto testa-collo siano più a rischio di sviluppare questa complicanza, tutti i trapiantati vengono sottoposti allo screening.

### **Disordini endocrinologici e fertilità**

La malattia di partenza, il condizionamento, lo sviluppo di GvHD e il trattamento prolungato con corticosteroidi sono fattori che contribuiscono al rischio di sviluppare alterazioni endocrinologiche motivo per cui, negli anni successivi al trapianto, si effettuano *follow up* sistematici per diagnosticare e trattare eventuali difetti prima che determinino quadri clinici gravi. Le anomalie più frequenti sono a carico della tiroide con ipotiroidismo e tiroiditi autoimmuni che vengono indagati con esami di laboratorio periodici mentre, i surreni sono implicati nello sviluppo di insufficienza corticosurrenalica e atrofia secondaria all'utilizzo di corticosteroidi a scopo immunosoppressivo per un periodo prolungato.

La TBI causa un danno a carico di ipotalamo ed ipofisi che si manifesta con difetto di crescita dei bambini dopo TCSE che potrebbe essere risolto mediante somministrazione di *Growth Hormone*; non ci sono però linee guida specifiche a tal proposito perché è stato evidenziato un incremento del rischio di sviluppare tumori secondari in pazienti che assumono GH e che hanno già avuto una neoplasia quindi si tende a somministrarlo solo se il difetto di crescita è severo.

Per quanto concerne la funzionalità gonadica si ricorda che l'apparato riproduttivo in entrambi i sessi, per funzionare normalmente, richiede l'integrità delle cellule germinali e dell'asse ipotalamo-ipofisi; nelle donne, inoltre, l'utero deve essere sia recettivo all'impianto del prodotto del concepimento che capace di portare avanti una gravidanza. La chemioterapia e le radiazioni possono apportare un danno all'intero apparato e compromettere definitivamente la possibilità di riprodursi. Prima di iniziare il percorso terapeutico è opportuno informare i pazienti di questi potenziali effetti collaterali e discutere la possibilità di attuare strategie di

preservazione della fertilità (criopreservazione dello sperma per maschi in età post-pubere e criopreservazione di ovociti o tessuto ovarico nella donna)<sup>(36)</sup>.

### **Recidiva di malattia**

La recidiva di malattia è tra le più frequenti cause di morte dopo TCSE per patologia oncologica.

Le recidive si evidenziano spesso in pazienti trattati per leucemia linfatica acuta (ALL) e leucemia mieloide acuta (AML) aggressive e ad alto rischio: durante il condizionamento, alcuni cloni resistenti possono essere selezionati ed accumulare ulteriori mutazioni in risposta alla pressione selettiva della chemioterapia divenendo resistenti a trattamenti successivi. Altro meccanismo di *Immune Escape* che può portare alla recidiva è il cosiddetto *HLA-mismatch Loss*, ovvero la perdita da parte delle cellule tumorali di quella differenza HLA rispetto al donatore, che le rende capaci di evadere il controllo operato dai linfociti T alloreattivi derivanti dal *Graft*<sup>(46)</sup>. Ciò è dimostrato soprattutto nel caso del TCSE aploidentico in cui viene persa l'espressione di un intero aplotipo, ovvero quello non condiviso<sup>(47)</sup>.

Per evidenziare precocemente eventuali recidive di malattie maligne ematologiche è necessario che il *follow up* del paziente comprenda la determinazione periodica della malattia minima residua (MRD) midollare, molecolare o citofluorimetrica, metodica molto sensibile nell'identificare cellule poco rappresentate nel prelievo.

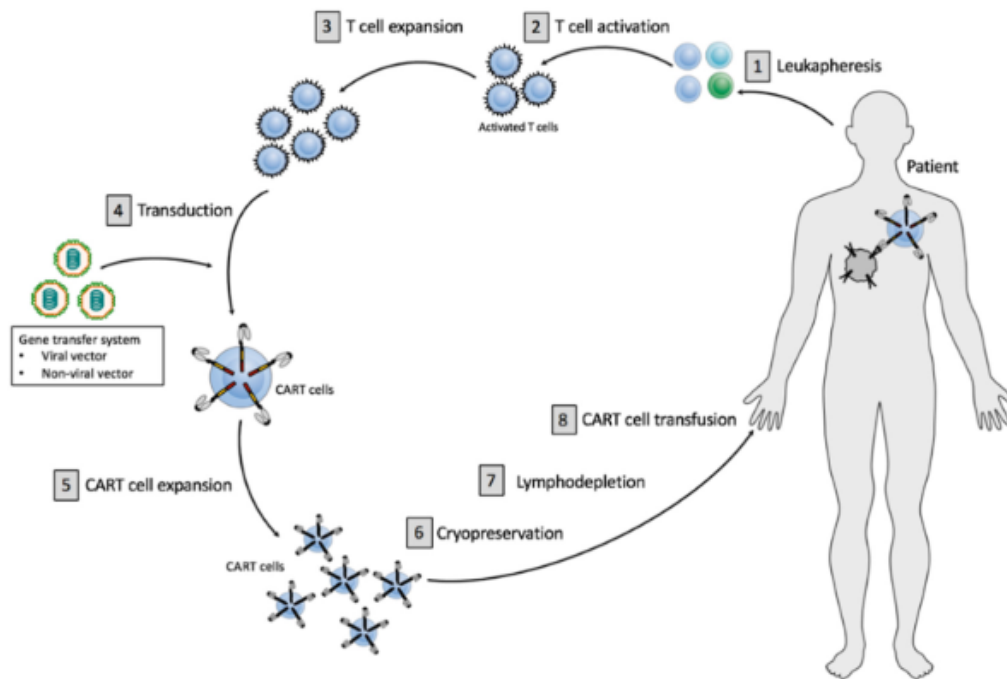
Il valore misurato di MDR è un forte fattore prognostico in termini di recidiva di malattia e sopravvivenza, determinate per decidere l'entità della chemioterapia adiuvante post TCSE.

Alto rischio di recidiva viene definito da un valore di MDR dopo 3 mesi dal TCSE maggiore o uguale  $5 \cdot 10^{-4}$  misurato tramite *RT-PCR*<sup>(48)</sup>.

La prevenzione e il trattamento delle recidive si basano sull'infusione di linfociti da donatore, sull'intensificazione della chemioterapia e sulla somministrazione di farmaci che colpiscono selettivamente recettori e *pathways* delle cellule tumorali sulla base delle loro mutazioni specifiche.

Opzioni terapeutiche aggiuntive che in anni recenti sono sempre più ampiamente utilizzate comprendono tutte quelle misure di immunoterapia quali il trattamento con anticorpi monoclonali bispecifici o con cellule T esprimenti un recettore chimerico (CART).

Le cellule CART sono un prodotto di ingegneria genetica che combina la dinamica delle cellule T con la specificità anticorpale verso un antigene, in questo modo tali cellule possono riconoscere e legare antigeni tumorali ed attuare la reazione citotossica verso il tumore. Le CART Cell utilizzate in clinica sono attive contro CD19 espresso in molte neoplasie maligne dai linfociti B ma si sta cercando di aumentare il numero di *target* aggredibili da questo tipo di cellule<sup>(49)</sup>.



*Figura 8 - Principi della terapia con CART Cell: il processo di produzione delle cellule CART prevede l'iniziale isolamento dei linfociti T del paziente mediante leucoafèresi, l'attivazione e l'espansione in vitro delle cellule prelevate. Successivamente si trasferisce il gene esprimente l'anticorpo antigene-specifico di interesse creando la vera e propria CART che, previa riespansione in vitro, viene trasfusa nel paziente per ottenere l'azione immunomediata contro il tumore<sup>(49)</sup>.*

### **Complicanze infettive**

Lo spettro delle infezioni successive al TCSE è correlato alla cinetica della ricostituzione immunitaria. Tale complicanza è responsabile del 15-30% delle morti nei primi cento giorni dal trapianto e del 10-40% delle morti successive ai cento giorni.

Nei primi 30 giorni dalla procedura, i danni mucosali secondari al condizionamento e lo stato di aplasia midollare in cui verte il paziente predispongono allo sviluppo di numerose infezioni derivate dalla flora batterica endogena e causate da Stafilococchi, Enterococchi, batteri gram<sup>-</sup> intestinali e



Clostridium Difficile; anche infezioni fungine da Candida e Aspergillo possono insorgere in questo periodo.

In questa fase il rischio di infezioni è sovrapponibile per i pazienti sottoposti ad autotrapianto o a trapianto allogenico. L'insorgenza di febbre in corso di neutropenia dopo il TCSE viene gestita con la somministrazione di terapia antibiotica empirica dato che solo in una minoranza dei casi è possibile isolare un patogeno mediante indagini colturali.

Le infezioni virali costituiscono una complicanza rilevante secondaria sia al disfunzionamento immunitario post-trapianto sia allo sviluppo di GvHD, si distinguono infezioni primarie e riattivazioni di infezioni latenti, entrambe si manifestano anche fino a cento giorni ed oltre dal TCSE.

La riattivazione di virus latenti riflette l'imaturità funzionale dei linfociti T.

Nella fase tardiva post-attecchimento (oltre i 100 giorni) il rischio infettivo dipende dal grado di recupero della risposta immunitaria adattativa e dalla severità della GvHD del paziente. I pazienti sottoposti a TCSE allogenico hanno un maggior rischio di sviluppare complicanze infettive in questa fase rispetto ai pazienti sottoposti ad autotrapianto. I possibili agenti infettivi sono virus (CMV, EBV, ADV, VZV) e i batteri incapsulati (*Neisseria Meningitidis* ed *Haemophilus Influenzae*).

Sono numerosi i fattori di rischio implicati nelle complicanze infettive: età avanzata, neoplasia avanzata al momento del trapianto, uso di regimi mieloablativi, manipolazione del *Graft* con deplezione dei linfociti T, *Graft failure e poor Graft function*, GvHD, HLA-mismatched, TCSE da cordone ombelicale<sup>(30)</sup>.

Le infezioni virali possono insorgere come infezione primaria o come riattivazione di virus latenti nelle cellule *self* o nelle cellule del donatore; in entrambi i casi la replicazione virale può essere rapida e determinare un quadro clinico grave.

Il citomegalovirus (CMV) può causare sintomi d'organo e sintomi aspecifici quali febbre, malessere e soppressione midollare. Le manifestazioni più frequenti di infezione da CMV in pazienti post-TCSE sono polmonite e gastroenterite.

L'*overall survival* appare ridotto in pazienti trapiantati sieropositivi per CMV o che hanno ricevuto *Graft* CMV<sup>+</sup> rispetto ai sieronegativi.

A tal proposito, in fase pre-trapianto si indaga la sierologia virale del paziente ricercando le immunoglobuline per CMV ma anche per EBV e ADV: se il ricevente è sieronegativo sarebbe opportuno che ricevesse la donazione di CSE da donatore sieronegativo ma questo non è sempre possibile quindi, in fase post-trapianto, si esegue una ricerca periodica del DNA virale ematico per CMV, EBV e ADV con tecniche di *RT-PCR* per almeno 3 mesi così da trattare precocemente l'infezione qualora si fosse istaurata.

I farmaci antivirali di uso comune sono Ganciclovir che riduce il rischio di malattia associata a CMV, Aciclovir, Valaciclovir e Foscarnet che riducono il rischio di replicazione del CMV; la loro somministrazione è indicata quando l'analisi molecolare rileva più di 1000 copie/mL nel sangue periferico.

In caso di infezione da CMV refrattaria alla terapia antivirale è indicato l'utilizzo di linfociti T anti-CMV.

La riattivazione di Epstein-Barr-virus (EBV) post-TCSE può dare complicanze gravi per la vita del paziente trapiantato con possibile sviluppo di disordine linfoproliferativo post trapianto, encefaliti o mieliti, polmoniti ed epatiti.

Se si riscontra positività ematica per EBV-DNA maggiore di 1000 copie/mL è indicata la somministrazione di Rituximab fino alla remissione del quadro.

L'adenovirus è responsabile di infezioni primarie a trasmissione interpersonale ma può anche andare in latenza nelle cellule epiteliali e nei tessuti linfoidei e riattivarsi in corso di immunosoppressione. La sintomatologia associata ad infezione da ADV comporta gastroenterite, sintomi respiratori, cistite emorragica, nefrite, epatite, polmonite, encefalite, miocardite.

Non è indicata una profilassi farmacologica ma vanno necessariamente seguite norme di isolamento e di igiene. Il trattamento con Cidofovir endovena si effettua nei casi di ADV conclamato e anche per ADV esiste la possibilità di somministrare linfociti T virus specifici<sup>(36)</sup>.

## 2.12. STUDIO DELLA RICOSTITUZIONE IMMUNOLOGICA: STATO DELL'ARTE

La ricostituzione immunologica post-TCSE è un processo dinamico che coinvolge dapprima il sistema immunitario innato, già dalle prime settimane dopo il trapianto, e poi il sistema immunitario adattativo il quale può necessitare fino a due anni per ricostituirsi totalmente. L'immunità umorale e cellulare rimangono profondamente alterate in un numero significativo di pazienti sottoposti a TCSE ad un anno di *follow up*: i CD4+ non raggiungono rapidamente valori normali e persiste l'inversione del rapporto CD4/CD8, la ricostituzione completa dei B avviene in poco più del 50% dei pazienti, con livelli di immunoglobuline ridotti e necessità di supplementazione<sup>(50)</sup>.

Come evidenzia una *survey* condotta dal *Cellular Therapy and Immunobiology Working Party* (CTWIP) dell'*European Society for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT), esiste una grande eterogeneità tra i Centri Trapianto Europei rispetto alle metodiche e all'organizzazione dello studio della ricostituzione immunitaria. L'enumerazione dei singoli *subsets* linfocitari è ormai ampiamente disponibile ed effettuata routinariamente nella grande maggioranza dei casi. In più della metà dei Centri, sempre secondo i dati EBMT, vi si associa una enumerazione delle cellule T patogeno-specifiche, mediante saggi di produzione citochimica intracellulare, IFN $\gamma$  ELISPOT, *Tetramer-staining*, in circa la metà dei casi routinariamente, per il resto nel contesto di studi clinici.

Altra metodica utilizzata è la determinazione periodica dei TRECs (*T-cell receptor excision circles*) mediante *Real-time* PCR. I TRECs vengono generati in corso di maturazione e riarrangiamento genico dei linfociti T nel timo, e costituiscono un *biomarker* con valore sia predittivo (circa l'adeguatezza di successiva timopoiesi quando enumerati pre-TCSE) sia correlato con un'adeguata immunoricostituzione quando monitorati nel post-TCSE<sup>(51)</sup>.

Diversi sono gli studi pubblicati relativi ai fattori che possono influenzare l'immunoricostituzione: essi vengono comunemente classificati in fattori propri del paziente come l'età e la malattia di partenza e fattori correlati al trapianto quali il condizionamento, la sieroterapia, la sorgente cellulare, la dose di cellule CD34+ infusa, il tipo di donatore, la sierologia donatore/ricevente per i principali virus e le complicanze post-procedurali.

La ricostituzione del sistema immunitario innato si verifica precocemente e può risultare influenzata dalla sorgente di cellule staminali utilizzata risultando significativamente più rapida dopo infusione di CSE da sangue periferico (*Graft* caratterizzato da un numero maggiore di cellule nucleate totali) seguito dal midollo e infine dal sangue cordonale il quale si è dimostrato essere vantaggioso in termini di ricostituzione dei linfociti NK rispetto alle altre fonti di CSE<sup>(31)</sup>.

Sulla ricostituzione dei linfociti T è stato dimostrato l'impatto dell'età del paziente e l'indicazione al trapianto, due fattori che correlano con l'involuzione e il danno timico. Com'è comprensibile, patologie oncologiche richiedono una chemioterapia di prima linea e regimi di condizionamento ad alta intensità che contribuiscono a danneggiare gli organi linfoidi ed il timo allungando i tempi di ripresa funzionale<sup>(31)</sup>.

All'avanzare dell'età, inoltre, si osserva una fisiologica riduzione di funzionalità timica indagabile mediante decremento dei livelli di TRECs<sup>(52)</sup> plasmatici che correla con un ritardo nella maturazione dei linfociti T. I pazienti pediatrici hanno generalmente una ricostituzione migliore del comparto cellulare T successivamente al trapianto, tale evento è attribuibile ad una migliore funzione timica che si riduce nell'adulto per effetto della sua involuzione fisiologica<sup>(53)</sup>.

La dose cellulare CD34+ sembra influire sulla rapidità con cui le cellule CD4+ raggiungono valori di normalità: i pazienti che ricevono una donazione di CSE da sangue periferico, che contiene più CD34+ rispetto alle altre sorgenti cellulari, sembrano ricostituire più velocemente questa sottopopolazione linfocitaria.

Alcuni studi hanno esaminato la dinamica di ricostituzione dei linfociti B nel primo anno di *follow up*, concludendo che il deficit cellulare B persiste per un periodo prolungato dopo il trapianto come conseguenza di un'insufficiente linfopoiesi. I fattori che più di tutti influenzano negativamente la linfopoiesi B sono la comparsa di GvHD acuta di grado superiore al primo e GvHD cronica estesa. Sembrano essere molteplici i meccanismi per cui i pazienti che sviluppano la GvHD sperimentano un decremento della linfopoiesi, tra questi si ipotizza la produzione di interferone- $\gamma$  ed interleuchina-1 prodotti da linfociti T e macrofagi in corso di GvHD e la distruzione delle cellule stromali midollari da parte dei linfociti del donatore<sup>(54)</sup>. La stessa terapia con glucocorticoidi somministrata per il trattamento di tali complicanze contribuisce a sopprimere la linfopoiesi B.

La dose di precursori CD34+ infusa e l'età del paziente non sembrano alterare la ricostituzione di queste cellule<sup>(55)(50)</sup>.

In relazione alla sorgente di cellule staminali ematopoietiche, vari studi hanno evidenziato una migliore espansione di cellule B dopo infusione di CSE da cordone rispetto alle altre sorgenti cellulari; probabilmente il CB contiene, in proporzione, più progenitori cellulari B rispetto al BM e PBSC<sup>(31),(56)</sup>. Il sangue periferico però contiene un numero di cellule B, *naïve* e mature, maggiore delle altre sorgenti cellulari, che vengono trasferite al ricevente<sup>(30)</sup>.

L'infezione da Citomegalovirus si sviluppa molto frequentemente nei primi mesi dopo il trapianto, sia come infezione primaria sia per riattivazione virale latente. Monitorando la conta delle popolazioni linfocitarie post TCSE, in pazienti che sviluppano l'infezione è comune riscontrare una linfocitosi T CD8+ secondaria ad un'espansione clonale di questa popolazione; questo vantaggio viene mantenuto a lungo termine, con incremento della conta di linfociti T CD8+ persistentemente maggiore dopo 6 – 9 mesi dal trapianto, rispetto a chi non sviluppa l'infezione da CMV<sup>(57)</sup>.

Ulteriori analisi depongono per un vantaggio nella ricostituzione dei T CD4+ che sembrerebbe più rapida nei pazienti pediatrici in corso di infezione virale da CMV<sup>(58)</sup>. Per quanto concerne la ricostituzione dei linfociti B, generalmente questi appaiono ridotti in numero nei pazienti con infezioni da CMV, probabilmente per un motivo di omeostasi immunitaria per cui si osserva un decremento dei B in risposta ad un'espansione dei T<sup>(50)</sup>.

Per quanto riguarda l'influenza del tipo di donatore, in caso di TCSE aploidentico la ricostituzione linfocitaria è risultata nei vari studi essere generalmente ritardata per tutte le sottopopolazioni, compresi i linfociti NK. Per facilitare l'attecchimento e la ricostituzione immunitaria dopo TCSE-aplo è prassi comune da ormai oltre un decennio, presso i principali centri Pediatrici, utilizzare un *Graft* depleto per CD19+ e per cellule T  $\alpha/\beta$ <sup>(59)</sup> piuttosto che un *Graft* costituito puramente da CD34+; in questo modo si promuove il trasferimento di cellule NK e linfociti T $\gamma/\delta$  che contribuiscono anche a ridurre il rischio di infezioni e GvHD<sup>(31)</sup>.

La somministrazione di sieroterapia favorisce la riduzione del rischio di rigetto del *Graft* e di sviluppo di GvHD ma può ritardare la ricostituzione immunologica: l'effetto linfocitolitico delle ATG, infatti, persiste per quasi un mese dal trapianto. Tale effetto è ancora più evidente se si utilizza Alemtuzumab, anticorpo monoclonale che ha come *target* il recettore CD52 espresso sulle cellule T, il suo utilizzo correla con una riduzione nella conta di CD3+, CD4+ e CD8+ significativamente maggiore rispetto all'utilizzo di ATG<sup>(31)</sup>.

La ricostituzione immunologica è stata dimostrata avere un impatto sull'*outcome* del trapianto in termini di sopravvivenza, mortalità trapianto correlata e probabilità di recidiva di malattia. Non esiste tuttavia uniformità tra i vari studi circa la definizione di avvenuta ricostituzione immunologica: i *cut-off* proposti per i singoli *subsets* linfocitari a time point definiti variano nelle diverse casistiche e rendono i risultati non sempre facilmente confrontabili.

In linea generale un rapido attecchimento dei neutrofilii e ricostituzione delle cellule NK, entro le prime settimane dal TCSE, contribuisce a ridurre la morbilità e mortalità correlata ad infezioni fungine e virali invasive.

La persistenza di valori assoluti al di sotto del limite di normalità dei linfociti B a 12 mesi dal trapianto aumenta la suscettibilità ad infezioni batteriche tardive, ed un'insoddisfacente ricostituzione del comparto cellulare T si associa a multiple infezioni invasive con incremento della mortalità trapianto correlata<sup>(30)</sup>. I linfociti T inoltre giocano un ruolo chiave nell'immunosorveglianza a lungo termine sulla patologia di base: è noto dalla letteratura come un loro insufficiente recupero dopo TCSE possa impattare sulla probabilità di presentare una ricaduta di malattia, e questo è il razionale su cui si basa l'utilizzo dei linfociti del donatore<sup>(60)</sup> (*Donor Lymphocyte infusion*, DLI) come strategia di trattamento delle ricadute post-trapianto, seppure sia molto difficile separare questa loro funzione dalla loro capacità di indurre una GvHD.

### 3- OBIETTIVO DELLO STUDIO

Il presente studio si propone di:

- descrivere il recupero immunologico in una coorte di pazienti pediatrici, adolescenti e giovani adulti, sottoposti a TCSE per patologia emato-oncologica presso la Clinica di Oncoematologia Pediatrica di Padova in un intervallo di tempo di 10 anni (2011-2021; ultimo *follow up* 09/05/2022).
- indagare se esistano differenze significative nei parametri quantitativi di ricostituzione immunologica rispetto ad alcune caratteristiche della coorte stessa e alla variabile tempo.
- Studiare l'associazione di parametri che permettano di definire un recupero immunologico soddisfacente (definito come l'aver raggiunto il range di normalità per età), e secondo cui sono stati categorizzati i pazienti, con misure di *outcome* quali *Overall Survival (OS)* e *Transplant Related Mortality (TRM)*; lo scopo è di individuare potenziali ambiti di intervento per migliorare il trattamento e la prognosi di questi pazienti.

## 4- MATERIALI E METODI

### 4.1. DESCRIZIONE COORTE E PROCEDURA

Abbiamo revisionato retrospettivamente le cartelle cliniche di 157 pazienti sottoposti a una o più procedure di trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche per disturbi ematologici oncologici presso l'Unità di Trapianto dell'Oncoematologia pediatrica di Padova tra marzo 2011 e maggio 2021, per un totale di 173 procedure.

Sono stati inclusi nello studio i pazienti di età inferiore o pari a 25 anni al momento del trapianto, l'età mediana è risultata essere di 10 anni; non è stata evidenziata una prevalenza importante di genere.

Sono stati raccolti dati relativi all'indicazione al trapianto, il tipo di donatore, i dettagli relativi al condizionamento e alla sieroterapia con ATG, le tempistiche di attecchimento e della ricostituzione immunologica ed il decorso clinico dopo il trapianto, con particolare attenzione all'eventuale insorgenza di GvHD, infezioni e recidive di malattia. Tali fattori sono stati analizzati in quanto potenzialmente impattanti le tempistiche del recupero immunologico o come indicatori di *outcome*.

I pazienti deceduti o recidivati sono stati valutati per la ricostituzione immunitaria fino all'ultimo *time-point* disponibile prima che si verificasse l'evento di ricaduta o decesso.

I pazienti sono stati trattati per la patologia di base secondo i protocolli, nazionali ed internazionali, in uso presso il Centro di Padova (*Appendice 2*).

Per quanto riguarda i regimi di condizionamento:

- i pazienti affetti da LLA hanno ricevuto TBI 12 Gy + Thiotepa 8-10 mg/kg + Ciclofosfamida 120 mg/kg,
- i pazienti affetti da LAM hanno ricevuto Busulfano (poi adeguato secondo TDM) + Melphalan + Ciclofosfamida
- i pazienti affetti da Mielodisplasia o JMML hanno ricevuto Thiotepa 8 mg/kg/die + Treosulfano 12 g/m<sup>2</sup> + Ciclofosfamida 60 mg/kg/die + Melphalan 140 mg/m<sup>2</sup>
- i pazienti affetti da linfoma hanno ricevuto TBI + Thiotepa 8 mg/kg/die
- i pazienti affetti da neuroblastoma hanno ricevuto Thiotepa + Melphalan



L'immunoprofilassi ha compreso:

- Ciclosporina A
- ATG
- Rituximab (200 mg/m<sup>2</sup> il giorno +1 nei TCSE aploidentici)
- Methotrexate

Come profilassi della sindrome da occlusione sinusoidale è stata utilizzata eparina sodica 100 UI/kg/die in infusione endovenosa continua, oppure Defibrotide 25 mg/kg/die in 4 somministrazioni per via endovenosa dall'avvio del condizionamento fino al giorno +21, in assenza di SOS.

Le profilassi antimicrobiche, in assenza di pregresse infezioni, hanno compreso Ampicillina, Aciclovir, Fluconazolo. In caso di storia di pregressa infezione da patogeno specifico, è stata proseguita la profilassi secondaria già in atto quando possibile (si è cercato di limitare l'utilizzo degli azoli in corso di condizionamento a causa delle molteplici interazioni farmacologiche). È stato recentemente utilizzato Letermovir nei casi in cui sussisteva l'indicazione.

Il trattamento empirico della febbre in corso di neutropenia ha compreso i seguenti schemi:

- Teicoplanina, Amikacina, Cefotaxime
- Teicoplanina o Vancomicina, Piperacillina-Tazobactam.

Per il trattamento empirico delle infezioni fungine è stata utilizzata in prima battuta Amfotericina B liposomiale, eventualmente *shiftata* o associata ad azoli e/o echinocandine a seconda del sospetto diagnostico e dei reperti strumentali e microbiologici.

Per il trattamento delle riattivazioni sintomatiche di CMV, oppure in caso di viremia > 1000 cp/mL in aumento, sono stati utilizzati Foscarnet al dosaggio di 120 mg/kg/die (dose di attacco) e 90 mg/kg/die (dose di mantenimento), e/o Ganciclovir al dosaggio di 5 mg/kg/die (o Valganciclovir per os). Di recente è stato utilizzato Letermovir in casi selezionati. È stata inoltre somministrata terapia adiuvante con immunoglobuline iperimmuni anti-CMV (Cytotect o Megalotect ®) al dosaggio di 50U/kg per cicli di 3 somministrazioni a giorni alterni.

Per il trattamento di riattivazioni sintomatiche di EBV oppure in caso di viremia maggiore di 1000 cp/mL in aumento, è stato utilizzato Rituximab settimanale al dosaggio di 375 mg/m<sup>2</sup>.

Per il trattamento di riattivazioni sintomatiche di Adenovirus, è stato utilizzato Cidofovir al dosaggio di 5 mg/kg 1 volta a settimana. In casi selezionati è stato utilizzato Brincidofovir nell'ambito di programmi di uso compassionevole quando disponibile.

Il monitoraggio della ricostituzione immunologica è consistito nella determinazione periodica (mensile), su sangue periferico, dell'emocromo e dei valori assoluti e percentuali delle seguenti sottopopolazioni linfocitarie:

- Linfociti T CD3+ (totali)
- Linfociti T CD3+CD4+ (T *Helper*)
- Linfociti T CD3+CD8+ (T citotossici)
- Linfociti T CD16+CD56+ (cellule NK)
- Linfociti B CD19+ (linfociti pre-B e B maturi)

Per un sottogruppo di pazienti, in anni più recenti, l'esame è stato implementato mediante l'enumerazione, ad alcuni *time point* definiti a seconda del tipo di trapianto, anche delle seguenti ulteriori sottopopolazioni:

- Linfociti T CD4+CD3+ CD45RO (ovvero i linfociti T *Helper Memory*)
- Linfociti T CD4+CD3+ CD45RA (ovvero i linfociti T *Helper naïve*)
- Linfociti T CD8+CD3+CD45RA+CD27+ (linfociti T citotossici *naïve*)
- Linfociti T CD8+CD3+CD45RA+CD27- (cellule effettrici di memoria terminalmente differenziate re-esprimenti CD45RA, TEMRA, dotate di scarsa capacità replicativa ed elevata attività citotossica). Tale *subset* riveste interesse nel setting del post-TCSE perché alcuni linfociti virus-specifici, ad esempio quelli anti-CMV, hanno prevalente fenotipo TEMRA. Si tratta quindi di un *marker* surrogato di immunità patogeno-specifica
- Linfociti B IgD+CD27- (*naïve*)
- Linfociti B IgD-CD27+ (*Switched Memory*, linfociti B IgM- che hanno effettuato lo switch isotipico e sono diventati in grado di produrre diversi tipi di immunoglobuline, come le IgG e le IgA)
- Linfociti B IgD+CD27+ (*Marginal*, ovvero linfociti B che non migrano negli organi linfoidi ma raggiungono la zona marginale ossia i MALT, milza e tessuto linfoide extranodale, dove rispondono rapidamente in modo T-indipendente agli antigeni presenti in circolo, producendo

anticorpi di tipo IgM caratterizzati da una limitata diversificazione antigenica.)

- Linfociti B IgM+CD38+ (*Transitional*, ovvero linfociti B ancora non del tutto maturi che devono ancora andare incontro al processo di selezione negativa delle cellule producenti autoanticorpi, al termine del quale diventeranno B *naïve*)
- Linfociti B IgM-CD38+ (plasmoblasti, ovvero plasmacellule a lunga sopravvivenza)

Il numero di dati raccolti relativamente a questi *subsets* è risultato troppo basso per poter essere inserito nel modello statistico.

L'analisi è stata effettuata presso l'UOC Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedale-Università di Padova

Sono stati utilizzati campioni di sangue intero anticoagulato con K2 EDTA analizzati entro 24 ore per garantire la vitalità delle popolazioni cellulari e preparati in accordo con la linea guida CLSI (H42-A2).

La strumentazione disponibile presso la UOC di Medicina di Laboratorio di Padova è "*Aquios CL (Beckman Coulter, Miami, FL)*". Lo strumento *Aquios CL* effettua la preparazione e l'analisi dei campioni di sangue periferico utilizzando fino a quattro canali di rilevamento a fluorescenza (*laser* blu 488nm), due canali di rilevamento con *scattering* della luce e volume elettronico.

Le analisi sono state svolte con la metodica *Tetra Combo Analytical mode* per l'identificazione dei linfociti T CD3+/CD4+/CD8+, dei linfociti B CD19+ e delle cellule NK CD16+56+.

Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando il *software Kaluza Analysis (Beckman Coulter)*.

È stata definita ricostituzione immunologica soddisfacente l'aver raggiunto, per ciascuno paziente a definiti *time point*, valori compresi tra il 10° ed il 90° percentile di normalità per età relativamente alle diverse sottopopolazioni secondo quanto definito nella seguente figura.

SUBSETS	AGE GROUPS					
	0-3 MONTHS	3-12 MONTHS	1-2 YEARS	2-6 YEARS	6-12 YEARS	12-18 YEARS
Lymphocytes	5740 (4054-7048)	5690 (3320-7006)	4685 (3873-6141)	3800 (2340-5028)	2500 (1662-3448)	2285 (1340-3173)
CD3+	4040 (3180-5401)	3833 (2284-4776)	3133 (2542-4933)	2580 (1578-3707)	1793 (1239-2611)	1629 (954-2332)
CD4+	3079 (2330-3617)	2492 (1523-3472)	1866 (1573-2949)	1448 (870-2144)	1030 (646-1515)	887 (610-1446)
CD8+	1048 (712-1361)	976 (524-1583)	884 (656-1432)	804 (472-1107)	595 (365-945)	518 (282-749)
CD16/56+	408 (201-870)	381 (230-801)	296 (186-724)	299 (155-565)	262 (120-483)	230 (87-504)
CD19+	1032 (315-1383)	1123 (776-2238)	1152 (733-1338)	730 (434-1274)	403 (276-640)	321 (173-685)

Figura 9. Valore Assoluto delle sottopopolazioni linfocitarie differenziato per età (mediana, 10° e 90° percentile)<sup>(61)</sup>

## 4.2. ANALISI STATISTICA DI RICOSTITUZIONE IMMUNOLOGICA

Per descrivere il recupero immunologico della coorte di pazienti sottoposti a TCSE in esame e individuare delle differenze significative tra le varie popolazioni sono stati inseriti nel modello statistico tutti i pazienti osservati almeno una volta dopo il trapianto per i quali sono disponibili dei valori di conteggio delle popolazioni linfocitarie.

È stato considerato solo il primo trapianto escludendo quindi i secondi e terzi trapianti, inoltre, non abbiamo tenuto conto del “numero di trapianti” come variabile esplicativa perché non consentito dal modello statistico applicato a causa del basso numero di eventi che non ha permesso di fare delle stime.

In definitiva il totale di procedure analizzate è stato di 127.

Sono state individuate delle variabili, riportate nella seguente tabella, che abbiamo ritenuto avere un impatto sulla ricostituzione immunologica post-TCSE.

<b>Variabile esplicativa</b>	Sottogruppi di confronto per ogni variabile disponibile
Sorgente cellulare	Aferesi (PBSC)
	Midollo (BM)
	Cordone ombelicale (UCB)
Donatore	<i>Match sibling donor</i> (MSD)
	<i>Match unrelated donor</i> (MUD)
	Aploidentico
<i>Total body irradiation</i> (TBI)	Si
	No
Sieroterapia (ATG)	Si
	No
GvHD acuta	I-II grado
	III-IV grado
	No
GvHD cronica	Si
	No
Sepsi o infezioni fungine	Si
	No
Riattivazione EBV	Si
	No
Riattivazione CMV	Si
	No
Sierologia donatore/ricevente per CMV ed EBV	<i>Matched</i>
	<i>Mismatched</i>
Genere	M
	F
Età	<=10
	>10
Dose cellulare CD34+ (*10 <sup>6</sup> /Kg)	<=5,89 (mediana)
	>5,89 (mediana)

Tabella IV - variabili esplicative inserite nel modello

Per ciascuna *subset* di interesse (linfociti, CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+) è stato applicato un modello ad effetti misti che tiene conto delle variabili esplicative, sia fisse che *random*, e del passare del tempo come effetto casuale aggiunto nel modello come termine lineare.

Il modello tiene anche conto della correlazione fra le osservazioni ripetute in un paziente, non le studia come indipendenti le une dalle altre, e della correlazione temporale in giorni che intercorrono tra due osservazioni successive poiché non tutti i pazienti vengono studiati in maniera sequenziale ogni mese.

È stato considerato anche l'effetto di interazione tra il tempo e l'età del soggetto (nel modello statistico si considera l'età come variabile continua).

Le variabili incluse comprendono:

- Variabili esplicative fisse: sorgente cellulare, donatore, TBI, ATG, sierologia donatore/ricevente, sesso e dose cellulare CD34+ infusa;
- variabili esplicative tempo-dipendenti (*random*): ossia con durata temporale specifica per cui abbiamo identificato una data di inizio e fine dell'evento: GvHD acuta e cronica, riattivazione CMV ed EBV e altre complicanze infettive.

È stata effettuata una procedura di selezione del modello *backward* che consiste nella progressiva eliminazione delle variabili che, nel corso dello studio, si sono dimostrate non significative, la soglia di positività è stata posta allo 0,05.

Data la numerosità dei pazienti e la variabile disponibilità di misurazioni raccolte abbiamo ritenuto corretto applicare, come metodo di stima, la Massima Verosimiglianza (non ristretta). I dati sono stati analizzati utilizzando un *software R* 4.1.0.

### 4.3. ANALISI DI SOPRAVVIVENZA

Le analisi di sopravvivenza sono state condotte confrontando i pazienti che, per specifici *time point* (3-6-9-12 mesi post-TCSE), raggiungono almeno il 10° percentile di normalità dei valori delle sottopopolazioni linfocitarie, con i pazienti che non raggiungono questi valori di normalità. È stato applicato il metodo di *Kaplan-Meier* e la differenza tra le curve è stata stimata con il *log-rank test*. La sopravvivenza globale (*Overall Survival – OS*), è stata considerata come il tempo che intercorre tra la data di TCSE e la data di decesso per qualsiasi causa o, nel caso di sopravvivenza, la data dell'ultimo *follow-up* valutato al 09/05/2022.

Sempre in relazione al raggiungimento del 10° percentile di normalità dei valori delle sottopopolazioni linfocitarie, è stata valutata l'incidenza cumulativa della mortalità trapianto correlata (TRM) e la *Relapse free Survival*, che tiene conto dell'evento ricaduta (RFS). L'analisi è stata effettuata utilizzando il *software SAS*.

## 5- RISULTATI

Le caratteristiche demografiche, la distribuzione dei pazienti secondo le principali patologie e i tipi di trapianto eseguiti sono dettagliate nella tabella sottostante:

		N (%)	Media	Mediana	Range
Totale pazienti		157			
(12 pazienti hanno fatto 2 TCSE, 2 pazienti ne hanno fatto 3)					
Totale pazienti in studio		127			
Età al TCSE			10	10	0,9 – 24,7
Genere	M	87 (55,4%)			
	F	70 (44,6%)			
Patologia di base	LLA	86 (54,7%)			
	LAM	36 (22,9%)			
	LINFOMA	12 (7,6%)			
	MDS	10 (6,4%)			
	JMML	5 (3,2%)			
	NBL	4 (2,6%)			
	altro	4 (2,6%)			
Totale procedure		173			
Donatore	MSD	41 (23,7%)			
	MUD	94 (54,3%)			
	APLO	38 (22%)			
Sorgente	BM	93 (57,8%)			
	PB	69 (39,9%)			
	CB	11 (6,4%)			
Condizionamento	TBI	96 (55,5%)			
	Non-TBI	77 (44,5%)			
Sieroterapia	Sì	130 (75,1%)			
	No	43 (24,9%)			
Dose cellulare infusa CD34+ [*10 <sup>6</sup> /Kg]			7,32	5,89	0,10 – 37,41

*Tabella V - Caratteristiche demografiche e procedurali*



Le caratteristiche di *outcome* sono invece dettagliate nella seguente tabella:

<i>Outcome</i>		N (%)
Decessi	Mortalità trapianto correlata (TRM)	20 (13%) Di cui 3 per infezioni virali e 1 per IFI; 7 per GvHD; 2 per <i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i> e 7 per cause miste.
	Recidiva di malattia	36 (23%)
Recidive	58 procedure	48 pazienti (31%) (8 pazienti recidivano 2 volte; 1 paziente 3 volte)
Viventi	101 (64%)	

Tabella VI - Caratteristiche di Outcome

Non tutti i pazienti sono ugualmente valutabili per quanto riguarda l'immunoricostruzione: sul numero di misurazioni disponibili impatta, ovviamente, l'andamento clinico (mancato attecchimento, decesso precoce o ricaduta che ha comportato la ripresa della chemioterapia), così come fattori logistici (ad esempio *follow up* eseguito in altro Centro).

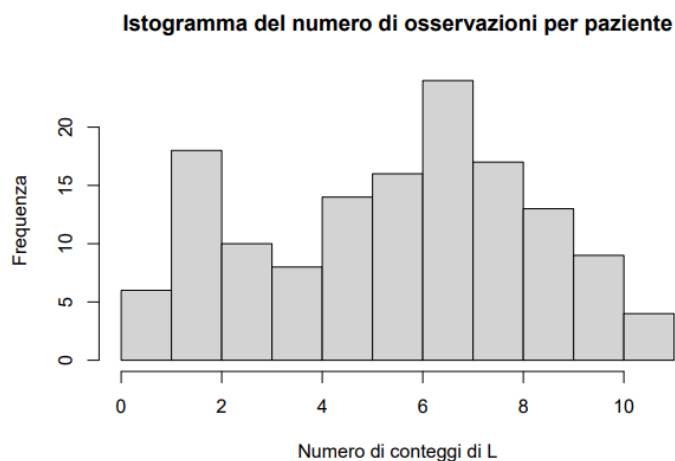


Figura 10- Nessun paziente ha eseguito *follow up* completo con 12 rilevazioni in un anno

Per i pazienti valutabili, i seguenti grafici rappresentano l'andamento della conta linfocitaria e delle principali sottopopolazioni nella coorte in studio nei 12 mesi post TCSE:

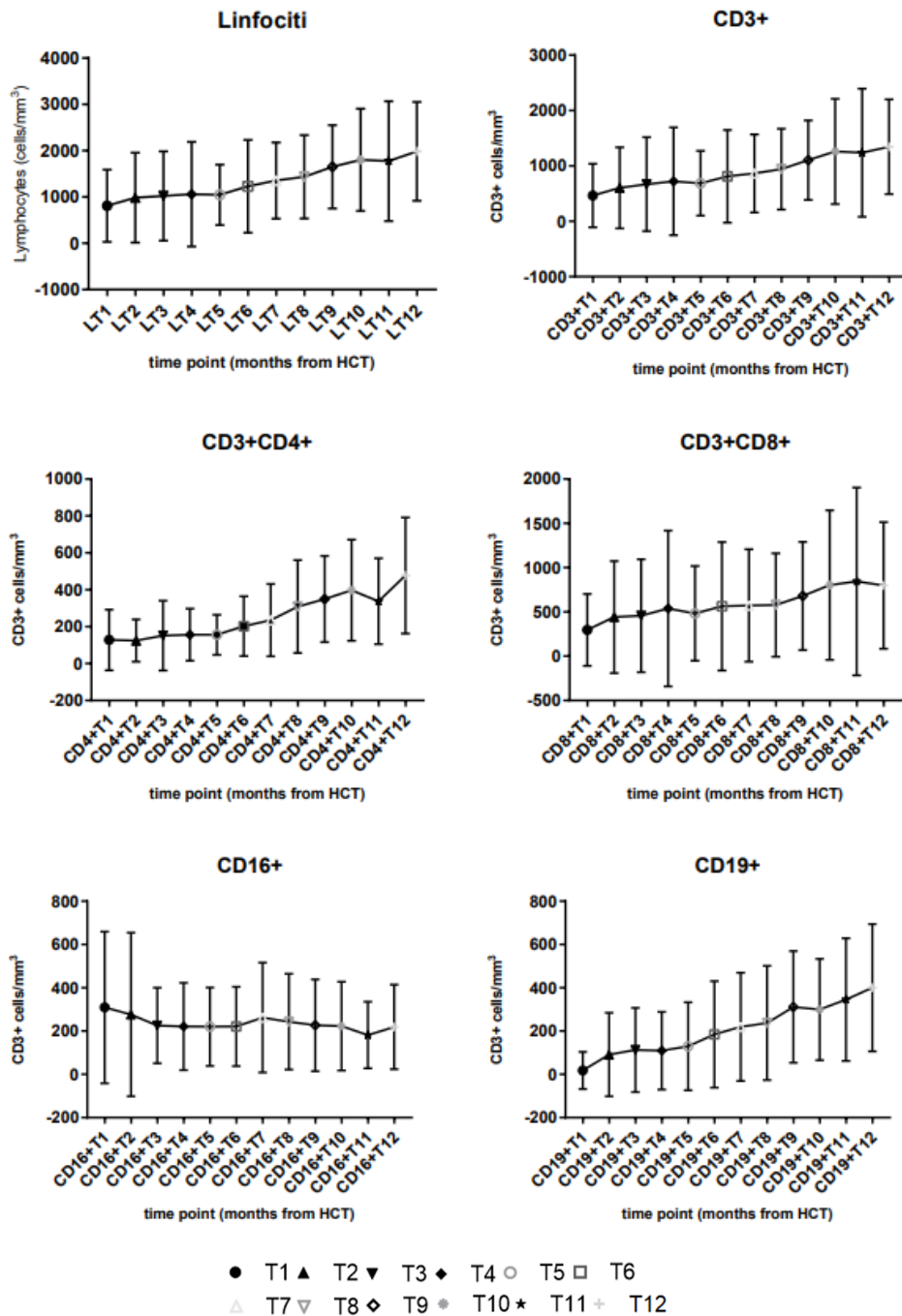


Figura 11- Per linfociti e sottopopolazioni è stata eseguita un'analisi descrittiva per valutare l'andamento, nei 12 mesi post TCSE, della conta assoluta. Per ogni time point abbiamo tenuto conto del numero di misurazioni disponibili, del valore medio indicato con simboli differenti e della rispettiva deviazione standard.

Per tutte le sottopopolazioni linfocitarie si osserva, nell'intera coorte, un *trend* in aumento nel tempo del valore assoluto con una certa variabilità interpersonale.

Dai grafici si evidenzia come le cellule CD16+CD56+ (linfociti *Natural Killer*) siano la prima sottopopolazione linfocitaria a raggiungere valori pressoché normali dopo il trapianto, già nelle prime settimane, e si mantengono stabili nel tempo.

Questo è in linea con l'atteso e con quanto riportato nei principali studi sull'argomento.

I valori assoluti delle altre sottopopolazioni presentano invece un incremento più lento e graduale nel tempo. Ciò riflette la progressiva linfopoiesi di derivazione dai precursori ematopoietici del donatore, a cui corrisponde una riduzione dei linfociti derivanti da precursori già *committed* ricevuti con il prodotto infuso.

### **5.1. RISULTATI DELL'APPLICAZIONE DEL MODELLO STATISTICO**

Abbiamo indagato l'effetto delle variabili esplicative sulla conta delle quantità di interesse (linfociti, CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+).

I risultati ottenuti sono schematizzati e riassunti nella tabella a pagina seguente.

	<b>Linfociti</b>	<b>CD3+</b>	<b>CD4+</b>	<b>CD8+</b>	<b>CD19+</b>	<b>CD16+</b>
<b>Età</b> (mediana = 10 anni)	Età inferiore alla mediana influisce in senso positivo <i>p= 0,017</i>	Età inferiore alla mediana influisce in senso positivo <i>p= 0,028</i>	Età inferiore alla mediana influisce in senso positivo <i>p= 0,000</i>	Età inferiore alla mediana influisce in senso positivo <i>p= 0,043</i>	Età inferiore alla mediana influisce in senso positivo <i>p= 0,000</i>	
<b>Genere</b>						
<b>TBI</b>						
<b>Sieroterapia</b>						
<b>Donatore</b>	Migliore per MSD <i>p= 0,033</i>	Migliore per MSD <i>p= 0,033</i>	Migliore per MSD <i>p= 0,000</i>			
<b>Sorgente cellulare</b>				Migliore per BM <i>p= 0,022</i>	Migliore per UCB <i>p= 0,000</i>	Migliore per UCB <i>p= 0,000</i>
<b>aGvHD</b> Grado 1-2					Influisce negativamente <i>p= 0,013</i>	
<b>aGvHD</b> Grado 3-4	Influisce negativamente <i>p= 0,005</i>		Influisce negativamente <i>p=0,005</i>		Influisce negativamente <i>p= 0,000</i>	
<b>cGvHD</b>						
<b>Riattivazione CMV</b>	Influisce in senso positivo <i>p= 0,013</i>				Influisce in senso positivo <i>p= 0,044</i>	Influisce in senso positivo <i>p= 0,000</i>
<b>Riattivazione EBV</b>						
<b>Sepsi/infezioni fungine</b>						
<b>Matching donatore ricevente CMV ed EBV</b>						
<b>Dose cellulare CD34+</b> [*10 <sup>6</sup> /Kg] Mediana= 5,89						Dose maggiore della mediana influisce in senso positivo <i>p= 0,000</i>

Tabella VII - Riassunto significatività

## Età

Per tutte le popolazioni linfocitarie esclusi i linfociti NK (CD16+CD56+) si osserva che soggetti più giovani (con età minore della mediana, ovvero 10 anni) hanno una crescita, nella conta dei *subsets*, maggiore rispetto a chi ha un'età superiore alla mediana.

## Linfociti

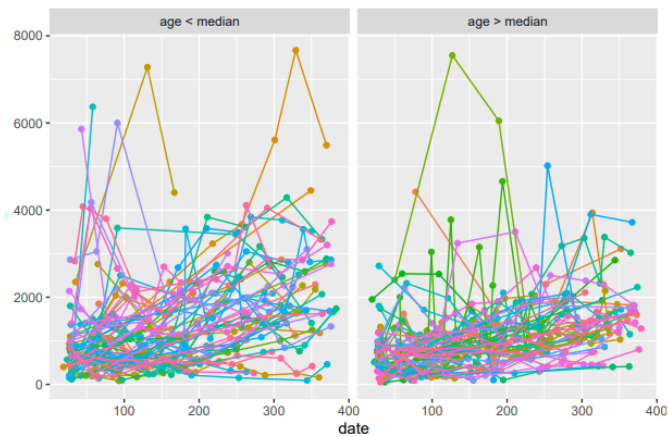


Figura 12 - Ricostituzione per età dei linfociti

## CD3+

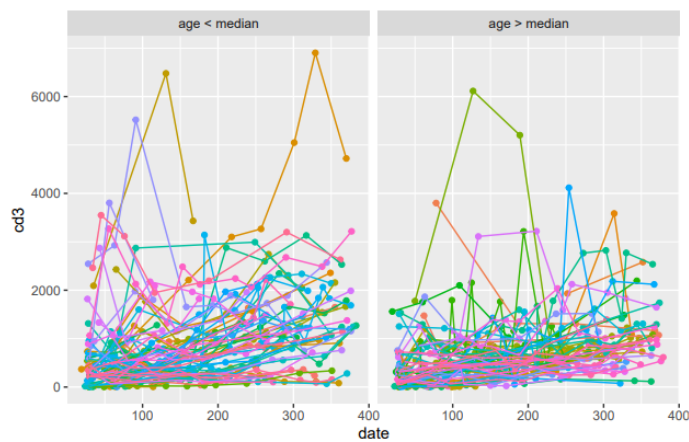


Figura 13- Ricostituzione per età CD3+

## CD4+ CD3+

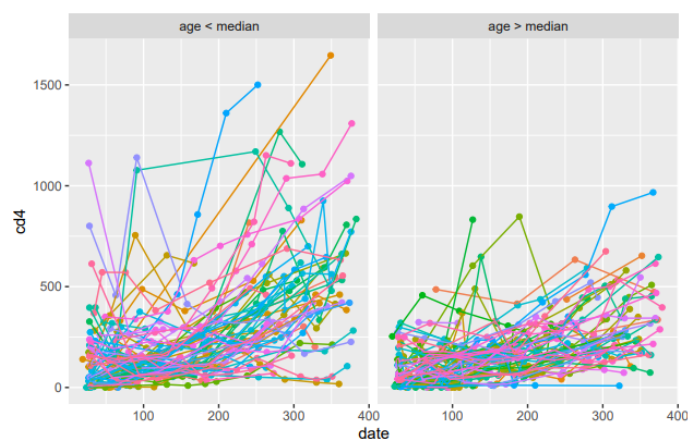
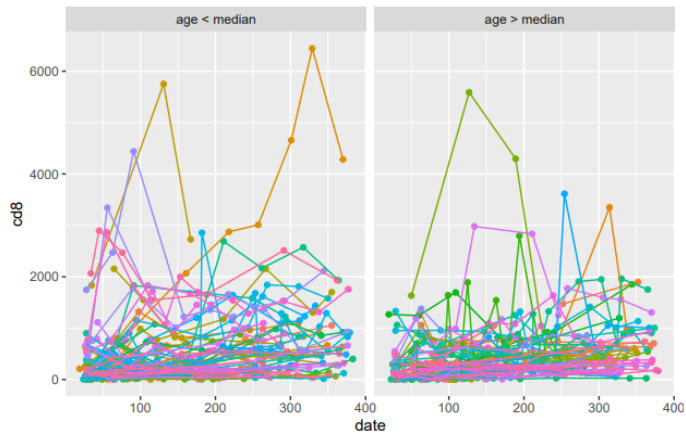


Figura 14 - Ricostituzione per età CD4+

CD8+ CD3+

*Figura 15 -Ricostituzione per età CD8+*

CD19+

*Figura 16- Ricostituzione per età CD19+*

### Donatore

Il tipo di donatore sembra incidere sulla crescita della conta di linfociti, cellule CD3+, cellule CD3+CD4+: per donatore MSD si sono osservate conte linfocitarie maggiori per ogni *time point* rispetto al donatore aploidentico e al donatore MUD.

Variabile: tipo di donatore	Popolazione	Value (aumento medio della conta rispetto ad APLO)	p-Value
MSD	LINFOCITI	+415	0,0334
MUD		+336	0,0478
MSD	CD3+	+363	0,0335
MUD		+293	0,0476
MSD	CD3+CD4+	+175	0,0000
MUD		+87	0,0012

Tabella VIII - Ruolo del tipo di donatore sulla ricostituzione immunitaria: MSD e MUD sono confrontati con trapianto APLOIDENTICO

### Sorgente cellulare

Per le popolazioni CD3+CD8+, CD16+ e CD19+ la fonte di cellule staminali ematopoietiche incide sulla crescita della conta nel tempo.

Variabile: fonte di cellule staminali	Popolazione	Value (aumento medio della conta rispetto HPC-A)	p-Value
HPC-M	CD3+CD8+	+220	0,0223
HPC-UCB		-275	0,2039
HPC-M	CD16+CD56	+127	0,0022
HPC-UCB		+324	0,0000
HPC-M	CD19+	-9	0,6761
HPC-UCB		+249	0,0000

Tabella IX- Ruolo della fonte di cellule staminali sulla ricostituzione: CSE da sangue midollare e cordonale sono confrontati con CSE da aferesi

Per quanto riguarda la conta dei CD8+ la crescita appare significativamente più rapida per i riceventi cellule staminali ematopoietiche da sangue midollare rispetto alle altre sorgenti di CSE, mentre la crescita delle conte di CD16+ e CD19+ mostra un incremento significativamente più sostenuto nei riceventi CSE da sangue cordonale rispetto a CSE da aferesi o midollari.

### **aGvHD**

I pazienti che hanno avuto aGvHD di qualsiasi grado mostrano una conta più bassa ad ogni *time point* per tutte le seguenti sottopopolazioni: linfociti, CD3+CD4+, CD19+. Il gruppo di pazienti che ha avuto aGvHD di grado III-IV dimostra un numero assoluto di linfociti, CD3+CD4+ e CD19+ statisticamente più basso, ai vari *time point* considerati, a differenza della aGvHD di grado I-II dove la differenza nella conta delle popolazioni non è statisticamente significativa tranne per CD19+.

Variabile aGvHD	Popolazione	<i>Value (riduzione media della contata rispetto al controllo)</i>	<i>p-Value</i>
Grado I-II	LINFOCITI	-184	0,0961
Grado III-IV		-286	0,0053
Grado I-II	CD3+CD4+	-24	0,2343
Grado III-IV		-51	0,0056
Grado I-II	CD19+	-49	0,0135
Grado III-IV		-82	0,0000

*Tabella X- Ruolo della GvHD acuta nella ricostituzione immunitaria: le conte di interesse per il grado I-II e grado III-IV sono state confrontate con la conta nella popolazione senza evento aGvHD.*



### Riattivazione CMV

Abbiamo definito come “riattivazione CMV” il verificarsi di infezione primaria o riattivazione di CMV (CMV-DNA > 1000 cp/mL, in aumento, con o senza sintomi) che ha necessitato di trattamento antivirale, con inserimento nel modello statistico della data di inizio e fine terapia.

Dai risultati ottenuti dall’analisi, l’aver presentato riattivazione di CMV sembrerebbe correlare con conte più elevate nel tempo di linfociti, CD16+ e CD19+ rispetto ai pazienti in cui non si è evidenziata l’infezione da CMV.

Variabile:	Popolazione	Value	p-Value
infezione CMV	LINFOCITI	+303	0,0138
	CD16+CD56+	+128	0,0006
	CD19+	+47	0,0448

*Tabella XI- Ruolo dell’infezione da CMV trattata con terapia farmacologica nella ricostituzione immunitaria: nella tabella sono riportati i valori dei pazienti che hanno questa variabile.*

### Dose cellulare CD34+ infusa

Considerando la mediana di dose cellulare infusa nella nostra coorte (5,89\* 10<sup>6</sup>/kg), per la sottopopolazione CD16+ si osserva una migliore ricostituzione della conta nel tempo per i pazienti che ricevono una quota di CD34+ maggiore o uguale alla mediana ( $p=0,000$ ). Tale variabile non sembra modificare la ricostituzione delle altre sottopopolazioni linfocitarie.

In genere, non sono risultati avere un impatto sull’incremento numerico dei linfociti e dei loro *subsets* le seguenti variabili

- l’aver ricevuto TBI o sieroterapia;
- l’aver sperimentato riattivazione di EBV, eventi settici o infettivi fungini;
- GvHD cronica;
- il *matching* sierologico per CMV ed EBV tra donatore e ricevente.

## 5.2. ANALISI DI SOPRAVVIVENZA

Le curve di sopravvivenza sono state costruite considerando i *time point* a 3, 6, 9 e 12 mesi dal trapianto valutando se i pazienti trapiantati raggiungevano o meno valori compresi tra il 10° ed il 90° percentile di normalità per la conta delle sottopopolazioni linfocitarie.

In generale, per *Overall Survival (OS)*, *Transplant related Mortality (TRM)* ed *Event free Survival (EFS)*, che tiene conto dell'evento di recidiva di malattia), non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra il gruppo di pazienti che ha mostrato un'immunoricostruzione soddisfacente ed il resto della popolazione.

Tuttavia, a 12 mesi dal trapianto, per la popolazione che raggiunge valori normali per età dei CD19+ si osserva un vantaggio in termini di *overall survival (OS 93%)* rispetto al mancato raggiungimento (*OS 69%*), pur trattandosi di un *trend* con significatività al limite (*p-value* di 0,057).

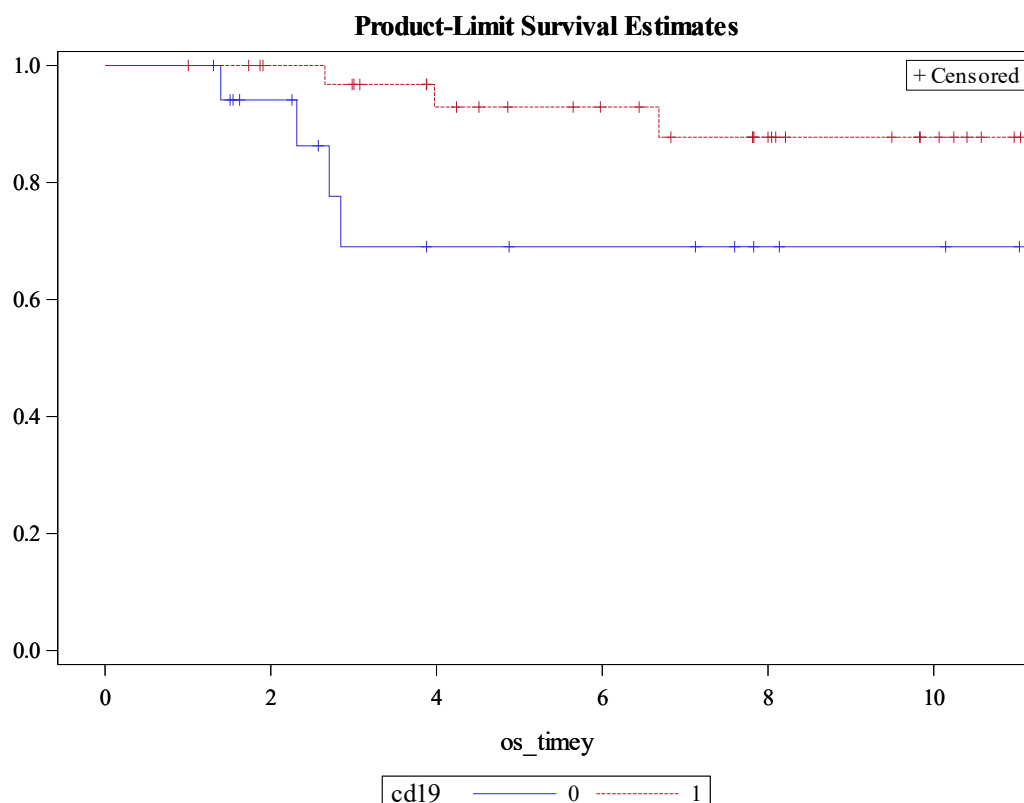


Figura 17 - Overall survival per raggiungimento di valori normali di CD19+ a T12 (*p-value* 0,057). La curva blu rappresenta chi non raggiunge i valori normali di CD19+, la rossa chi li raggiunge

## 6- DISCUSSIONE

Nel nostro studio si sono dimostrate significative nel modificare le tempistiche di ricostituzione immunologica:

- l'età del paziente al trapianto;
- la sorgente di cellule staminali ematopoietiche;
- il tipo di donatore;
- la GvHD acuta;
- l'infezione da CMV;
- la dose cellulare.

Altre variabili quali sesso, ATG, TBI, infezione da EBV, GvHD cronica, eventi infettivi severi e *matching* sierologico per CMV ed EBV non si sono dimostrati significativi.

### 6.1. RUOLO DELL'ETÀ

Dalla nostra analisi risulta che pazienti con età minore di 10 anni abbiano una ricostituzione immunologica migliore rispetto a pazienti di età superiore.

Con l'invecchiamento fisiologico, il sistema immunitario riduce le sue potenzialità replicative e funzionali con diminuzione nel numero di precursori cellulari B, in risposta ad involuzione fibro-adiposa senile del midollo osseo rosso<sup>(62)</sup>, e ridotta produzione e trasporto verso organi linfoidi di linfociti T come risultato dell'involuzione timica per atrofia dell'endotelio che inizia già dopo il primo anno d'età e diventa significativa entro la pubertà<sup>(63)</sup>.

La ricostituzione della funzione timica è necessaria per supportare il sistema immunitario e può essere inficiata, oltre che dall'aumentare dell'età del paziente, anche da chemio-radioterapia eseguite in corso di trattamento.

I nostri dati confermano quanto atteso in considerazione della fisiopatologia del sistema immunitario e suggeriscono l'utilità di implementare misure di monitoraggio, profilassi antinfettiva ed *enhancement* del recupero immunologico soprattutto nella fascia d'età peri-puberale, negli adolescenti e nei giovani adulti.

La sottopopolazione linfocitaria CD16+ non sembra subire gli effetti dell'età nella diminuzione della conta e ciò potrebbe dipendere dal fatto che, fisiologicamente, le cellule NK non diminuiscono con l'età ma tendono ad aumentare di numero; ciò che correla con l'invecchiamento è la loro attività citotossica basale che tende a diminuire<sup>(51)</sup>.

## 6.2. RUOLO DELLA SORGENTE DI CSE

L'influenza della sorgente di cellule staminali ematopoietiche sulla ricostituzione immunitaria è ampiamente riconosciuta in letteratura e i risultati ottenuti nello studio della nostra corte sono abbastanza in linea con ciò che è riportato.

Un trapianto di cellule staminali ematopoietiche da sangue cordonale (UCB) favorisce la ricostituzione del comparto cellulare CD16+ che raggiunge valori nella conta mediamente più alti e stabili nel tempo permettendoci di spiegare l'effetto di *Graft vs Leukemia* molto spiccato nella popolazione di trapiantati con questa fonte di CSE. La GvL è una reazione di natura immunologica sostenuta dai linfociti NK del donatore verso le cellule leucemiche o tumorali residue del ricevente, ed è particolarmente importante perché permette di superare il limite della resistenza alla chemio-radioterapia. Questa fonte di cellule staminali contribuirebbe alla possibilità di guarigione del paziente attraverso un'azione immunologica mirata verso il tumore.

Anche il comparto di cellule linfocitarie B (CD19+) raggiunge valori maggiori e più rapidamente nei riceventi sangue cordonale rispetto al sangue midollare o da aferesi, infatti, i trapiantati con sangue cordonale presentano un numero maggiore sia di linfociti B *naïve* che di *Switched Memory B Cell*.

Tuttavia, un trapianto di sangue cordonale contiene un numero ridotto di cellule nucleate T e si associa ad una timopoiesi ritardata e prolungata linfopenia T.

Differentemente, i riceventi sangue midollare sviluppano un'ampia espansione periferica di linfociti T CD8+ oligoclonali rispetto ai riceventi CSE da altre fonti; se da un lato l'aumento rapido dei CD8+ contribuisce ad eliminare eventuali cellule infette da virus o cellule tumorali d'altro canto, non essendo state sottoposte al meccanismo di maturazione timica, non garantiscono la tolleranza del *self* e si associano alla comparsa di GvHD acuta nonché all'inversione del rapporto CD4/CD8 con immaturità del comparto CD4+ più duratura rispetto ai riceventi CSE da aferesi<sup>(31)</sup>.

### 6.3. RUOLO DEL DONATORE

L'istocompatibilità donatore-ricevente è una delle variabili chiave capace di influenzare l'*outcome* di un trapianto allogenico.

Precedenti studi di comparazione tra MSD e MUD hanno evidenziato risultati contrastanti sulla definizione del tipo di donatore ideale suggerendo, in conclusione, che trapianto da MSD e da MUD 8/8 risultino sovrapponibili in termini di sopravvivenza<sup>(64)</sup> che dipende anche dalla rapidità della ricostituzione immunologica.

Grazie ai miglioramenti acquisiti in ambito trapiantologico nella gestione della GvHD in termini di profilassi farmacologica, il trapianto aploidentico ad oggi rappresenta un'opzione per certi aspetti più vantaggiosa rispetto a trapianto da MUD per i pazienti che non dispongono di un MSD: in termini qualitativi le due tipologie di donatore sono equivalenti ma un trapianto da donatore aploidentico è sicuramente meno costoso del MUD<sup>(65)</sup>. È opportuno sottolineare che nonostante gli studi di sopravvivenza abbiano dimostrato la similarità fra trapiantati APLO e MUD, la ricostituzione immunologica dopo trapianto APLO è ritardata rispetto ai trapianti MUD<sup>(66)</sup>.

Dal nostro studio emerge che l'utilizzo di un donatore aploidentico si associa ad una ricostituzione dei linfociti in generale e delle sottopopolazioni CD3+ e CD4+ quantitativamente inferiore rispetto a MSD e MUD; per tali popolazioni abbiamo osservato che il trapianto da MSD è in assoluto da preferirsi per la capacità di garantire la crescita delle conte di interesse in maniera molto significativa.

La crescita, nella conta, della popolazione CD16+ non è influenzata dal tipo di donatore: l'arricchimento in CD16+CD56+ dei prodotti cellulari ottenuti da donatori APLO conseguente alla metodica di manipolazione del *graft* in uso presso il nostro Centro, ovvero la selezione e deplezione negativa dei linfociti T esprimenti il TCR  $\alpha/\beta$  e B CD19+, ne favorisce una ricostituzione adeguata anche nei riceventi APLO.

### 6.4. RUOLO DELLA GvHD ACUTA

La variabile tempo-dipendente GvHD acuta è tra le principali cause di morbidità e mortalità dopo il trapianto di cellule staminali ematopoietiche per cui richiede un trattamento immunosoppressivo tempestivo che può comprendere una politerapia farmacologica che può avere una lunga durata.

Visti la fisiopatologia della GvHD e il meccanismo d'azione dei farmaci immunosoppressivi, è comprensibile come il presentare questa complicanza possa impattare sul recupero immunologico.

Questa variabile non sembra influenzare la crescita della conta dei linfociti NK la cui ricostituzione è generalmente rapida dopo il TCSE e la cui funzione immunitaria viene preservata anche in presenza di GvHD acuta. Generalmente tutte le sottopopolazioni linfocitarie T subiscono un rallentamento nella crescita della conta al manifestarsi della GvHD acuta trattata con terapia immunosoppressiva, condizione che viene confermata nell'analisi svolta nella nostra coorte evidenziando come tale evento risulti significativo soprattutto per la popolazione di linfociti T *helper* (CD4+)<sup>(30)</sup>, ma anche per i linfociti B.

## 6.5. RUOLO DEL CITOMEGALOVIRUS

Alcuni studi suggeriscono un'influenza positiva dell'infezione da CMV sulla ricostituzione immunologica osservando che una riattivazione precoce di CMV si associa ad un incremento medio maggiore della conta linfocitaria e delle sottopopolazioni soprattutto CD3+, CD4+ e CD8+: sembrerebbe che i pazienti che sviluppino l'infezione da CMV siano in grado di espandere una popolazione di linfociti T citotossici (CD8+) di derivazione dal donatore, capaci di stimolare la ricostituzione linfocitaria<sup>(67)</sup>.

La viremia da CMV farebbe quindi da trigger per la proliferazione dell'intera popolazione CD8+ oltre che, verosimilmente, di *subsets* virus-specifici.

L'analisi condotta nella nostra popolazione identifica l'infezione da citomegalovirus nel primo anno post-TCSE come associata ad un incremento della conta media di linfociti in generale e delle sottopopolazioni CD16+ e CD19+.

Tale osservazione si discosta da quanto riportato in letteratura e potrebbe rientrare negli effetti di una stimolazione aspecifica della proliferazione linfocitaria da parte della riattivazione virale (questo potrebbe valere per i CD16+ che fanno parte dell'immunità innata) ma questi dati vanno interpretati con cautela, necessitando di conferma mediante studi prospettici.

## 6.6. RUOLO DELLA DOSE CELLULARE CD34+

Per garantire un adeguato attecchimento del *Graft* ed una buona sopravvivenza è opportuno somministrare un adeguato numero di cellule CD34+. Per molti anni, in ambito trapiantologico si è seguita la regola del “*more is better*”, cercando di massimizzare la dose cellulare ottenuta mediante espianto di sangue midollare e, in alcuni casi, soprattutto nel paziente adulto, preferendo come sorgente cellulare il sangue periferico che contiene da 5 a 10 volte più CD34+ rispetto al sangue da midollo e ancora di più rispetto al sangue da cordone.

All'aumentare della dose cellulare aumenta il rischio di sviluppare GvHD per cui è opportuno identificare una dose ideale che dia i migliori *outcome* con basso rischio di complicanze<sup>(68)</sup>.

Dal nostro studio risulta che una dose cellulare CD34+ maggiore di 5,89 correla con una ricostituzione più rapida della popolazione CD16+. Non è stato indagato il tempo di attecchimento in relazione a questa variabile ma, dalla letteratura, possiamo dire che una dose maggiore rende più rapido l'attecchimento di piastrine e neutrofili indipendentemente dall'utilizzo di G-CSF<sup>(69)</sup>.

L'incremento numerico delle altre sottopopolazioni linfocitarie, tuttavia, non risulta essere influenzato dalla dose di CD34+ ricevuta, suggerendo che esista una dose minima efficace per garantire l'attecchimento e la ricostituzione immunologica, oltre la quale non c'è un ulteriore vantaggio ma solo un aumento del rischio di complicanze, *in primis* la GvHD.

## 6.7. ANALISI DI SOPRAVVIVENZA

Abbiamo studiato separatamente l'impatto che la ricostituzione delle diverse sottopopolazioni linfocitarie potessero avere sulla coorte in termini di sopravvivenza e mortalità. In conclusione, abbiamo evidenziato una scarsa differenza in termini sia di OS che di TRM ed EFS tra la popolazione che raggiunge valori compresi tra il 10° ed il 90° percentile di normalità per età di linfociti e/o *subsets* e la popolazione che non raggiunge questi valori.

La scarsità di risultati può correlare almeno in parte con il basso numero di pazienti che, soprattutto nei primi mesi dopo il TCSE, raggiungono valori normali per determinati *subsets*. Se la ricostituzione dei linfociti NK generalmente è precoce nelle prime settimane/mesi post-TCSE, i linfociti B e T e le loro sottopopolazioni possono mantenere valori inadeguati anche per più di un anno dopo il trapianto, questo è vero soprattutto per la popolazione CD4+ la cui ricostituzione è prevalentemente timo-dipendente. Per questo tipo di valutazioni potrebbe risultare significativo continuare a monitorare i valori delle varie sottopopolazioni oltre l'anno dal TCSE.

A 12 mesi dal trapianto si osserva un *trend* in aumento dell'OS nei pazienti che ricostituiscono CD19+ probabilmente grazie ad una maggior protezione verso lo sviluppo di infezioni. In questi pazienti si verifica una ricostituzione della maturità del comparto cellulare B formato da precursori *naïve* e da cellule B della memoria esprimenti IgM (*non-switched*) o altre immunoglobuline di superficie (*switched*, CD19+CD27+) inoltre, dopo un anno dal trapianto, la produzione anticorpale diventa generalmente più efficace<sup>(31)</sup>.



## 7- CONCLUSIONI

Un'adeguata ricostituzione immunologica post TCSE è cruciale per il successo della procedura e può essere condizionata da vari fattori. Tra questi, i dati del presente studio hanno evidenziato una significativa influenza sull'incremento numerico di alcuni *subsets* di: età del paziente al trapianto, tipo di donatore, sorgente di cellule staminali ematopoietiche, GvHD acuta, riattivazione di CMV, dose cellulare di CD34+.

Ne conseguono alcune considerazioni:

- I risultati ottenuti relativamente al ruolo dell'età (recupero migliore nei pazienti con età al TCSE più giovane) suggeriscono l'utilità di implementare misure di monitoraggio, profilassi antinfettiva ed *enhancement* del recupero immunologico soprattutto nella fascia d'età peri-puberale, negli adolescenti e nei giovani adulti. Tali provvedimenti potrebbero comprendere sia strategie di manipolazione del *Graft* pre-infusione (es. deplezione selettiva delle cellule CD45RA+ negli aploidentici), sia provvedimenti da mettere in atto in corso di o dopo il trapianto. Di questi fanno parte la coinfusione di cellule mesenchimali, l'immunoterapia cellulare adottiva con linfociti T del donatore non manipolati o patogeno-specifici, la somministrazione di acido zoledronico precocemente dopo TCSE aploidentico per stimolare la proliferazione dei linfociti T  $\gamma/\delta$ , la somministrazione di citochine esogene (es. IL-2). Esistono segnalazioni di efficacia di altri principi attivi, quali il fattore di crescita dei cheratinociti (KGF), Sunitinib, cellule T ottenute da colture con stimolazione del *pathway* Notch, il cui utilizzo tuttavia è limitato agli studi clinici. Infine anche l'immunoterapia cellulare a scopo antitumorale (CAR-T cells, cellule NK) rientra nelle strategie di stimolazione del recupero dell'azione antitumorale del sistema immunitario<sup>(70)(71)(72)</sup>.
- Viene confermata, anche nell'ottica dell'immunoricostituzione, la seguente gerarchia nella scelta del donatore<sup>(73)</sup>:
  - (1) donatore familiare identico quando disponibile;
  - (2) donatore *matched* 8/8 o 10/10 da registro;
  - (3) donatore familiare aploidentico;
  - (4) donatore *mismatched* da registro.

- Per quanto riguarda il ruolo della fonte di CSE (migliore ricostituzione CD19+ e CD16+ con UCB), i risultati ottenuti nella nostra analisi vanno interpretati con cautela, data la diversa numerosità dei sottogruppi di pazienti: i riceventi un TCSE da sangue cordonale rappresentano infatti il 6.4% del totale. L'osservazione è comunque di interesse perché le unità di sangue cordonale sono un prodotto cellulare rapidamente disponibile e potrebbero, anche grazie ad una potenziale migliore ricostituzione immunologica per certi *subsets* linfocitari, costituire ad oggi una risorsa in caso di TCSE urgente.
  
- Per quanto riguarda la dose di CD34+, non c'è una correlazione lineare tra quantità di precursori ematopoietici infusi e rapidità del recupero immunologico, ed è quindi auspicabile che il paziente riceva la dose minima efficace a garantire uno stabile attecchimento. Informazioni ulteriori potrebbero derivare da analisi di correlazione tra dose di linfociti T CD3+ infusi (dato non disponibile per tutti i pazienti della presente coorte) e immunoricostituzione, con cui ci si propone di ampliare prospetticamente lo studio.
  
- Per quanto riguarda il ruolo dell'infezione/riattivazione da CMV, le osservazioni del presente studio necessitano di approfondimento possibilmente mediante test funzionali. Lo studio della ricostituzione immunologica consiste, presso il nostro Centro, nella determinazione delle sottopopolazioni linfocitarie su sangue periferico. Si tratta di un esame quantitativo, che non riflette del tutto la reale capacità del sistema immunitario di fronteggiare le infezioni e fornisce un supporto limitato per alcune decisioni cliniche di grande importanza quali il *timing* delle vaccinazioni, la modulazione della terapia immunosoppressiva, della terapia *pre-emptive* e delle profilassi antimicrobiche, la riammissione del paziente in comunità.

Per questo ci riproponiamo di rendere uniforme e sistematico il *follow-up* immunologico dei nostri pazienti, possibilmente integrando alcuni altri test quali:

- (1) La determinazione periodica dei TRECs (*T-Cell receptor excision circles*) mediante *Real-Time* PCR.
  - (2) La determinazione periodica dei linfociti T virus-specifici. Ciò potrebbe essere utile per guidare alcune decisioni terapeutiche, come la necessità di un'immunoterapia cellulare adottiva in pazienti con infezione in atto e per monitorare l'efficacia di tali provvedimenti. L'immunità virus-specifica è inoltre un parametro qualitativo il cui andamento nel tempo riflette la "maturazione" del comparto linfocitario.
- La comparsa di GvHD acuta impatta in maniera significativa sull'*outcome* del trapianto per cui è necessaria una profilassi adeguata possibilmente con principi farmacologici e biologici nuovi che non alterino il recupero immunologico, tra cui si menzionano a scopo esplicativo<sup>(74)</sup>:
- (1) Siglecs/CD24 Fc (*Sialic-acid-binding-immunoglobulin-likelectins* (Siglecs)): sopprimono la produzione di TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL6 ed NFkB per *down*-regolare la risposta immunitaria innata
  - (2) Inattivazione di *Notch Pathway* tramite anticorpo monoclonale
  - (3) Itolizumab: anticorpo monoclonale bloccante CD6
  - (4) Inibizione della P-selectina espressa sui tessuti endoteliali e *up*-regolata in corso di GvHD
  - (5) Alpha 1 antitripsina: riduce l'infiammazione

Non abbiamo evidenziato un impatto di quella che abbiamo definito ricostituzione immunologica adeguata sulla sopravvivenza e mortalità nella nostra coorte in termini di OS, TRM e EFS riscontrando una sola significatività al limite per la ricostituzione dei CD19+.

Ciò non permette, allo stato attuale, di formulare alcuna conclusione sull'influenza del recupero immunologico sull'andamento clinico dei pazienti osservati, ma incoraggia a proseguire il *follow up* immunologico sistematico anche oltre i 12 mesi.

Il presente studio presenta alcune limitazioni:

- Si tratta dell'analisi di una casistica retrospettiva, con dati mancanti ed alcune informazioni non disponibili per tutti i pazienti;
- Prende in esame dati quantitativi senza un correlato funzionale (vedi sopra);
- Considera un lungo intervallo temporale, in cui le terapie di prima linea e di supporto, potenzialmente impattanti la ricostituzione immunologica, potrebbero essere variate.

Ciò nonostante, riflette l'esperienza di un Centro con un volume di attività molto grande e con un *modus operandi* omogeneo, in termini di trattamento della patologia di base, regimi di condizionamento, terapie di supporto e profilassi antimicrobiche.

Oltre a fornire spunti di riflessione e miglioramento per rendere più uniforme ed efficace il *follow up* immunitario dei pazienti trapiantati, soprattutto nell'ottica di implementare misure di immunoterapia cellulare adottiva, l'analisi dei dati ha permesso di fare alcune considerazioni sull'impatto di alcuni fattori legati al paziente e al trapianto sul recupero immunologico. Per alcuni di questi si è confermato quanto noto dalla letteratura, altri sono meritevoli di approfondimento (es. ruolo dell'infezione da CMV) per esempio estendendo lo studio ai TCSE per patologia non oncologica.

La speranza della medicina di precisione è di poter utilizzare nel prossimo futuro le cellule come farmaci, a seconda delle necessità di cura del paziente in quel momento (a scopo antitumorale, antiinfettivo etc.). In attesa di vedere realizzato ciò, affinché il TCSE rimanga una procedura competitiva, è fondamentale continuare a concentrare gli sforzi di ricerca clinica e preclinica sui problemi aperti, tra i quali rientra a pieno titolo la necessità di un adeguato recupero immunologico.

## 8- APPENDICE 1. Diagnosi e stadiazione cGvHD nei pazienti pediatrici. Jagasia et al BBMT 2015.

### Diagnosis and staging cGVHD in children

Jagasia et al BBMT 2015  
pediatric adaptation A. Lawitschka 11/2015

patient name

date:

patient name

▶ please score/check the worst manifestation

▶ diagnostic features are marked **bold**

**classification:actual**

- feat. of acute GVHD  
 feat. of classic cGVHD  
 both

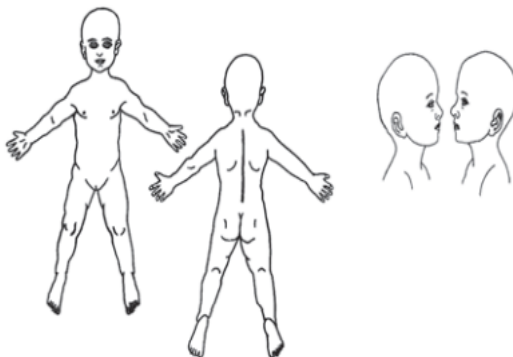
**onset type ONLY at diagn.:**

- de novo  
 quiescent  
 progressive

symptoms/features	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
<b>KPS/LPS:</b> %	<input type="checkbox"/> asymptomatic and fully active (KPS/LPS 100%)	<input type="checkbox"/> sympt., fully amb., restricted only in physically strenuous activity (KPS/LPS 80-90%)	<input type="checkbox"/> sympt., amb., capable of self-care, >50% of waking hours out of bed (KPS/LPS 60-70%)	<input type="checkbox"/> sympt., limited self-care >50% of waking hours in bed (KPS/LPS < 60%)

#### SKIN

Feat. scored by BSA:	no BSA involved	1-18% BSA	19-50% BSA	> 50% BSA
<input type="checkbox"/> maculopapular rash/erythema	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <b>lichen planus-like features</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <b>sclerotic features:</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <b>lichen sclerosis-like</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <b>morphea-like</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> papulosquamous lesions	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> ichthyosis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> keratosis pilaris-like GVHD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>Feat. not scored by BSA:</b>				
<input type="checkbox"/> hyperpigmentation				
<input type="checkbox"/> hypopigmentation/depigmentation				
<input type="checkbox"/> <b>poikiloderma</b>				
<input type="checkbox"/> severe pruritus				
<input type="checkbox"/> hair involvement				
<input type="checkbox"/> nail involvement				
<input type="checkbox"/> sweat impairment				
<input type="checkbox"/> abnormality present but explained entirely by non-GVHD cause (specify):				
▶ feature decisive for diagnosis /scoring:				



**%BSA:**  
child: head front/back 9 / 9  
back 18, chest 18,  
arm left 9, arm right 9  
leg left 13.5, leg right 13.5  
adult: head front/back 4.5 / 4.5  
back 18, chest 18  
arm left 9, arm right 9  
leg left 18, leg right 18  
palm: 1,5

<b>sclerotic features:</b>	<input type="checkbox"/> no sclerotic features	<input type="checkbox"/> superficial sclerotic features "not hidebound" (able to pinch)	<input type="checkbox"/> deep sclerotic features "hidebound" (unable to pinch) <input type="checkbox"/> impaired mobility <input type="checkbox"/> ulceration
----------------------------	--	---	---

#### MOUTH

<input type="checkbox"/> erythema	<input type="checkbox"/> no symptoms	<input type="checkbox"/> mild sympt with disease signs but not limiting oral intake significantly	<input type="checkbox"/> moderate sympt. with disease signs with partial limitation of oral intake	<input type="checkbox"/> severe sympt. with disease signs on examination with major limitation of oral intake
<input type="checkbox"/> <b>lichen planus-like features</b>				
<input type="checkbox"/> hyperkerat. plaques				
<input type="checkbox"/> mucocoeles <input type="checkbox"/> pseudomembranes				
<input type="checkbox"/> ulcers <input type="checkbox"/> mucosal atrophy				
<input type="checkbox"/> dryness <input type="checkbox"/> pain				
<input type="checkbox"/> abnormality present but explained entirely by non-GVHD cause (specify):				
▶ feature decisive for diagnosis /scoring:				

symptoms/features	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
<b>EYES</b>				
<input type="checkbox"/> keratokonjunktivitis sicca (KCS)	<input type="checkbox"/> no symptoms	<input type="checkbox"/> mild dry eye sympt.	<input type="checkbox"/> moderate dry eye sympt.	<input type="checkbox"/> severe dry eye sympt.
<input type="checkbox"/> confirmed by ophthalmologist		not affecting ADL	partially affecting ADL	significantly affecting ADL
<input type="checkbox"/> dryness <input type="checkbox"/> pain		(requirement of	(lubricant eye drops	(special eyewear to relieve pain) or
<input type="checkbox"/> photophobia <input type="checkbox"/> blepharitis		lubricant eye drops	>3 x/d or punctual plugs)	unable to work because of ocular
<input type="checkbox"/> pseudomembranes <input type="checkbox"/> ulcers		≤ 3 x per day)	without new vision	sympt or loss of vision due to KCS
			impairment due to KCS	
<input type="checkbox"/> abnormality present but explained entirely by non-GVHD cause (specify):				
▶ feature decisive for diagnosis /scoring:				
<b>GI TRACT</b>				
<input type="checkbox"/> esophageal web/ prox stricture or ring	<input type="checkbox"/> no symptoms	<input type="checkbox"/> symptoms without significant weight loss (5%)	<input type="checkbox"/> sympt. associated with mild to moderate weight loss (5-15%) or moderate diarrhea	<input type="checkbox"/> symptoms associated with significant weight loss (> 15%) requires nutritional supplement for most calorie needs or esophageal dilatation or severe diarrhea with signif. Interference with daily living
<input type="checkbox"/> dysphagia <input type="checkbox"/> abdominal pain			without significant	
<input type="checkbox"/> anorexia <input type="checkbox"/> failure to thrive			interference with	
<input type="checkbox"/> nausea <input type="checkbox"/> vomiting			daily living	
<input type="checkbox"/> diarrhea <input type="checkbox"/> weight loss ≥ 5%				
<input type="checkbox"/> abnormality present but explained entirely by non-GVHD cause (specify):				
▶ feature decisive for diagnosis /scoring:				
<b>LIVER</b>				
<input type="checkbox"/> hepatic pattern	<input type="checkbox"/> normal total bill	<input type="checkbox"/> normal total bill	<input type="checkbox"/> elevated total bill	<input type="checkbox"/> elevated total bill > 3 mg/dl
<b>Bili:</b> _____ <b>AST:</b> _____ <b>ALT:</b> _____	and ALT or AP	with ALT ≥ 3-5x ULN	but ≤ 3 mg/dl or	
<b>GGT:</b> _____ <b>AP:</b> _____	< 3 ULN	or AP ≥ 3 x ULN	ALT > 5 ULN	
<input type="checkbox"/> abnormality present but explained entirely by non-GVHD cause (specify):				
▶ feature decisive for diagnosis /scoring:				
<b>LUNGS</b>				
<b>FEV1:</b> _____ % <b>MEF25:</b> _____ % <input type="checkbox"/> no symptoms	<input type="checkbox"/> mild symptoms	<input type="checkbox"/> moderate symptoms	<input type="checkbox"/> severe symptoms	
<b>FVC:</b> _____ % <b>MEF50:</b> _____ % <b>FEV1</b> ≥ 80%	(shortness of breath	(shortness of breath	(shortness of breath at rest;	
<b>DLCO:</b> _____ % <b>MEF75:</b> _____ %	after climbing one	after walking on	requiring O2)	
<b>RV:</b> _____ <input type="checkbox"/> RV/TLC > 120%	flight of steps)	flat ground)	<b>FEV1</b> ≤ 39%	
<b>CT:</b> _____	<b>FEV1</b> 60-79%	<b>FEV1</b> 40-59%		
<input type="checkbox"/> abnormality present but explained entirely by non-GVHD cause (specify):				
▶ feature decisive for diagnosis /scoring:				
<b>JOINTS AND FASCIA</b>				
ped P-ROM score (see below)	<input type="checkbox"/> no symptoms	<input type="checkbox"/> mild tightness,	<input type="checkbox"/> tightness or joint	<input type="checkbox"/> contractures, fasciitis
<input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> fasciitis		normal or mild ↓ of	contractures, fasciitis,	significant ↓ of ROM,
<input type="checkbox"/> muscle cramps <input type="checkbox"/> athralgia		range of motion (ROM)	moderate ↓ of ROM,	significant ↓ of ADL
		not affecting ADL	mild - moderate ↓ of ADL	
<input type="checkbox"/> abnormality present but explained entirely by non-GVHD cause (specify):				
▶ feature decisive for diagnosis /scoring:				
<b>GENITAL TRACT</b>				
<input type="checkbox"/> erosions, fissures	<input type="checkbox"/> no signs	<input type="checkbox"/> mild signs	<input type="checkbox"/> moderate signs	<input type="checkbox"/> severe signs with or without symptoms
<input type="checkbox"/> lichen planus-like features				
<input type="checkbox"/> lichen sclerosus-like features				
<input type="checkbox"/> labial/ vaginal scarring <input type="checkbox"/> phimosis				
<input type="checkbox"/> abnormality present but explained entirely by non-GVHD cause (specify):				
▶ feature decisive for diagnosis /scoring:				
<b>Overall GVHD severity</b>				
<input type="checkbox"/> no cGVHD				
<input type="checkbox"/> mild:	max. score of 1 in any affected organ, max. 2 organs affected, no lung involvement			
<input type="checkbox"/> moderate:	≥3 organ with max score 1 or max. score of 2 in any affected organ, lung score max 1			
<input type="checkbox"/> severe:	score 3 in any affected organ, lung score 2-3			

Other indicators, clinical features or complications related to cGVHD			biopsy:
check all that apply and assign a severity score (0-3) based on functional impact			organ:
<input type="checkbox"/> ascites (serositis)	<input type="checkbox"/> myasthenia gravis	<input type="checkbox"/> eosinophilia >500 /ul	GVHD confirmed?
<input type="checkbox"/> pericardial effusion	<input type="checkbox"/> peripheral neuropathy	<input type="checkbox"/> platelets <100 000/ul	
<input type="checkbox"/> pleural effusion	<input type="checkbox"/> polymyositis	<input type="checkbox"/> hypo/hyperglobulinemia	
<input type="checkbox"/> nephrotic syndrome	<input type="checkbox"/> weight loss >5% without GI sympt	<input type="checkbox"/> auto-antibodies	
<input type="checkbox"/> others (specify)	<input type="checkbox"/> diabetes		

**pediatric photographic range of motion (adapted ped P-ROM):**

please mark appropriate number

>

shoulder:	1 (worst)	2	3	4	5 (normal)
					
elbow:	1 (worst)	2	3	4 (normal)	
					
wrist / finger:	1 (worst)	2	3	4 (normal)	
					
global flexion:	1 (worst)	2	3	4 (normal)	
					
ankle:	1 (worst)	2	3 (normal)		
					

**APPENDICE 2.** *Protocolli trattamento in uso presso il Centro Trapianti di Padova*

<b>LLA (prima linea)</b>	-AIEOP-BFM ALL 2000 -AIEOP-BFM ALL R-2006 ad interim -AIEOP-BFM ALL 2009 -AIEOP-BFM ALL 2017 studio osservazionale -Interinfant 06 -Protocollo EsPhALL -EsPhALL2017/COGAALL1631
<b>LAM</b>	-Protocollo AIEOP LAM 2013/01 -Protocollo AIEOP LAM 2002/01-02
<b>LLA (recidiva)</b>	-AIEOP LLA REC 2003 -IntReALL SR 2010
<b>JMML</b>	-Azacitidina 75 mg/m <sup>2</sup> /die per 7 giorni ogni 4-6 settimane -Terapia citoriduttiva secondo schema personalizzato
<b>NBL</b>	-NB-AR-01/ESIOP -SIOP-NBL-HR-01
<b>NHL</b>	AIEOP LNH 97 -AIEOP ALCL 99 -AIEOP BFM LN96 modificato (caso singolo)
<b>HD</b>	-Protocollo individualizzato
<b>MIELODISPLASIE</b>	-Azacitidina -Terapia citoriduttiva secondo schema personalizzato



## 9- BIBLIOGRAFIA

1. Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat Rev.* 2010 Jun 1;36(4):277–85.
2. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75(3):555–62.
3. Sureda A, Bader P, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, et al. Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: Current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(8):1037–56.
4. Balassa. Haematopoietic stem cell transplants : 2019;80(1):33–9.
5. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:301–23.
6. Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, et al. HLA Match Likelihoods for Hematopoietic Stem-Cell Grafts in the U.S. Registry. *N Engl J Med.* 2014;371(4):339–48.
7. Adhikari J, Sharma P, Bhatt VR. Optimal graft source for allogeneic hematopoietic stem cell transplant: Bone marrow or peripheral blood? *Futur Oncol.* 2016;12(15):1823–32.
8. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, al. et. High resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood.* 2007;110:4576–83.
9. Oran B, Saliba RM, Carmazzi Y, de Lima M, Rondon G, Ahmed S, et al. Effect of nonpermissive HLA-DPB1 mismatches after unrelated allogeneic transplantation with in vivo T-cell depletion. *Blood.* 2018 Mar 15;131(11):1248–57.
10. Goodell MA, Rando TA. Stem cells and healthy aging. *Science (80- ).* 2015;350(6265):1199–204.

11. Confer DL, Abress LK, Navarro W, Madrigal A. Selection of Adult Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donors: Beyond HLA. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Jan 1;16(1):S8–11.
12. Ljungman P. The role of cytomegalovirus serostatus on outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2014;21(6):466–9.
13. Belkacemi Y, Labopin M, Giebel S, Loganadane G, Mischczyk L, Michallet M, et al. Single-Dose Daily Fractionation Is Not Inferior to Twice-a-Day Fractionated Total-Body Irradiation Before Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Leukemia: A Useful Practice Simplification Resulting From the SARASIN Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2018;102(3):515–26.
14. Sabloff M, Chhabra S, Wang T, Fretham C, Kekre N, Abraham A, et al. Comparison of High Doses of Total Body Irradiation in Myeloablative Conditioning before Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25(12):2398–407.
15. Nagler A, Rocha V, Labopin M, Unal A, Ben Othman T, Campos A, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for acute myeloid leukemia in remission: Comparison of intravenous busulfan plus cyclophosphamide (Cy) versus total-body irradiation plus cy as conditioning regimen-A report from the acute leukemia workin. *J Clin Oncol.* 2013;31(28):3549–56.
16. Jamieson CHM, Amylon MD, Wong RM, Blume KG. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia in first or second complete remission using fractionated total-body irradiation and high-dose etoposide: A 15-year experience. *Exp Hematol.* 2003;31(10):981–6.
17. Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers MED, Maloney DG, Sandmaier BM, et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2003;102(2):756–62.
18. Brown R, Herzig R, Wolff S, Frei-Lahr D, Pineiro L, Bolwell B, et al. High-dose etoposide and cyclophosphamide without bone marrow transplantation for resistant hematologic malignancy. *Blood.* 1990;76(3):473–9.

19. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Apperley J, et al. NIH Public Access. 2010;15(12):1628–33.
20. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *N Engl J Med*. 1986 Mar 20;314(12):729–35.
21. Oostenbrink LVE, Jol-Van Der Zijde CM, Kielsen K, Jansen-Hoogendijk AM, Ifversen M, Müller KG, et al. Differential elimination of anti-thymocyte globulin of Fresenius and genzyme impacts T-cell reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2019;10(MAR):315.
22. Sevrin F, Gonzales F, Machuron F, de Berranger E, Bruno B. Antithymocyte globulin in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Infusion time and tolerability. *Pediatr Transplant*. 2020 Jun 1;24(4):13694.
23. Luo Y, Jin M, Tan Y, Zhao Y, Shi J, Zhu Y, et al. Antithymocyte globulin improves GVHD-free and relapse-free survival in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2019 5410. 2019 Mar 13;54(10):1668–75.
24. Luznik L, Bolañ Os-Meade J, Zahurak M, Chen AR, Smith BD, Brodsky R, et al. High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease. 2010 Apr 22;115(16):3224-30.
25. Hamilton BK. Current approaches to prevent and treat GVHD after allogeneic stem cell transplantation. *Hematology*. 2018 Nov 30;2018(1):228–35.
26. Jaing TH, Chen SH, Wen YC, Chang TY, Huang JL, Tsay PK. Assessment of Platelet Activation and Immature Platelet Fraction as Predictors of Platelet Engraftment After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cell Transplant*. 2016;25(7):1259–64.
27. Schiffer CA, Bohlke K, Delaney M, Hume H, Magdalinski AJ, McCullough JJ, et al. Platelet Transfusion for Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018 Jan 20;36(3):283–99.

28. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Kremens B, Dilloo D, et al. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Apr;33(8):815–21.
29. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant*. 2005 Jan;35(2):107–19.
30. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1208866>. 2016 Nov 16;7(8):901–16.
31. Elfeky R, Lazareva A, Qasim W, Veys P. Immune reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation using different stem cell sources. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(7):735–51.
32. Brown VI. Hematopoietic stem cell transplantation for the pediatric hematologist/oncologist. *Hematopoietic Stem Cell Transplantation for the Pediatric Hematologist/Oncologist*. 2017. 1–460.
33. Corbacioglu S, Cesaro S, Faraci M, Valteau-Couanet D, Gruhn B, Rovelli A, et al. Defibrotide for prophylaxis of hepatic veno-occlusive disease in paediatric haemopoietic stem-cell transplantation: an open-label, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9823):1301–9.
34. Carreras E. How I manage sinusoidal obstruction syndrome after haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. 2015 Feb 1;168(4):481–91.
35. Rosenthal J. Hematopoietic cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Blood Med*. 2016;7:181–6.
36. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N. The EBMT Handbook: Hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapies. *EBMT Handb Hematop Stem Cell Transplant Cell Ther*. 2018 Dec 12;1–702.

37. Kharfan-Dabaja MA, Kumar A, Ayala E, Aljurf M, Nishihori T, Marsh R, et al. Standardizing Definitions of Hematopoietic Recovery, Graft Rejection, Graft Failure, Poor Graft Function, and Donor Chimerism in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Report on Behalf of the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. *Transplant Cell Ther.* 2021 Aug 1;27(8):642–9.
38. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood.* 2011 Mar 17;117(11):3214–9.
39. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18(4):295–304.
40. Ruutu T, Gratwohl A, De Witte T, Afanasyev B, Apperley J, Bacigalupo A, et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Feb;49(2):168–73.
41. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Mar 1;21(3):389-401.
42. Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR, et al. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Feb 1;21(2):266–74.
43. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017 Feb 1;23(2):211–34.

44. Hildebrandt GC, Fazekas T, Lawitschka A, Bertz H, Greinix H, Halter J, et al. Diagnosis and treatment of pulmonary chronic GVHD: report from the consensus conference on clinical practice in chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Oct;46(10):1283–95.
45. Majhail NS. Long-term complications after hematopoietic cell transplantation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2017 Dec 1;10(4):220–7.
46. Horowitz M, Schreiber H, Elder A, Heidenreich O, Vormoor J, Toffalori C, et al. Epidemiology and biology of relapse after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2018 Nov 1;53(11):1379–89.
47. Vago L, Perna SK, Zanussi M, Mazzi B, Barlassina C, Stanghellini MTL, et al. Loss of Mismatched HLA in Leukemia after Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 2009;361(5):478–88.
48. Van Dongen JJM, Van Der Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: Need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood.* 2015 Jun 25;125(26):3996–4009.
49. Stock S, Schmitt M, Sellner L. Optimizing manufacturing protocols of chimeric antigen receptor t cells for improved anticancer immunotherapy. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences.* 2019 Dec 10;20(24)-6223.
50. Maury S, Mary JY, Rabian C, Schwarzingler M, Toubert A, Scieux C, et al. Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: risk factors and complications in adult patients. *Br J Haematol.* 2001;115(3):630–41.
51. Da Rocha LKA, de Barros SF, Bandeira F, Bollini A, Testa LH de A, Simone AJ, et al. Thymopoiesis in Pre- and Post-Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol.* 2018 Sep 7; 9:1889.
52. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2001 Mar 1;97(5):1458–66.

53. Brown JA, Stevenson K, Kim HT, Cutler C, Ballen K, McDonough S, et al. Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood*. 2010 May 20;115(20):4111–9.
54. Morrissey PJ, Mochizuki DY. Interleukin-1 is identical to hemopoietin-1: Studies on its therapeutic effects on myelopoiesis and lymphopoiesis. *Biotherapy*. 1989 Dec;1(4):281–91.
55. Storek J, Wells D, Dawson MA, Storer B, Maloney DG. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2001 Jul 15;98(2):489–91.
56. Rénard C, Barlogis V, Mialou V, Galambrun C, Bernoux D, Goutagny MP, et al. Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *Br J Haematol*. 2011;152(3):322–30.
57. Kook H, Goldman F, Giller R, Goeken N, Peters C, Comito M, et al. Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: Functional analyses of lymphocytes and correlation with immunophenotypic recovery following transplantation. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997;4(1):96–103.
58. De Vries E, Van Tol MJD, Langlois Van Den Bergh R, Waaijer JLM, Ten Dam MM, Hermans J, et al. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after paediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(3):267–75.
59. Balashov D, Shcherbina A, Maschan M, Trakhtman P, Skvortsova Y, Shelikhova L, et al. Single-Center Experience of Unrelated and Haploidentical Stem Cell Transplantation with TCR $\alpha\beta$  and CD19 Depletion in Children with Primary Immunodeficiency Syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Nov 1;21(11):1955–62.
60. Tsirigotis P, Byrne M, Schmid C, Baron F, Ciceri F, Esteve J, et al. Relapse of AML after hematopoietic stem cell transplantation: methods of monitoring and preventive strategies. A review from the ALWP of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2016 Nov 1;51(11):1431–8.
61. Tosato F, Buccioli G, Pantano G, Putti MC, Sanzari MC, Basso G, et al.

- Lymphocytes subsets reference values in childhood. *Cytom Part A*. 2015;87(1):81–5.
62. Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol*. 2004 Feb;5(2):133–9.
  63. Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, Patel DD, Hale LP. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:529–60.
  64. Saber W, Opie S, Rizzo JD, Zhang MJ, Horowitz MM, Schriber J. Outcomes after matched unrelated donor versus identical sibling hematopoietic cell transplantation in adults with acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2012 Apr 19;119(17):3908–16.
  65. Fuchs EJ. Related haploidentical donors are a better choice than matched unrelated donors: Point. *Blood Adv*. 2017 Feb 14;1(6):397–400.
  66. Shaw BE. Related haploidentical donors are a better choice than matched unrelated donors: Counterpoint. *Blood Adv*. 2017 Feb 14;1(6):401–6.
  67. Pukownik E, Kubicka M, Kurylo-Rafinska B, Debski R, Galazka P, Czyzewski K, et al. Impact of CMV and EBV on Immune Recovery After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Children. *Anticancer Res*. 2018 Oct 1;38(10):6009–13.
  68. Eapen M, Horowitz MM, Klein JP, Champlin RE, Loberiza FR, Ringdén O, et al. Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol*. 2004 Dec 15;22(24):4872–80.
  69. Remberger M, Törlén J, Ringdén O, Engström M, Watz E, Uhlin M, et al. Effect of Total Nucleated and CD34+ Cell Dose on Outcome after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 May 1;21(5):889–93.
  70. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 2010 May 13;115(19):3861–8.



71. Merli P, Algeri M, Galaverna F, Milano GM, Bertaina V, Biagini S, et al. Immune Modulation Properties of Zoledronic Acid on TcR $\gamma\delta$  T-Lymphocytes After TcR $\alpha\beta$ /CD19-Depleted Haploidentical Stem Cell Transplantation: An analysis on 46 Pediatric Patients Affected by Acute Leukemia. *Front Immunol.* 2020 May 12; 11-699.
72. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* 2014 Oct 16;371(16):1507–17.
73. Raiola AM, Dominietto A, di Grazia C, Lamparelli T, Gualandi F, Ibatci A, et al. Unmanipulated haploidentical transplants compared with other alternative donors and matched sibling grafts. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Oct 1;20(10):1573–9.
74. Gooptu M, Antin JH. GVHD Prophylaxis 2020. *Front Immunol.* 2021 Apr 7; 12-605726.