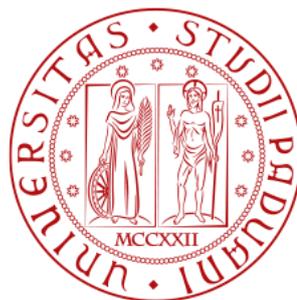


1222·2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SALUTE DELLA DONNA E DEL BAMBINO

Direttore: Ch.ma Prof.ssa Liviana Da Dalt

CLINICA DI ONCOEMATOLOGIA PEDIATRICA

Direttore: Ch.ma Prof.ssa Alessandra Biffi

TESI DI LAUREA

TITOLO TESI

Trapianto di cellule staminali ematopoietiche T e B
depleto da familiare HLA-parzialmente compatibile per il
trattamento della Drepanocitosi in età pediatrica:
esperienza del Centro di Padova

RELATORE: Prof.ssa Alessandra Biffi

CORRELATORE: Dott.ssa Manuela Tumino

LAUREANDO: Jacopo Spertingati

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
ABSTRACT	pag. 3
1. INTRODUZIONE	pag. 5
1.1 L'anemia falciforme (<i>Sickle Cell Anemia, SCA</i>)	pag. 5
1.1.1 Base molecolare della malattia a cellule falciformi	pag. 5
1.1.2 Epidemiologia	pag. 5
1.1.3 Fisiopatologia	pag. 6
1.1.4 Diagnosi e screening	pag. 8
1.1.5 Manifestazioni cliniche, complicanze, mortalità della drepanocitosi	pag. 8
1.2 Gestione e trattamento della drepanocitosi	pag. 10
1.2.1 Trattamenti tradizionali	pag. 11
1.2.2 Nuovi farmaci.....	pag. 12
1.2.3 Terapia genica	pag. 12
1.2.4 Trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche..	pag. 14
2. SCOPO DELLA TESI	pag. 20
3. MATERIALI E METODI.....	pag. 21
3.1 Pazienti	pag. 23
3.1.1 Pazienti trapiantati da donatore familiare HLA-compatibile	pag. 23
3.1.2 Pazienti trapiantati da donatore da registro HLA-compatibile	pag. 24
3.1.3 Pazienti trapiantati da familiare aploidentico	pag. 25
3.2 Donatori.....	pag. 26
3.2.1 Donatori <i>matched sibling</i> (MSD).....	pag. 26
3.2.2 Donatori <i>unrelated</i> da registro (MSD)	pag. 26

3.2.3 Donatori familiari aploidentici	pag. 27
3.3 Caratteristiche del trapianto	pag. 27
3.3.1 Pazienti sottoposti a TCSE allogenico da familiare HLA-compatibile	pag. 27
3.3.2 Pazienti trapiantati da donatore da registro HLA-compatibile	pag. 28
3.3.3 Pazienti trapiantati da familiare aploidentico	pag. 28
4. RISULTATI	pag. 30
4.1 Tempi di attecchimento, durata della degenza, ricoveri post-TCSE	pag. 30
4.2 Riattivazioni virali e altre infezioni	pag. 31
4.3 GvHD, rigetto, chimerismo <i>full donor</i>	pag. 32
4.4 Altre complicanze	pag. 33
4.5 <i>Overall Survival (OS), Event-Free Survival (EFS) e Transplant-Related Mortality (TRM)</i>	pag. 33
5. DISCUSSIONE	pag. 36
BIBLIOGRAFIA	pag. 41

Ringraziamenti

RIASSUNTO

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

L'anemia falciforme (*Sickle Cell Anemia*, SCA), o drepanocitosi, è un disordine ematologico ereditario a trasmissione autosomica recessiva ed è l'emoglobinopatia a maggiore prevalenza a livello mondiale (1). Il trait falcemico è stato associato ad una maggiore resistenza alla malaria nelle aree in cui questa malattia è endemica: ciò ha fatto sì che lo stato di portatore della mutazione rs334 raggiungesse una frequenza del 10-20% in molte zone dell'Africa sub-sahariana, dell'India, del Medio-Oriente e del bacino del Mediterraneo (2,3).

Storicamente, le manifestazioni cliniche della drepanocitosi più conosciute erano gli eventi acuti conseguenti ai fenomeni vasocclusivi e all'aumentata emolisi, ma l'aumento dell'aspettativa di vita dei pazienti ha reso evidenti molte complicanze a lungo termine, risultanti da un danno d'organo cronico legato agli stessi meccanismi fisiopatologici.

Fino a pochi anni fa, le uniche modalità di trattamento capaci di mitigare le manifestazioni cliniche della malattia erano l'idrossiurea e le trasfusioni croniche con chelazione del ferro. La progressiva comprensione dei fenomeni fisiopatologici che contribuiscono alle complicanze della SCA ha permesso lo sviluppo di nuove terapie capaci di ridurre la severità delle sue complicanze. Tuttavia, nonostante le nuove terapie disponibili, ad oggi l'unico approccio curativo per la SCA è rappresentato dal trapianto di cellule staminali e progenitori da donatore sano HLA-compatibile (Allo-TCSE). Il trapianto può sostituire il midollo emopoietico del paziente con le cellule di un donatore sano che produrrà una serie eritroide normale, senza tendenza alla falcizzazione, prima che insorga un danno d'organo importante. Ciò determina una sopravvivenza complessiva (*Overall Survival*, OS) che varia tra il 91% e il 100% e una sopravvivenza libera da eventi (*Event-Free Survival*, EFS) tra il 73% e il 100% (4,5). Nonostante questi risultati incoraggianti, ciò che limita oggi l'utilizzo dell'allo-TCSE nei pazienti SCA è la poca disponibilità di donatori compatibili: meno del 15% dei pazienti ha un donatore familiare (*Matched Sibling Donor*, MSD) e solo il 19% ha un donatore da registro (*Matched Unrelated Donor*, MUD) (6,7). Per questo motivo, negli ultimi anni si sta studiando la possibilità di ricorrere a donatori alternativi, tra cui i donatori familiari con genotipo aploidentico.

Lo scopo di questa tesi è quindi quello di dimostrare la non inferiorità in termini di sopravvivenza (OS e EFS) dell'aplo-TCSE rispetto al trapianto da MSD e da MUD nell'ambito della casistica del centro di Padova. La possibilità di utilizzare queste fonti alternative permetterebbe di ampliare la proporzione dei pazienti drepanocitici candidabili a trapianto.

MATERIALI E METODI

Il presente lavoro è uno studio osservazionale retrospettivo monocentrico su una popolazione di pazienti pediatrici affetti da malattia drepanocitica sottoposti a TCSE allogenico da donatore familiare HLA-compatibile, TCSE allogenico di donatore da Registro, TCSE aploidentico da familiare HLA-parzialmente compatibile presso l'Oncoematologia Pediatrica dell'Azienda Ospedale Università di Padova da gennaio 2010 a dicembre 2020. Sono stati raccolti retrospettivamente i dati riguardanti in totale 20 coppie ricevente-donatore.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel nostro studio nessun paziente è deceduto nel corso del follow-up post-trapianto. Pertanto, abbiamo riportato una OS = 100% e una TRM (*Transplant-Related Mortality*) = 0%. Solo un paziente, appartenente al gruppo MSD, ha avuto una recidiva di malattia in seguito al rigetto del trapianto. Pertanto, considerando l'intera popolazione dello studio, abbiamo registrato una EFS = 95%; nel gruppo MSD l'EFS è del 90%, mentre nei gruppi Aplo e MUD del 100%.

La maggior parte dei pazienti ha sviluppato un chimerismo misto senza avere tuttavia segni di ripresa della malattia. Nessun paziente dello studio ha manifestato una malattia del trapianto contro l'ospite (*Graft versus Host Disease, GvHD*) cronica, mentre tutti i casi di GvHD acuta di grado II-IV che si sono manifestati hanno interessato bambini trapiantati da MUD (4/5).

In conclusione, il nostro studio dimostra una non inferiorità del TCSE da familiare aploidentico rispetto al trapianto da MSD e da MUD in pazienti in età pediatrica affetti da drepanocitosi. Tale dato dovrà essere confermato mediante studi prospettici, multicentrici e con una casistica di pazienti maggiore.

ABSTRACT

INTRODUCTION AND AIM

Sickle Cell Anemia (SCA) is an autosomal recessive hematologic disorder and the most common hemoglobinopathy worldwide (1). Sickle cell trait provides a substantial survival advantage in malaria-endemic environments: this benefit has driven rs334 carrier frequencies to 10–20% in many parts of sub-Saharan Africa, India, the Middle East, and the Mediterranean basin (2,3).

Acute clinical manifestations, caused by vasocclusive events and by an increased hemolysis, have historically been the best well-known, but, thanks to the increase in life expectancy for patients with Sickle Cell Anemia, many long-term complications have been reported, resulting from a chronic organ damage.

Until a few years ago, the only therapies which aimed to control symptoms were Hydroxyurea (HU) and chronic blood transfusions associated to iron chelation; nowadays, the better understanding of the physiopathology underlying SCA complications has allowed the development of new therapies. Nevertheless, hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from a healthy HLA-matched donor (allogeneic HSCT) currently remains the only curative approach for SCA. This procedure can replace patient's bone marrow (BM) with healthy donor's hemopoietic stem/progenitor cells before the onset of a major organ damage. This therapy grants an Overall Survival of 91-100% and an Event-Free Survival of 73-100%. Despite these encouraging results, allogeneic HSCT in patients with SCA is limited by the low availability of matched donors: less than 15% of patients have a matched sibling donor (MSD) and only 19% have a matched unrelated donor (MUD). For this reason, the possibility of using alternative donors, such as HLA-haploidentical related donors, have been explored.

The aim of this study is to show the non-inferiority of haploidentical HSCT compared to HSCT from MSD and MUD in terms of overall survival (OS) and event-free survival (EFS) within the patients of the Padua center. The possibility of using alternative sources would allow increasing the number of patients suffering from sickle cell anemia who could be treated with HSCT

MATERIALS AND METHODS

This is an observational retrospective monocentric study on a population of pediatric patients suffering from sickle cell disease treated with allogeneic HSCT from MSD, from a MUD or from a HLA-haploidentical related donor at Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit of Padova from January 2010 to December 2020. Data about a total of 20 couples of donors and recipients have been retrospectively collected.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study no patient died during the follow-up after HSCT. Therefore, we reported an OS = 100% and a Transplant-Related Mortality (TRM) = 0%. Only one patient, who received his transplant from a MSD, relapsed because of a graft rejection. Therefore, considering the whole population, we reported an EFS = 95%; MSD group has an EFS = 90%, while Haplo and MUD groups have an EFS = 100%. Most of the patients developed a mixed chimerism without showing signs of relapse. No patients in this study developed chronic GvHD (Graft versus Host Disease) and all the cases of II-IV grade acute GvHD occurred in the MUD group (4/5). In conclusion, this study shows the non-inferiority of HSCT from haploidentical related donors as compared to HSCT from MSD and MUD donors in pediatric patients suffering from SCA. This result needs to be confirmed by prospective, multicentric studies on a wider number of patients.

INTRODUZIONE

1.1 L'ANEMIA FALCIFORME (*SICKLE CELL ANEMIA, SCA*) (8)

L'anemia falciforme (SCA), o drepanocitosi, è un disordine ematologico ereditario a trasmissione autosomica recessiva ed è l'emoglobinopatia a maggiore prevalenza a livello globale (1). È stata descritta per la prima volta nella letteratura occidentale da Herrick, nel novembre del 1910 (9); nel 1949, Pauling et al. (10) la descrissero come la prima "malattia molecolare", associandola alla presenza di una emoglobina anormale, che, per via della sua forma, chiamarono HbS (dove la "s" sta per *sickle*, che significa "falce"); nel 1957, Ingram (11) scoprì che la causa della sintesi della HbS era una singola sostituzione amminoacidica in posizione 6 della catena beta dell'emoglobina (acido glutammico sostituito da una valina, mutazione E6V) e, nel 1963, Goldstein et al. (12) dimostrarono che questa sostituzione amminoacidica deriva dalla sostituzione di una singola base (A>T) a livello del codone 6 (rs334).

1.1.1 BASE MOLECOLARE DELLA MALATTIA A CELLULE FALCIFORMI

Con il nome di "malattia a cellule falciformi" (*Sickle Cell Disease, SCD*) si descrive una sindrome clinica caratterizzata dalla presenza di HbS. Le cause genetiche della SCD includono:

- omozigosi per la mutazione rs334 (HbSS), generalmente chiamata SCA.
- eterozigosi composta da rs334 e una mutazione che porti o a un'altra variante strutturale della catena beta (ad esempio l'HbC, in cui l'acido glutammico in posizione 6 viene sostituito da una lisina) oppure a ridotti livelli di produzione della catena beta (beta-talassemia).

Nei pazienti di origine afroamericana, SCA è la causa più comune di SCD (65-70%), seguita da HbSC (circa 30%) (8). Lo stato di eterozigosi di rs334 risulta nel trait falcemico (HbAS), in cui gli eritrociti contengono un misto di molecole HbA e HbS.

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA

La malattia drepanocitica rappresenta uno dei più comuni disordini congeniti ematopoiетici oltre ad essere l'emoglobinopatia con la più alta prevalenza a livello mondiale. Sebbene la sua prevalenza a livello Europeo non sia nota, il numero di

pazienti pediatrici registrati in centri di ematologia pediatrica è in costante aumento a causa del recente fenomeno migratorio.

Il trait falcemico è stato associato ad una maggiore resistenza alla malaria nelle aree in cui questa malattia era e continua ad essere endemica, tramite meccanismi non ancora chiariti. Uno studio condotto nel 2014 in Africa, Asia e Oceania, confrontando quasi 12000 casi severi di malaria e più di 17000 controlli, ha dimostrato una riduzione dell'86% del rischio di malaria severa per gli individui portatori di HbAS (13): questo beneficio ha fatto sì che lo stato di portatore della mutazione rs334 raggiungesse una frequenza del 10-20% in molte zone dell'Africa sub-sahariana, dell'India, del Medio-Oriente e del bacino del Mediterraneo (2). Stime recenti suggeriscono che globalmente più di 300.000 bambini nascono ogni anno con SCA (3) e che 25-30 milioni di persone nel mondo soffrono di SCD, di cui l'85% in Africa sub-sahariana (14).

1.1.3 FISIOPATOLOGIA

Tutte le manifestazioni cliniche caratteristiche della SCD sono riconducibili a due fattori fondamentali: la vasocclusione e l'aumentata emolisi.

L'evento fondamentale che sottostà alle molteplici manifestazioni cliniche della SCA è la polimerizzazione delle catene di HbS in condizioni di bassa tensione di ossigeno (15). Questo evento induce una disidratazione mediata dall'influsso di calcio, portando ad un'aumentata concentrazione intracellulare di HbS e quindi ad una ancora maggiore polimerizzazione della stessa, con conseguente alterazione della struttura dell'eritrocita, il quale assume la forma a falce (16). I globuli rossi così deformati hanno difficoltà ad attraversare i capillari a livello periferico e causano un ingorgo che risulta in una ipossia tissutale. Tuttavia, non è solo questo evento l'unico responsabile del fenomeno della vasocclusione, ma almeno tre altre cause sono state riconosciute. Gli eritrociti falcizzati sono anche altamente fragili, con una vita media di circa 16 giorni, contro i 120 dei globuli rossi sani (17): il continuo rilascio di emoglobina libera nel comparto intravascolare induce una deplezione dell'ossido nitrico (NO) biodisponibile, contribuendo alla patologia (18). La neutrofilia è un'altra caratteristica della SCA: studi recenti indicano che i neutrofili svolgono un ruolo centrale nel fenomeno della vasocclusione mediante le loro interazioni con eritrociti contenenti HbSS ed endotelio vasale (19) ma anche attraverso la formazione di trappole extracellulari (*Neutrophil Extracellular Traps*,

NET) che infliggono un ulteriore danno all'endotelio (20). Infine, è stata osservata maggiore una attivazione basale delle piastrine, attivazione che aumenta ulteriormente durante le crisi vasocclusive (21).

Tutti questi fattori di rischio fanno della SCA uno stato ipercoagulativo, come dimostrato dalla maggiore frequenza nei drepanocitici di eventi trombotici venosi e arteriosi. Pertanto, la gestione ospedaliera delle crisi di dolore acuto comprende anche una profilassi antitrombotica che viene continuata il più delle volte anche dopo la risoluzione della stessa (8).

I pazienti con SCA sono in costante stato di emolisi scompensata, che aumenta ulteriormente durante le crisi di dolore acuto, con aumento di lattato deidrogenasi (LDH) plasmatica (22). L'emolisi e il conseguente rilascio di emoglobina hanno un ruolo fondamentale nella fisiopatologia degli eventi vasocclusivi: oltre alla già citata riduzione della biodisponibilità di NO, è stato osservato nei topi che l'esposizione dell'endotelio all'eme induce upregolazione nella produzione di molecole di adesione, aumentata permeabilità vascolare e reclutamento di neutrofili (23), i quali vengono anche attivati direttamente dall'eme (20). Oltre a ciò, studi epidemiologici suggeriscono che molte complicanze della SCA sono correlate ad un aumentato

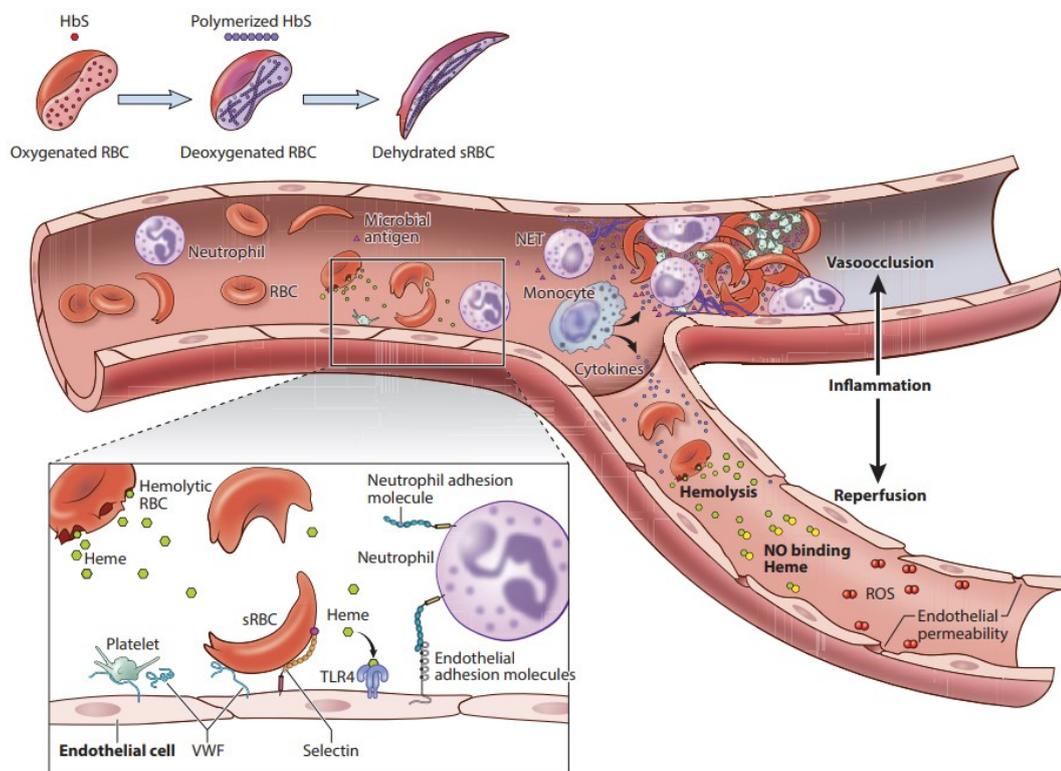


Figura 1.1 Fisiopatologia, stimoli infiammatori e interazioni cellulari della SCA. Da *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 2018. 19:113–47. Legenda: HbS, emoglobina S; NET, neutrophil extracellular trap; NO, nitric oxide; RBC, red blood cell; ROS, reactive oxygen species; SCA, sickle cell anemia; sRBC, sickle red blood cell; VWF, von Willebrand factor

livello di emolisi e ad una ridotta concentrazione basale di emoglobina, tra cui la colelitiasi, la formazione di ulcere cutanee agli arti inferiori, il priapismo e l'ipertensione polmonare (24,25).

1.1.4 DIAGNOSI E SCREENING

La diagnosi di SCD si basa sull'analisi dell'Hb. Tipicamente questa analisi consiste in elettroforesi proteica o cromatografia, che sono tecniche economiche disponibili in tutto il mondo (26), tuttavia la spettrometria di massa dell'Hb e l'analisi del DNA stanno prendendo sempre più piede in quanto permettono degli studi a più alto rendimento (27). In alcuni Paesi è inoltre disponibile uno screening prenatale volto ad identificare le coppie che possono avere figli con SCD ma anche a diagnosticare la patologia in epoca prenatale (27). La diagnosi precoce permette di impostare tempestivamente una profilassi antibiotica nel neonato (i bambini affetti da SCD sono ad alto rischio di infezioni acute, cfr. 1.3.5) e di educare i genitori al riconoscimento delle complicanze come il sequestro splenico acuto (28).

1.1.5 MANIFESTAZIONI CLINICHE, COMPLICANZE E MORTALITÀ DELLA DREPANOCITOSI

Nonostante il miglioramento significativo nella gestione dei pazienti affetti da drepanocitosi, sia a scopo preventivo che terapeutico, purtroppo morbidità e mortalità secondari al danno multiorgano cronico che tale malattia induce non sono altrettanto migliorati. Infatti, l'aspettativa media di vita di tali pazienti è intorno ai 40-50 anni, con un rischio di disabilità del 30-50%.

Storicamente, le manifestazioni cliniche più riconosciute erano gli eventi acuti, tra cui i più comuni sono gli episodi di dolore. Con l'aumento dell'aspettativa di vita per i pazienti drepanocitici, si è visto che i pazienti giovani/adulti possono presentare un danno d'organo cronico.

Manifestazioni acute. Una delle più frequenti manifestazioni precoci di SCA è la *hand-foot syndrome*, caratterizzata da un doloroso rigonfiamento di una o più estremità dovuto all'infarto del midollo all'interno delle piccole ossa presenti a livello di mani e/o piedi (29).

Dopo il primo anno di vita, la più frequente complicanza acuta sono le crisi dolorose, che consistono in episodi di dolore ad insorgenza acuta a livello di estremità,

petto, addome e/o schiena, e che sono dovute a fenomeni vasocclusivi con conseguente danno da ischemia-riperfusion. Queste crisi possono essere ulteriormente complicate da necrosi ossea e conseguenti infezioni secondarie, come osteomieliti o artriti settiche (8).

Un'altra complicanza acuta comune è la sindrome toracica acuta (*acute chest syndrome, ACS*), caratterizzata da tosse, dispnea, segni di consolidamento del parenchima polmonare e ipossiemia, e scatenata tipicamente da infezioni, embolia polmonare grassosa e microembolismi di aggregati eritrocitari (29). L'anemia acuta, definita come un calo di almeno 2g/dL di Hb rispetto al basale (29), è una comune caratteristica delle crisi di dolore ma può anche essere dovuta a un sequestro intravascolare degli eritrociti, tipicamente a livello splenico o epatico (30), ad episodi aplastici secondari ad infezione da Parvovirus B19 (31) o a un'aumentata emolisi secondaria a infezioni acute severe.

I pazienti con SCA sono anche a rischio di gravi infezioni batteriche, soprattutto causate da germi capsulati *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *Salmonella* spp. Questo stato di aumentata suscettibilità è legato all'asplenia funzionale che consegue ai ripetuti episodi di ischemia tissutale, episodi responsabili anche di un danno a livello dell'intestino e delle altre barriere contro l'ingresso di patogeni all'interno dell'organismo e della formazione di aree ischemiche che rappresentano possibili foci settici (32).

Altre complicanze comuni sono:

- priapismo, condizione di spontanea e dolorosa erezione che dura più di 2 ore
- danno renale acuto
- ictus, che probabilmente rappresenta la complicanza più devastante di questa patologia, e che può essere di natura sia ischemica, più frequente, che emorragica (33). In età infantile è possibile valutare il rischio di ictus ischemico misurando la velocità del flusso ematico nei vasi cerebrali mediante ecodoppler transcranico (*transcranial Doppler, TCD*), metodica che oggi viene ampiamente utilizzata come screening: i pazienti con velocità ≥ 200 cm/s sono considerati ad alto rischio e per questo indirizzati verso una terapia trasfusione preventiva (34).

Complicanze croniche. Tra queste complicanze ritroviamo il danno neurologico, evidenziato in circa il 39% di pazienti entro i 18 anni di età. In particolare, studi di neuroimaging basati sull'utilizzo della risonanza magnetica hanno permesso di evidenziare infarti cerebrali silenti (anomalie all'imaging di almeno 3mm in presenza di un esame neurologico normale) (35). Fattori di rischio includono basse concentrazioni di Hb, elevata pressione arteriosa sistolica, sesso maschile e episodi di anemia acuta (36).

Altra complicanza comune è l'ipertensione polmonare, che rappresenta una causa importante di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da drepanocitosi. Essa può essere associata a due cause: circa una metà dei casi è di origine precapillare, dovuta alla vasculopatia che insorge per gli eventi di falcizzazione ricorrenti, per lo stato infiammatorio basale tipico di questi pazienti, per il tromboembolismo cronico e per la deplezione di NO già descritta (cfr. 1.3.3) (37); la restante metà ha invece alla base meccanismi patologici a livello postcapillare, associati sostanzialmente alla disfunzione ventricolare sinistra causata dall'elevata gittata cardiaca e dal sovraccarico di volume ventricolare secondari all'anemia cronica (38) e che si manifesta in circa il 13% degli adulti con SCD (24).

Un'ultima complicanza che deve essere considerata è il danno renale, che è quasi inevitabile nella drepanocitosi e che porta ad un danno renale cronico (allo stadio III-IV) il 4-18% dei pazienti (31) e può anche causare un'ipertensione renovascolare. Il meccanismo fisiopatologico si basa sul fatto che l'ipossia, l'acidosi e l'iperosmolarità tipiche della midollare renale rappresentano un ambiente perfetto per la polimerizzazione dell'HbS, portando ad un danno acuto ischemico che sommandosi nel tempo può terminare in una insufficienza renale cronica (8).

1.2 GESTIONE E TRATTAMENTO DELLA DREPANOCITOSI

Per molti anni, il trattamento della SCA si è limitato alla somministrazione di analgesici per la gestione delle crisi di dolore acuto e alle trasfusioni di sangue per particolari indicazioni, tra cui episodi di ACS e di anemia acuta severa (29). Fino a pochi anni fa, le uniche terapie che miravano ad un controllo della sintomatologia erano l'idrossiurea e le trasfusioni croniche con chelazione del ferro; la maggiore comprensione dei fenomeni fisiopatologici sottostanti alle complicazioni della SCA ha permesso lo sviluppo di nuove terapie, volte al controllo della storia naturale della patologia.

1.2.1 TRATTAMENTI TRADIZIONALI

L'idrossiurea è stato per lungo tempo l'unico farmaco approvato nel trattamento della SCA in grado di prevenirne le complicanze. Esso agisce come potente inibitore della ribonucleotide reductasi, un enzima chiave nella sintesi del DNA (39). La sua somministrazione al corretto dosaggio (tipicamente di 15-30 mg/kg/die) induce una riduzione di neutrofili, reticolociti, piastrine e citochine infiammatorie, ma anche l'aumento della produzione di emoglobina fetale (HbF)¹: tutti questi effetti hanno come conseguenza un controllo sui fenomeni di vasocclusione e di emolisi, quindi un aumento dei livelli basali di Hb e un miglioramento della reologia di eritrociti e neutrofili grazie alla riduzione della citoaderenza vascolare (41).

La terapia trasfusionale cronica ha dimostrato di ridurre il rischio di ictus ischemico nei bambini ad elevato rischio sulla base del monitoraggio con TCD: nello studio STOP (*Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia*), questa terapia è stata associata ad una riduzione del 92% del rischio di stroke nei bambini con velocità al TCD ≥ 200 cm/s e anche ad una riduzione del rischio di ulteriori stroke in bambini con infarti silenti (42). Il trial SWITCH (*Stroke with Transfusions Changing to Hydroxyurea*) ha dimostrato che la trasfusione cronica con chelazione del ferro è superiore all'idrossiurea nella gestione dei bambini con ictus esistente e sovraccarico di ferro (43). Complicanze comuni di questa terapia sono il sovraccarico di ferro e le reazioni emolitiche post-trasfusione causate dallo sviluppo di alloimmunizzazione verso gli antigeni degli eritrociti infusi. Quest'ultima rappresenta la complicanza più temuta ed è inoltre relativamente più comune nei pazienti con SCA: una possibile ragione di questa maggiore incidenza è il mismatch tra gli antigeni eritrocitari espressi nei pazienti di origine africana e quelli dei donatori, che più frequentemente sono di origine europea (44). Come prevenzione, molti centri trasfusionali hanno adottato la procedura di fenotipizzazione estesa dei globuli rossi, includendo gli antigeni AB0, Rh, Kell, Kidd, Duffy, S e s.

Oltre a questi due approcci terapeutici, un'altra pratica ormai consolidata dagli anni '80 è la profilassi antibiotica con penicillina volta a prevenire le severe infezioni

¹ L'HbF ($\alpha_2\gamma_2$) ha un effetto di controllo sulla polimerizzazione dell'HbS perché i tetrameri ibridi ($\alpha_2\gamma\beta^S$) e l'HbF stessa da una parte danno una riduzione della concentrazione intracellulare dell'HbS e dall'altra non possono prendere parte alla polimerizzazione dell'HbS, risultando così in un effetto benefico sulla SCA che consiste in un ridotto dolore e un'augmentata sopravvivenza (40)

batteriche responsabili di mortalità in età precoce, a cui è seguita l'introduzione della vaccinazione contro *S. pneumoniae* e *H. influenzae* (45–47).

Infine, per il trattamento degli episodi di dolore acuto, molto spesso è necessario ricorrere all'utilizzo di forti analgesici, compresi gli oppioidi orali, che si sono dimostrati equivalenti a quelli per via parenterale nei bambini (48).

1.2.2 NUOVI FARMACI

La *Food and Drug Administration* (FDA) ha approvato negli ultimi anni tre nuovi farmaci per il trattamento della SCD. Come visto in precedenza (cfr. 1.3.3), la polimerizzazione dell'HbS è l'evento che sta alla base di tutte le complicanze della SCD; pertanto, si è cercato di sviluppare dei farmaci in grado di prevenire proprio questo fenomeno. Voxelotor (GBT440) è un aldeide poliaromatica che lega l'Hb ossigenata in modo reversibile e stabilizza il legame con l'ossigeno: nello studio di fase 3 HOPE (*Hemoglobin Oxygen Affinity Modulation to Inhibit HbS Polymerization*) si è dimostrata efficace nel ridurre la necessità di trasfusioni ma ha fallito nell'obiettivo secondario di ridurre la frequenza delle crisi di dolore (49).

Un altro farmaco recentemente approvato è la L-glutamina, che in uno studio randomizzato ha dimostrato la capacità di ridurre il numero di crisi di dolore contrastando la deplezione di glutamina che contribuisce al danno a carico della membrana cellulare, riducendo così la citoaderenza delle cellule falcizzate all'endotelio vascolare (50,51). A causa dei suoi effetti collaterali a livello gastrointestinale, il tasso di abbandono del farmaco è stimato maggiore del 60% (52).

Il terzo farmaco approvato di recente è il Crizanlizumab, un anticorpo monoclonale che inibisce la P-selectina bloccando l'adesione di eritrociti, neutrofilo e piastrine all'endotelio. Anche questo ha dimostrato di ridurre il numero di crisi di dolore in uno studio randomizzato (53).

Tutti questi farmaci hanno il grande limite di essere molto costosi e di non essere in grado di migliorare la qualità di vita dei pazienti con SCD (54).

1.2.3 TERAPIA GENICA (55)

Il concetto che la terapia genica possa curare le malattie genetiche umane è emerso negli anni '70, dopo la scoperta che i virus possono fungere da sistema di trasporto di geni (56). L'applicazione di questa tecnica nell'ambito delle emoglobinopatie è sempre stata un'area di interesse nel campo della ricerca, ma le difficoltà associate

in particolare ai vettori esprimenti beta-globina hanno ritardato il passaggio dal laboratorio al paziente: i vettori virali erano inizialmente insufficienti a trasportare il pesante gene della globina e gli elementi regolatori necessari per un'elevata espressione (55). Dopo la scoperta del locus della regione di controllo della beta-globina (locus control region, LCR), nuovi vettori lentivirali (basati sull'utilizzo del virus HIV) contenenti una catena beta mutante, con una glutamina sostituita da una treonina in posizione 87 (β^{T87Q}) che conferiva proprietà anti-falcizzazione, in modelli murini di SCD risolsero l'anemia, ridussero il danno d'organo e espressero fino al 20-25% Hb del vettore (57).

Mentre le prime metodologie di terapia genica consistevano in strategie di *gene addition*, adesso ci sono diverse potenziali strategie, come l'aggiunta di beta-globina per formare HbA o di gamma-globina per aumentare l'espressione di HbF: nucleasi programmabili, come le nucleasi *zinc-finger* (ZFN), le nucleasi *transcription activator-like effector* (TALEN) e le meganucleasi, diminuiscono gli effetti off-target e sono in grado di correggere efficacemente le mutazioni della SCD o di indurre la globina fetale modificando sequenze regolatorie come BCL11A, KLF1 e MYB (58).

La recente scoperta del sistema CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated protein 9*), tuttavia, ha rivoluzionato le strategie di *genome editing*, introducendo una tecnologia facile da progettare, altamente efficiente e poco costosa (59): un confronto tra ZFN, TALEN e CRISPR/Cas9 nella loro capacità di modificare il locus della beta-globina ha dimostrato la superiorità del sistema CRISPR/Cas (60).

Complessivamente, i vantaggi del *targeted gene editing* rispetto al *gene addition* includono una precisa correzione del gene e la capacità di ridurre significativamente o evitare del tutto le integrazioni non specifiche che possono portare ad una oncogenesi inserzionale. Inoltre, il *gene editing* non ha lo stesso rischio di perdita di efficacia dovuta al *gene silencing*, ossia al silenziamento che invece può avvenire nell'ambito del *gene addition*.

Una modificazione genica riuscita per SCD include diversi principi di base:

1. trasferimento genico nelle CSE ad alta efficienza e con una genotossicità minima
2. nelle strategie di *addition*, un'espressione ad alto livello del gene inserito, indipendentemente dal sito di integrazione

-
3. correzione del fenotipo e miglioramento della clinica
 4. espressione del gene inserito specifica per la linea eritroide e per lo stadio di sviluppo.

Dopo decenni di ricerche nel campo, la terapia genica per la cura della SCD è ora una realtà ed è studiata in numerosi trial clinici. Tuttavia, non sono ancora disponibili dati sufficienti relativi a sicurezza ed efficacia in grado di confermarne l'utilità su larga scala in pazienti affetti da malattia drepanocitica.

1.2.4 TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) è una procedura terapeutica complessa impiegata per la cura di numerose patologie ematologiche, siano esse maligne o benigne. Il TCSE prevede la sostituzione completa del midollo osseo del paziente (ricevente) attraverso una terapia sovramassimale (condizionamento) costituita da chemioterapia associata o meno a radioterapia, seguita poi dall'infusione delle cellule staminali ematopoietiche (CSE).

Il condizionamento pre-TCSE ha tre funzioni essenziali:

- Eradicare la patologia maligna ematologica
- Indurre una immunosoppressione tale da assicurare un attecchimento delle CSE e da prevenire sia il rigetto che la *Graft versus Host Disease (GvHD)*.
- Fornire lo "spazio" nel midollo osseo del ricevente per le nuove CSE (61)

Le fonti di CSE comunemente impiegate sono:

- CSE da midollo osseo (*Bone Marrow, BM*): storicamente rappresenta la prima fonte di CSE utilizzata (62). La raccolta avviene mediante procedura di espianto di midollo osseo, che permette di prelevare direttamente le cellule dalla sede della loro produzione
- CSE da sangue cordonale (*Umbilical Cord Blood, UCB*): il suo primo impiego risale al 1986 (63). Le cellule vengono raccolte al momento del parto direttamente dal cordone ombelicale e successivamente crioconservate fino al loro impiego
- CSE da sangue periferico (*Peripheral Blood Stem Cells, PBSC*): utilizzate dal 1994, la raccolta avviene previa mobilizzazione con stimolazione mediante fattore di crescita (*G-CSF, Granulocyte-Cell Stimulating Factor*) (64,65).

A seconda del grado di compatibilità HLA tra donatore e ricevente, il TCSE allogenico può essere:

- TCSE allogenico da donatore HLA-compatibile: il donatore può essere un familiare (solitamente fratello o sorella: *Matched Sibling Donor, MSD*) oppure non familiare reclutato dalle banche di donatori di midollo osseo o di cordone ombelicale nazionali o internazionali (*Matched/Mismatched Unrelated Donor, MUD*). La compatibilità tra donatore e ricevente è completa o può esserci una differenza HLA.
- TCSE allogenico da donatore parzialmente HLA-compatibile o TCSE aploidentico: il donatore è solitamente un familiare (madre, padre, fratello) e condivide con il ricevente metà dei loci HLA (61).

L'infusione delle CSE avviene per via endovenosa attraverso un accesso venoso centrale. Una volta infuse, qualsiasi sia la loro origine (BMCSE, PBCSE, UCBCSE) queste cellule raggiungono il midollo osseo (“*homing*”) dove, previo attecchimento, iniziano a moltiplicarsi e differenziarsi fino a completa ricostituzione del nuovo sistema ematopoietico. In generale, viene considerato “attecchimento” il momento in cui si assiste ad uno stabile aumento del numero di granulociti neutrofili e piastrine per almeno tre giorni consecutivi (attecchimento dei neutrofili: numero di neutrofili $>500/\text{mmc}$; attecchimento piastrinico: numero di piastrine $>50.000/\text{mmc}$ a distanza di almeno una settimana dall'ultima trasfusione). Solitamente l'attecchimento avviene in circa 2-3 settimane. Le tempistiche di recupero midollare dipendono principalmente da: numero totale di cellule nucleate e di CD34+ infuse, fonte di CSE impiegate (BM, PBSC o UCB).

In ambito di SCD, il TCSE allogenico è attualmente l'unica opzione terapeutica curativa, indicato solo per i pazienti con gravi complicanze secondarie alla malattia quali stroke, episodi di ACS e/o altre gravi compromissioni d'organo (66) (Tabella 1.6).

Il primo TCSE HLA-identico eseguito con successo per il trattamento della malattia drepanocitica risale al 1984 e fu effettuato in un paziente con SCD e leucemia mieloide acuta (67). Da allora, diversi gruppi hanno descritto serie di pazienti trapiantati da donatori MSD con una sopravvivenza complessiva (*Overall Survival, OS*) che varia tra il 91% e il 100% e una sopravvivenza libera da eventi (*Event-Free Survival, EFS*) tra il 73% e il 100% (4,5). Inoltre, sia l'OS che l'EFS sono risultate

migliori nei pazienti più giovani, l'EFS è risultata più alta nei trapianti eseguiti dopo il 2006 e l'OS è risultata inferiore nei trapianti di PBSC (68).

Alcune delle più comuni indicazioni sono riportate nella tabella 1.1.

Tabella 1.1: indicazioni al TCSE nella SCD (66)

Età < 16 anni

Disponibilità di donatore MSD

Presenza di una o più delle seguenti complicanze Ictus o evento a carico del SNC durato > 24 ore

Danno polmonare cronico

Danno renale cronico

Retinopatia

Acute Chest Syndrome

Osteonecrosi

Alloimmunizzazione verso gli antigeni eritrocitari

Priapismo ricorrente

Crisi di dolore da vasocclusione ricorrenti

Inefficacia della terapia di supporto con idrossiurea o incapacità o mancanza di volontà di proseguire tale terapia

Danno neuropsicologico con RMN cerebrale e/o angiografia anormali

Velocità al TCD anormale

Le indicazioni per pazienti meno gravi sono ancora oggi oggetto di discussione, considerato che il TCSE rimane comunque una procedura complessa e con un potenziale rischio di mortalità trapianto-correlata (TRM, Transplant Related Mortality). L'aspettativa di vita per i sopravvissuti a 5 anni dal trapianto è pari al 70% rispetto a quella della popolazione generale (69).

Le principali cause di morbidità e mortalità post TCSE nella SCD sono (70):

- Infezioni secondarie alla profonda aplasia e in una seconda fase alla terapia immunosoppressiva post TCSE (batteriche, fungine, virali)
- Tossicità del condizionamento con danno d'organo: i danni conseguenti alla chemioterapia impiegata possono essere precoci o tardivi, con un rischio di danno anche a distanza di tempo (es, infertilità, sviluppo di neoplasie a distanza, disordini metabolici, cardiopatie)
- Rigetto: si verifica quando il graft viene completamente sostituito dalle cellule del ricevente, cui si associa la comparsa di percentuale di HbS patologica. L'analisi del chimerismo permette di studiare il genotipo delle cellule

ematopoietiche, confrontando il DNA delle cellule del ricevente con quello del donatore. Nelle patologie non oncologiche la coesistenza di cellule del ricevente pre-TCSE con cellule del donatore, noto come stato di “chimerismo misto”, è una condizione molto frequente che non si correla necessariamente al rigetto.

- Malattia del trapianto contro l'ospite acuta e cronica (*Graft versus host disease* o *GvHD*) (71–73): si tratta di un disordine immunologico causato dai linfociti T maturi del donatore presenti nell'inoculo diretti contro gli alloantigeni dell'ospite. Si distinguono la forma acuta e la forma cronica, originariamente distinte sulla base dell'epoca di insorgenza rispetto al TCSE (prima o dopo 100 giorni). Più di recente sono stati rivisti i criteri di classificazione e la distinzione viene fatta anche in base alle caratteristiche cliniche più o meno tipiche della forma acuta o cronica. Mentre la forma acuta può interessare principalmente cute, intestino e fegato, la forma cronica può coinvolgere tutti gli organi (74,75). La terapia si basa sull'uso singolo o combinato di immunosoppressori, la cui intensità di trattamento dipende dalla gravità delle manifestazioni cliniche (76). Di seguito classificazioni e stadiazioni della GvHD [Tabelle 1.2, 1.3, 1.4 e 1.5].

Tabella 1.2: distinzione tra GvHD acuta e cronica (77)

Classificazione	Giorni dopo TCSE	Caratteristiche di aGvHD	Caratteristiche di cGvHD
aGvHD			
• classica	<100 giorni	Sì	No
• persistente, ricorrente o late onset	>100 giorni	Sì	No
cGvHD			
• classica	No limiti temporali	No	Sì
• sindrome da overlap	No limiti temporali	Sì	Sì

Tabella 1.3: classificazione della GvHD acuta secondo Glucksberg (78)

Stadio	Rash cutaneo (cute)	Bilirubina (fegato)	Quantità di diarrea (tratto GI)
+	<25% della superficie	34-50 µmol/L	500-1000 mL
++	25-50% della superficie	51-102 µmol/L	1001-1500 mL
+++	Eritroderma generalizzato	103-255 µmol/L	>1500 mL
++++	Eritroderma generalizzato con bolle e desquamazione	>255 µmol/L	Dolore addominale severo con e senza ileo

Tabella 1.4: stadiazione complessiva della GvHD acuta secondo Glucksberg (78)

Grado	
I	Cute +/++
II	Cute +/+++, GI e/o fegato +; lieve calo nelle performance cliniche
III	Cute ++/++++, GI e/o fegato ++/++++; marcato calo nelle performance cliniche
IV	Cute ++/+++++, GI e/o fegato ++/+++++; estremo calo nelle performance cliniche

Tabella 1.5: Classificazione e stadiazione della GvHD cronica: ogni organo viene graduato da 0 a 3 e la severità complessiva classificata sulla base del grading organo-specifico (numero di organi e severità del coinvolgimento) (75)

Severità complessiva	Lieve	Moderata	Grave
Numero di organi coinvolti	1-2	≥3	≥3
Severità del coinvolgimento	Lieve (esclusi i polmoni)	Lieve-moderata (solo lieve per i polmoni)	Grave (per i polmoni moderata o grave)

Uno dei fattori maggiormente limitanti verso l'utilizzo dell'allo-TCSE nei drepanocitici è la poca disponibilità di donatori compatibili: meno del 15% dei pazienti hanno un donatore MSD e solo il 19% hanno un MUD (7,79). L'utilizzo di donatori alternativi offre a più pazienti la possibilità di ricevere questo trattamento potenzialmente curativo, ma l'elevata incidenza di rigetto e di GvHD attualmente limitano un utilizzo esteso di questo approccio e la prevenzione di queste gravi complicanze è l'obiettivo di numerosi trials che utilizzano donatori alternativi.

TCSE APLOIDENTICO

Il trapianto di cellule staminali ematopoietico aploidentico (aplo-TCSE) potrebbe essere considerato una valida opzione terapeutica per i pazienti affetti da drepanocitosi con indicazione al TCSE. Il grande interesse verso l'utilizzo di donatori aploidentici in tale setting di pazienti deriva dal fatto che permetterebbe di avere disponibilità di un donatore potenzialmente per tutti i pazienti.

La prevenzione primaria e il trattamento del rigetto e della GvHD rappresentano la principale sfida in questo particolare tipo di trapianto. A tal proposito sono disponibili diverse piattaforme di manipolazione cellulare, tra cui la selezione positiva delle cellule CD34+ e la deplezione linfocitaria in vitro e/o in vivo.

I maggiori rischi derivanti dalla manipolazione cellulare, impiegati per la prevenzione della GvHD, possono essere il rigetto e la lenta ricostituzione immunologica con conseguente rischio infettivo.

Le varie esperienze di TCSE aploidentico con manipolazione cellulare derivano dall'impiego di tale metodica nell'ambito delle patologie oncologiche, in cui, negli anni, tale tipologia di TCSE è stato via via sempre più implementato fino ad ottenere risultati sovrapponibili alle altre metodiche di TCSE (MSD, MUD).

In particolare, la rimozione fisica delle cellule T del donatore dal materiale da infondere fu introdotta per la prima volta dal gruppo di Perugia alla fine degli anni '90 (80). L'idea originale era quella di prevenire la GvHD trapiantando una dose totale di cellule T non superiore a $1 \times 10^4/\text{kg}$ del ricevente.

La manipolazione ex vivo più sperimentata è stata la selezione positiva delle cellule CD34+ realizzata tramite CliniMACS® CD34 System Miltenyi, che forniva un innesto T-depleto e con un'alta dose di cellule CD34+ ottenute da PBSC mobilizzate con G-CSF da un donatore familiare aploidentico (80–82). Questa profonda rimozione di cellule T richiedeva regimi di condizionamento mirati ad una immunosoppressione massimale del ricevente mediante ATG e irradiazione corporea totale (*total-body irradiation, TBI*) associata a farmaci chemioterapici con potente azione di tipo immunosoppressiva, quali fludarabina e thiotepa (TT). Nonostante l'applicazione di intensi regimi immunoablativi, la percentuale di rigetto del trapianto era comunque elevata (10-15%), il che poi comportava la necessità di effettuare un secondo TCSE di salvataggio con una percentuale di attecchimento del 95%. Tuttavia, questo si traduceva in una lenta immunoricostituzione post-trapianto, con una prolungata e profonda linfopenia (82,83): in questa piattaforma, la mortalità correlata al trapianto (*Transplant-Related Mortality, TRM*) è stata osservata in una percentuale consistente di pazienti, avente come causa principale le infezioni da patogeni opportunistici insorte anche ad un anno post-TCSE in assenza di terapia immunosoppressiva o di GvHD (81).

Negli ultimi anni, sono state implementate piattaforme di manipolazione cellulare che prevedono la selezione negativa di cellule TCR $\alpha\beta$ /CD19, al fine di ottenere un prodotto da infondere contenente insieme alle cellule staminali CD34+ anche altre cellule dell'immunità in grado di favorire da una parte l'attecchimento, dall'altra accelerare la ricostituzione immunologica post TCSE, tuttavia senza aumentare il rischio di rigetto e/o GvHD post TCSE (84,85).

SCOPO DELLA TESI

La drepanocitosi è una sindrome che compromette la qualità della vita dei pazienti affetti, visto l'elevato rischio di complicanze acute e croniche. Attualmente, accanto ai trattamenti tradizionali, basati sulla somministrazione cronica di idrossiurea o sull'eritrocitoaferesi, e sul trattamento sintomatico delle crisi di dolore acuto, l'unico approccio risolutivo è l'Allo TCSE. Questo è tuttavia un trattamento da considerare solo nelle forme più gravi e di difficile gestione, in quanto comporta esso stesso delle complicanze a carico del paziente, sia a breve che a lungo termine. Ad oggi, si tratta di un approccio ormai consolidato, con un OS che varia tra l'82% e il 94% a seconda degli studi e un EFS tra l'84% e il 92%.

Una delle principali limitazioni al ricorso all'allo-TCSE per la cura della SCA è la difficoltà nel trovare un donatore compatibile: come abbiamo visto, infatti, meno del 15% dei pazienti ha un donatore MSD, mentre per quanto riguarda i donatori MUD, poiché la maggior parte dei pazienti drepanocitici è di origine afroamericana, la probabilità di trovare un donatore da registro HLA-compatibile è solo del 16-19% (7,79). Per questo motivo negli ultimi anni si sta studiando la possibilità di ricorrere a donatori alternativi, tra cui i donatori familiari con genotipo aploidentico. Lo scopo di questa tesi è quello di dimostrare la non inferiorità in termini di OS e EFS del TCSE aploidentico rispetto al trapianto da MSD e da MUD. Sono stati confrontati pertanto pazienti sottoposti a TCSE da donatore aploidentico previa deplezione *ex vivo* di cellule T TCR $\alpha\beta$ e CD19 con pazienti sottoposti a TCSE da donatore volontario *unrelated* e TCSE da MSD. La possibilità di utilizzare queste fonti alternative permetterebbe di ampliare la proporzione di pazienti drepanocitici candidabili a trapianto.

MATERIALI E METODI

Il presente lavoro è uno studio osservazionale retrospettivo monocentrico su una popolazione di pazienti pediatrici affetti da malattia drepanocitica sottoposti a TCSE allogenico da donatore familiare HLA-compatibile, TCSE allogenico di donatore da Registro, TCSE aploidentico da familiare HLA-parzialmente compatibile presso l'Oncoematologia Pediatrica dell'Azienda Ospedale Università di Padova da Gennaio 2010 a Dicembre 2020. Sono stati raccolti retrospettivamente i dati riguardanti in totale 20 coppie ricevente-donatore.

Tipizzazione HLA

È stata effettuata presso il Laboratorio HLA dell'UOC Immunotrasfusionale dell'Azienda Ospedaliera di Padova. La tipizzazione HLA di ricevente e donatore non correlato è stata effettuata mediante tecniche di biologia molecolare (PCR-SSP) con un livello di risoluzione allelico.

Dati microbiologici

Per quanto riguarda gli aspetti microbiologici, la quasi totalità di riceventi e donatori aveva eseguito una sierologia per CMV ed EBV pre-TCSE.

Presso il Centro Trapianti di cellule staminali ematopoietiche dell'Oncoematologia pediatrica di Padova i pazienti trapiantati sono stati sottoposti a stretto monitoraggio microbiologico per diagnosticare precocemente eventuali riattivazioni di CMV, EBV e Adenovirus e poter iniziare il trattamento in fase pre-sintomatica. I controlli sono stati eseguiti con una frequenza di 2 volte alla settimana nei primi mesi post-TCSE e successivamente diradati in base all'andamento della ricostituzione immunologica e della profilassi o eventuale terapia per GvHD.

Le viremie per CMV, EBV e Adenovirus sono state rilevate mediante real-time PCR quantitativa, utilizzando un cut-off di 1000 copie/mL per la definizione di riattivazione virale.

Follow-up

Il periodo di osservazione è stato concluso il 22 giugno 2022. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti per i quali, al momento dell'inizio dell'analisi dei dati, era disponibile un follow-up inferiore a 9 mesi dal TCSE.

Raccolta dati

I dati sono stati raccolti e analizzati retrospettivamente, consultando le cartelle conservate nell'archivio dell'Oncoematologia Pediatrica. Le variabili associate ai pazienti, alla malattia e al trapianto erano espresse in numero assoluto e in percentuale o come mediana e range, a seconda dei casi.

Sono stati riportati i dati relativi a: età dei pazienti e loro indicazioni di malattia al momento del trapianto (morbidity secondarie alla drepanocitosi), genotipo HbS, tipo di condizionamento, profilassi della GVHD utilizzata, grado di compatibilità HLA donatore-ricevente, sesso di ricevente e donatore, ABO incompatibilità tra ricevente e donatore, stato sierologico virale per CMV ed EBV di ricevente e donatore pre-trapianto, fonte di CSE, riattivazione virali post trapianto. numero totale di cellule nucleate infuse e cellule CD34+. Sono stati fatti i seguenti confronti tra le 3 coorti: tempi di attecchimento di granulociti neutrofilo e piastrine, durata della degenza, ricoveri successivi, sviluppo di GvHD (grado, forma acuta e forma cronica), rigetto, infezioni e periodo di comparsa (batteriche, fungine, riattivazioni virali), decesso (secondario a tossicità trapianto-correlata o alla malattia di base), altre complicanze tardive secondarie al trapianto.

Definizioni

Attecchimento dei neutrofilo: primo giorno in cui la quota circolante dei polimorfonucleati è superiore a 500/mm³ per più di tre giorni consecutivi.

Attecchimento piastrinico: primo giorno in cui il valore piastrinico è superiore a 50000/mm³ per più di tre giorni consecutivi, a distanza di almeno una settimana dall'ultima trasfusione.

GVHD acuta: sono stati considerati i gradi III e IV della scala di Glucksberg

GVHD cronica: si è fatto riferimento ai criteri NIH del 2005

Riattivazioni virali: sono state prese in considerazione solo le riattivazioni di Citomegalovirus (CMV), Epstein-Barr Virus (EBV) ed Adenovirus. E' stata definita riattivazione di CMV il riscontro di un valore di CMV-DNA su sangue superiore a 1000 copie/mL, riattivazione di EBV il riscontro di un valore di EBV-DNA su sangue superiore a 1000 copie/mL, riattivazione di Adenovirus il riscontro di un valore di Adenovirus-DNA su sangue superiore a 1000 copie/mL, in tutti i casi indipendentemente dalla presenza di manifestazioni cliniche.

Aspergillosi: positività dell'antigenemia Aspergillare (su sangue periferico o BAL) in associazione a sintomi di infezione (febbre, sintomatologia respiratoria) e a riscontro (strumentale o istologico) di evidenza di localizzazione infettiva fungina.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati clinici e trapiantologici è stata condotta utilizzando test non-parametrici (test di Fisher) per la comparazione di variabili categoriali o dicotomiche e il test di Wilcoxon per confrontare i parametri quantitativi.

Quali indicatori per i test di sopravvivenza sono stati considerati la probabilità di sopravvivenza globale (*Overall Survival*, OS) e libera da evento (*Event-Free Survival*, PFS). Inoltre, è stata valutata l'incidenza cumulativa della mortalità trapianto correlata (*Transplant-Related Mortality*, TRM). L'OS è stata calcolata a partire dalla data di trapianto fino alla data del decesso (per qualunque causa) oppure dell'ultimo follow-up. La EFS è stata calcolata a partire della data di trapianto fino alla data del primo evento (definito come progressione di malattia o recidiva) o dell'ultimo follow-up. Per la TRM è stato considerato come evento il decesso per cause diverse dalla progressione della malattia di base considerando come eventi competitivi la ricaduta o il rigetto.

Per il confronto tra gruppi, valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

3.1 PAZIENTI

La coorte di questo studio comprende un totale di 20 pazienti, suddivisi in base al tipo di donatore in tre gruppi: da donatore MSD (10 pazienti), da donatore MUD (5 pazienti) e da donatore familiare HLA-parzialmente compatibile (aploidentico) (5 pazienti).

3.1.1 PAZIENTI TRAPIANTATI DA DONATORE FAMILIARE

HLA-COMPATIBILE

All'interno del gruppo che ha ricevuto un TCSE da MSD, 7 pazienti erano di sesso maschile e 3 di sesso femminile, tutti di età inferiore ai 16 anni al momento del trapianto. Tra questi, 9 avevano un genotipo omozigote HbSS, di cui uno con deficit dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi, mentre solo uno aveva un genotipo

eterozigote HbS/ β^0 . Per questo gruppo la durata mediana del follow-up post trapianto è stata di 97,6 mesi (range 17-149,3).

Per quanto riguarda le indicazioni che hanno portato i pazienti al trapianto, 4 pazienti su 10 avevano crisi vasocclusive ricorrenti, 5 su 10 avevano una malattia cerebrovascolare e 4 su 10 avevano Acute Chest Syndrome.

Per quanto concerne il sierostato pre-TCSE dei bambini all'interno questo gruppo, 7 di loro erano positivi al CMV e 8 a EBV.

In epoca pre-trapianto, 4 pazienti avevano ricevuto una terapia a base di idrossiurea, 4 erano in regime trasfusionale e 2 ricevevano entrambi i trattamenti, mentre nessuno era stato sottoposto ad eritrocitoafesi (ECA).

Infine, prima dell'inizio del condizionamento pre-TCSE, 7 pazienti avevano livelli di HbS $\geq 30\%$ (per le caratteristiche, vedi Tabella 3.1).

3.1.2 PAZIENTI TRAPIANTATI DA DONATORE DA REGISTRO HLA-COMPATIBILE

Questo gruppo era composto da 3 bambini di sesso maschile e 2 di sesso femminile, di cui 4 di età al trapianto inferiore ai 16 anni. Di questi, 4 avevano un genotipo omozigote HbSS, di cui uno con deficit dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi, mentre solo uno aveva un genotipo eterozigote HbS/ β^0 . Per questo gruppo la durata mediana del follow-up post trapianto è stata di 67,7 mesi (48,5-82,8).

Per quanto riguarda le indicazioni al trapianto, 4 pazienti su 5 avevano crisi vasocclusive ricorrenti, 2 su 5 avevano una malattia cerebrovascolare e 2 su 5 avevano Acute Chest Syndrome.

Per quanto concerne il sierostato pre-TCSE dei bambini all'interno questo gruppo, 3 di loro erano positivi al CMV, mentre tutti erano positivi a EBV.

In epoca pre-trapianto, 3 pazienti avevano ricevuto una terapia a base di idrossiurea, di cui uno era stato precedentemente sottoposto ad ECA, un paziente era in regime trasfusionale cronico mentre uno aveva ricevuto sia il trattamento con idrossiurea che il regime trasfusionale cronico.

Infine, in 3 pazienti i livelli di HbS prima dell'inizio del condizionamento pre-TCSE erano $\geq 30\%$ (per le caratteristiche, vedi Tabella 3.1).

3.1.3 PAZIENTI TRAPIANTATI DA FAMILIARE APLOIDENTICO

Questo gruppo era composto da 3 bambini di sesso maschile e 2 di sesso femminile, di cui 4 di età al trapianto inferiore ai 16 anni. Tutti questi pazienti avevano un genotipo omozigote HbSS. Per questo gruppo la durata mediana del follow-up post trapianto è stato di 70,5 mesi (range 25,2-117,1).

Per quanto riguarda le indicazioni al trapianto, 2 pazienti su 5 avevano crisi vasocclusive ricorrenti, 4 su 5 avevano una malattia cerebrovascolare e 1 su 5 avevano Acute Chest Syndrome.

Per quanto concerne il sierostato pre-TCSE dei bambini all'interno questo gruppo, tutti erano positivi al CMV e 4 a EBV.

In epoca pre-trapianto, un paziente aveva ricevuto solo una terapia a base di idrossiurea, 2 erano stati sottoposti sia ad ECA che a un regime trasfusionale cronico, un paziente era passato da una terapia con idrossiurea all'ECA e un paziente era passato da un regime trasfusionale cronico ad un trattamento con idrossiurea ed ECA. Infine, al momento dell'inizio del condizionamento pre-TCSE, 4 pazienti avevano livelli di HbS \geq 30% (per le caratteristiche, vedi Tabella 3.1).

Tabella 3.1: caratteristiche dei tre gruppi di pazienti pre-TCSE

	MSD	MUD	Aplo	TOT
N° Pazienti	10	5	5	20
Sesso				
M	7	3	3	13
F	3	2	2	7
Età @ TCSE				
<16 anni	10	4	4	18
>16 anni	0	1	1	2
Genotipo				
HbSS (%)	9 (90)	4 (80)	5 (100)	18 (90)
HbS/β0 (%)	1 (10)	1 (20)	0 (0)	2 (10)
Mediana (range) durata follow-up mm	97,6 (17-149,3)	67,7 (48,5-82,8)	70,5 (25,2-117,1)	81 (17-149,3)
Complicanze pre-TCSE				
VOC	4 (40)	4 (80)	2 (20)	10 (50)
Vasculopatia cerebrale	5 (50)	2 (40)	4 (80)	11 (55)
ACS	4 (40)	2 (40)	1 (20)	7 (35)
Sierostato pre-TCSE				
<i>CMV</i>				
pos (%)	7 (70)	3 (60)	5 (100)	15 (75)
neg (%)	3 (30)	2 (40)	0 (0)	5 (25)
<i>EBV</i>				
pos (%)	8 (80)	5 (100)	4 (80)	17 (85)

neg (%)	2 (20)	0 (0)	1 (20)	3 (15)
Trattamento pre-TCSE				
ECA (%)	0 (0)	1 (20)	3 (60)	4 (20)
Idrossiurea (%)	6 (60)	3 (60)	3 (60)	12 (60)
Regime trasfusionale cronico (%)	6 (60)	3 (60)	3 (60)	12 (60)
HbS % pre-TCSE				
<30% (%)	3 (30)	2 (40)	1 (20)	6 (30)
≥30% (%)	7 (70)	3 (60)	4 (80)	14 (70)

3.2 DONATORI

I 20 donatori di CSE sono suddivisi in 3 gruppi, a seconda del rapporto con il ricevente: MSD, MUD o aploidentici (vedi Tabella 3.2).

3.2.1 DONATORI *MATCHED SIBLING* (MSD)

A questo gruppo appartengono 10 donatori. Di questi, nessuno ha ricevuto stimolazione con fattore di crescita (G-CSF); tutti hanno donato cellule staminali midollari raccolte mediante espianto di midollo osseo; sette donatori presentavano un trait falcemico.

L'età mediana di questa categoria è di 6,5 anni (range 1,9-16).

Per quanto riguarda il sierostato di questi donatori, 8 di loro risultavano positivi a CMV e 8 ad EBV.

Infine, 9 erano compatibili per il gruppo AB0 e per il fattore Rh, mentre uno aveva un'incompatibilità maggiore rispetto al ricevente.

3.2.2 DONATORI *UNRELATED DA REGISTRO* (MUD)

A questo gruppo appartengono 5 donatori, di cui solo uno era stato sottoposto a stimolazione con G-CSF prima della raccolta di CSE da sangue periferico (PBSC), mentre per gli altri donatori le CSE sono state prelevate dal midollo osseo; nessuno presentava trait falcemico.

L'età mediana al momento della donazione era di 30 anni (range 27-39).

Per quanto riguarda il sierostato di questi donatori, 3 di loro risultavano positivi a CMV e 4 ad EBV.

Infine, 4 erano compatibili per il gruppo AB0 e per il fattore Rh, mentre uno aveva un'incompatibilità maggiore rispetto al ricevente.

3.2.3 DONATORI FAMILIARI APLOIDENTICI

Cinque erano i donatori familiari aploidentici. Di questi, tutti erano stati sottoposti a stimolazione con G-CSF pre-raccolta di CSE da sangue periferico (PBSC) e tutti presentavano trait falcemico.

L'età mediana al momento della donazione era di 42 anni (range 33-53).

Per quanto riguarda il sierostato di questi donatori, tutti risultavano positivi sia a CMV che ad EBV.

Infine, tutti erano compatibili per il gruppo AB0 e per il fattore Rh.

Tabella 3.2: caratteristiche dei donatori al momento della donazione di CSE

	MSD	MUD	Aplo	TOT
Tipologia di donatore	10	5	5	20
Mobilizzazione con G-CSF				
sì (%)	0 (0)	1 (20)	5 (100)	6 (30)
no (%)	10 (100)	4 (80)	0 (0)	14 (70)
HbS trait				
sì (%)	7 (70)	0 (0)	5 (100)	12 (60)
no (%)	3 (30)	5 (100)	0 (0)	8 (40)
Età mediana donatore aa (range)	6,5 (1,9-16)	30 (27-39)	42 (33-53)	21,5 (1,9-53)
Sierostato				
<i>CMV</i>				
pos (%)	8 (80)	3 (60)	5 (100)	16 (80)
neg (%)	2 (20)	2 (40)	0 (0)	4 (20)
<i>EBV</i>				
pos (%)	8 (80)	4 (80)	5 (100)	17 (85)
neg (%)	2 (20)	1 (20)	0 (0)	3 (15)
AB0 match				
compatibile (%)	9 (90)	4 (80)	5 (100)	18 (90)
Incompatibilità maggiore (%)	1 (10)	1 (20)	0 (0)	2 (10)

3.3 CARATTERISTICHE DEL TRAPIANTO

Tutti i pazienti dello studio hanno ricevuto un regime di condizionamento mieloablativo con thiotepa-treosulfan-fludarabina e hanno ricevuto siero antilinfocitario di coniglio (ATG) come parte dell'immunoprofilassi prima dell'infusione delle CSE (per le caratteristiche del trapianto, vedi Tabella 3.3).

3.3.1 PAZIENTI SOTTOPOSTI A TCSE ALLOGENICO DA FAMILIARE

HLA-COMPATIBILE

All'interno di questo gruppo, tutti i pazienti hanno ricevuto una terapia immuno-soppressiva *in vivo* per prevenire il rigetto e la GvHD. Questo trattamento

consisteva nella somministrazione di 4 dosi da 10 mg/m² di MTX (solo due pazienti hanno ricevuto 3 dosi) nei giorni successivi all'infusione associata alla somministrazione di inibitori della calcineurina (ciclosporina in 10 pazienti, in 1 paziente la ciclosporina è stata sostituita con tacrolimus per nefrotossicità) la cui durata mediana è stata di 17,3 mesi (range 4,7-40,3).

Tutti i pazienti hanno ricevuto CSE da midollo osseo. Due pazienti hanno ricevuto anche una piccola quantità prelevata da sangue cordonale; la quantità mediana di cellule nucleate (*Total Nucleated Cells, TNC*) infuse è stata di 4,15 x 10⁸/kg (range 2,36-7,88) e quella di cellule CD34+ è stata di 6,4 x 10⁶/kg (range 3,8-11).

3.3.2 PAZIENTI TRAPIANTATI DA DONATORE DA REGISTRO

HLA-COMPATIBILE

All'interno di questo gruppo, tutti i pazienti hanno ricevuto una terapia immunosoppressiva *in vivo* per prevenire il rigetto e la GvHD, ma per un paziente la profilassi è stata eseguita *in vitro* mediante deplezione di cellule TCRαβ/CD19 visto il grado di mismatch presente rispetto agli antigeni HLA del donatore (il match era di 9 antigeni sui 12 studiati). La profilassi immunosoppressiva è stata effettuata con 4 dosi da 10 mg/m² di MTX nei giorni successivi all'infusione associata a inibitori della calcineurina (ciclosporina in 4 pazienti, sostituita dal tacrolimus in 3 pazienti per nefrotossicità), la cui durata mediana è stata di 25,2 mesi (range 19,3-25,9). Il paziente che ha ricevuto cellule staminali cellule T-deplete ha ricevuto una dose di Rituximab (200 mg/m²) al giorno -1.

Per 4 bambini di questo gruppo la fonte delle CSE è stato il midollo osseo, mentre 1 paziente ha ricevuto cellule staminali da sangue periferico; la quantità mediana di cellule nucleate (*Total Nucleated Cells, TNC*) infuse è stata di 4,2 x 10⁸/kg (range 3,3-7,1) e quella di cellule CD34+ è stata di 4,7 x 10⁶/kg (range 2,8-8,3).

3.3.3 PAZIENTI TRAPIANTATI DA FAMILIARE APLOIDENTICO

All'interno di questo gruppo, tutti i pazienti hanno ricevuto una terapia immunosoppressiva *in vitro* per prevenire il rigetto e la GvHD mediante deplezione di cellule TCRαβ/CD19. Inoltre, 4 pazienti hanno ricevuto una dose di Rituximab (200mg/m²) al giorno -1 rispetto all'infusione del graft per ridurre il rischio di Gvhd cronica e di sviluppo di malattia linfoproliferativa EBV-correlata post TCSE.

Solo un paziente ha ricevuto profilassi con ciclosporina dal giorno -7 al mese 23,7, per livelli di TCR $\alpha\beta$ infuse >25.000/Kg del ricevente.

Per tutti i bambini di questo gruppo la fonte delle CSE è stata il sangue periferico previa stimolazione del donatore con GCS-F; la quantità mediana di cellule nucleate (*Total Nucleated Cells, TNC*) infuse è stata di $6,5 \times 10^8$ /kg (range 5,2-15,8) e quella di cellule CD34+ è stata di $15,8 \times 10^6$ /kg (range 11-23,9).

Tabella 3.3: caratteristiche del Trapianto

	MSD	MUD	Aplo	TOT
Tipo di condizionamento				
MAC (TT-Treo-Flu) (%)	10 (100)	5 (100)	5 (100)	20 (100)
altro (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ATG				
sì (%)	10 (100)	5 (100)	5 (100)	20 (100)
no (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Profilassi GvHD				
<i>In vivo</i>				
CsA + MTX (%)	10 (100)	4 (80)	0 (0)	13 (65)
CsA (%)	0 (0)	0 (0)	1 (20)	1 (5)
MTX (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)
Rituximab (%)	0 (0)	1 (20)	4 (80)	5 (25)
<i>In vitro</i>				
TCR $\alpha\beta$ /CD19 depleto (%)	0 (0)	1 (20)	5 (100)	6 (30)
Mediana durata IS mm	17,3	25,2		19,5
(range)	(4,7-40,3)	(19,3-25,9)	NA	(4,7-40,3)
Fonte CSE				
PBSC (%)	0 (0)	1 (20)	5 (100)	6 (30)
BM (%)	10 (100)	4 (80)	0 (0)	14 (70)
Mediana TNC infuse x10⁸/kg	4,15	4,2	6,5	5,05
(range)	(2,36-7,88)	(3,3-7,1)	(5,2-15,8)	(2,36-15,8)
Mediana CD34+ infuse x10⁶/kg	6,4	4,7	15,8	6,8
(range)	(3,8-11)	(2,8-8,3)	(11-23,9)	(2,8-23,9)

RISULTATI

4.1 TEMPI DI ATTECCHIMENTO, DURATA DELLA DEGENZA, RICOVERI POST-TCSE

Come si può evincere dalla tabella 4.1, la durata mediana dei ricoveri per il trapianto è stata leggermente maggiore nei pazienti che hanno ricevuto le CSE da MSD rispetto agli altri due gruppi, che hanno invece dati più vicini tra loro e al di sotto della mediana di tutta la popolazione.

Per quanto riguarda i tempi di attecchimento, anche qui si può osservare che sia per i polimorfonucleati che per le piastrine sono stati necessari più giorni per il gruppo trapiantato da MSD, soprattutto rispetto al gruppo sottoposto ad aplo-TCSE.

In seguito al ricovero per il TCSE, solo il 50% dei pazienti trapiantati da MSD (5 su 10) ha avuto necessità di ulteriori ricoveri, con una media di 0,6 ricoveri per paziente, contro l'80% del gruppo MUD (4 su 5), con una media di 1,2 ricoveri per paziente, e il 100% (5 su 5) del gruppo Aplo, con una media di 1,4 ricoveri per paziente.

Tabella 4.1

	MSD	MUD	Aplo	p-value
Mediana durata degenza gg (range)	42 (25-56)	32 (26-42)	34 (29-39)	0,1
Mediana tempo di attecchimento gg (range)				
PMN	25,5 (20-34)	19 (15-32)	14 (12-18)	0,005
PLT	23,5 (19-32)	19 (13-25)	13 (10-18)	0,005
Ricoveri post-TCSE				
sì (%)	5 (50)	4 (80)	5 (100)	0,21
no (%)	5 (50)	1 (20)	0 (0)	
Numero medio di ricoveri post-TCSE	0,6	1,2	1,4	

4.2 RIATTIVAZIONI VIRALI E ALTRE INFEZIONI

Nella tabella 4.2 sono riportati i dati riguardanti il numero di riattivazioni virali e altre infezioni insorte nel periodo post-TCSE.

Nel gruppo dei pazienti trapiantati da MSD solo due bambini (20%) hanno avuto una riattivazione virale, con un caso di EBV e uno di ADV, entrambi a meno di tre mesi dalla data di infusione delle CSE; nessuno ha avuto una riattivazione di CMV.

Inoltre, solo un paziente ha avuto un'infezione di origine batterica, mentre non ci sono stati casi di infezioni fungine.

Nel gruppo dei pazienti trapiantati da MUD tre bambini (60%) hanno avuto una riattivazione virale, con 3 casi di EBV e uno di CMV, tutti a meno di tre mesi dalla data di infusione delle CSE tranne uno dei casi di EBV che è avvenuto a distanza di più di 6 mesi; nessuno ha avuto una riattivazione di ADV. Inoltre, solo un paziente ha avuto un'infezione di origine batterica, mentre non ci sono stati casi di infezioni fungine.

Nel gruppo dei pazienti trapiantati da familiare aploidentico 4 pazienti (80%) hanno avuto una riattivazione virale, con un caso di EBV e tre di CMV, tutti a meno di tre mesi dalla data di infusione delle CSE; nessuno ha avuto una riattivazione di ADV. Inoltre, ci sono stati un caso di infezione di origine batterica e uno di origine fungina.

Tabella 4.2

	MSD	MUD	Aplo	p-value
Riattivazioni virali				
sì (%)	2 (20)	3 (60)	4 (80)	0,2
no (%)	8 (80)	2 (40)	1 (20)	
<i>Riattivazione CMV</i>				
sì (%)	0 (0)	1 (20)	3 (60)	0,03
no (%)	10 (100)	4 (80)	2 (40)	
n° riattivazioni <3 mm	0	1	3	
n° riattivazioni >3 mm, <6 mm	0	0	0	
n° riattivazioni >6 mm	0	0	0	
<i>Riattivazione EBV</i>				
sì (%)	1 (10)	3 (60)	1 (20)	0,16
no (%)	9 (90)	2 (40)	4 (80)	
n° riattivazioni <3 mm	1	2	1	
n° riattivazioni >3 mm, <6 mm	0	0	0	
n° riattivazioni >6 mm	0	1	0	
<i>Riattivazione ADV</i>				
sì (%)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1
no (%)	9 (90)	5 (100)	5 (100)	
n° riattivazioni <3 mm	1	0	0	
n° riattivazioni >3 mm, <6 mm	0	0	0	
n° riattivazioni >6 mm	0	0	0	
Infezioni batteriche				
sì (%)	1 (10)	1 (20)	1 (20)	1
no (%)	9 (90)	4 (80)	4 (80)	
Infezioni fungine				
sì (%)	0 (0)	0 (0)	1 (20)	0,5
no (%)	10 (100)	5 (100)	4 (80)	

4.3 GVHD, RIGETTO, CHIMERISMO *FULL DONOR*

Per quanto riguarda i casi di GvHD, sono stati considerati solo quelli di grado II-IV secondo la classificazione di Glucksberg.

Per quanto riguarda la GvHD acuta, ci sono stati 4 casi, tutti all'interno del gruppo MUD.

Non sono stati osservati casi di GvHD cronica in nessuno dei pazienti dei tre gruppi. L'unico caso di rigetto ha riguardato una paziente che ha ricevuto CSE da MSD ed è avvenuto a circa 5,5 mesi di distanza dall'infusione.

Infine, la tabella 4.3 riporta il numero di pazienti con un chimerismo *full donor* all'ultimo follow-up: esso è stato riscontrato in 3 bambini del gruppo MSD (30%), 4 del gruppo MUD (80%) e 3 del gruppo Aplo (60%).

Tabella 4.3

	MSD	MUD	Aplo	p-value
GVHD				
<i>acuta II-IV</i>				
sì (%)	0 (0)	4 (80)	0 (0)	0,002
no (%)	10 (100)	1 (20)	5 (100)	
<i>cronica II-IV</i>				
sì (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
no (%)	10 (100)	5 (100)	5 (100)	
Rigetto				
sì (%)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	1
no (%)	9 (90)	5 (100)	5 (100)	
Chimerismo full donor				
sì (%)	3 (30)	4 (80)	3 (60)	0,2
no (%)	7 (70)	1 (20)	2 (40)	

4.4 ALTRE COMPLICANZE

Nella tabella 4.4 sono riportati i pazienti che hanno avuto altre complicanze precoci (entro i 3 mesi dal TCSE) e/o tardive (dopo i 3 mesi dal TCSE), comprese le infezioni batteriche e fungine. Tra le complicanze precoci, frequenti sono state quelle iatrogene legate alla terapia immunosoppressiva a base di CsA (in particolare, ipertrofia gengivale e ipertensione arteriosa da danno renale iatrogeno); altre complicanze precoci sono state le infezioni batteriche. Le complicanze tardive registrate erano di nature diverse, tra cui ipogammaglobulinemia post-Rituximab per il trattamento di infezioni da EBV, rallentamento della crescita, deficit ventilatori di tipo restrittivo e calcolosi biliare

All'interno del gruppo MSD, 2 pazienti hanno avuto complicanze precoci e 4 tardive.

Nel gruppo dei pazienti che hanno ricevuto un TCSE MUD è stata osservata la più alta percentuale di complicanze, sia tardive che precoci, avendo entrambe interessato 4 bambini su 5.

Nel gruppo dei pazienti che hanno ricevuto un TCSE aploidentico, infine, solo 1 paziente su 5 (20%) ha sviluppato complicanze a distanza da trapianto.

Tabella 4.4

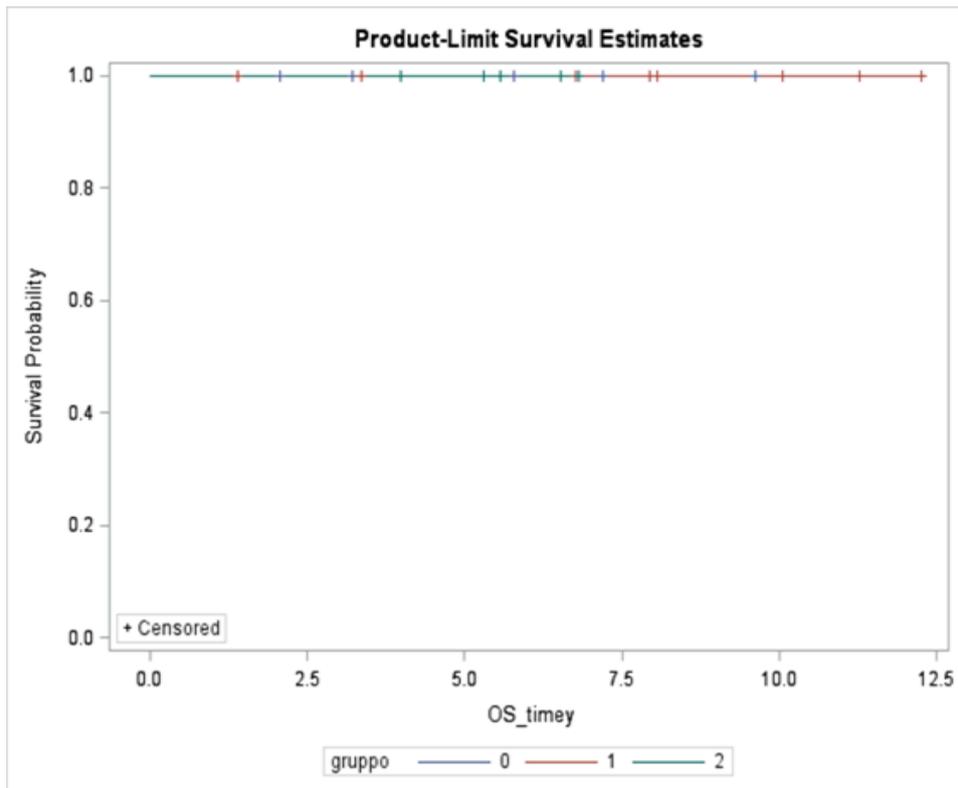
	MSD	MUD	Aplo	p-value
Altre complicanze precoci (<3 mesi)				
sì (%)	2 (20)	4 (80)	1 (20)	0,1
no (%)	8 (80)	1 (20)	4 (80)	
Altre complicanze tardive (>3 mesi)				
sì (%)	4 (40)	4 (80)	1 (20)	0,27
no (%)	6 (60)	1 (20)	4 (80)	

4.5 OVERALL SURVIVAL (OS), EVENT-FREE SURVIVAL (EFS) E TRANSPLANT-RELATED MORTALITY (TRM)

Nel nostro studio nessun paziente è deceduto nel corso del follow-up post-trapianto.

Pertanto, abbiamo riportato una OS = 100% e una TRM = 0%.

Grafico 1: curve di sopravvivenza. Legenda: 0 = Aplo; 1 = MSD; 2 = MUD

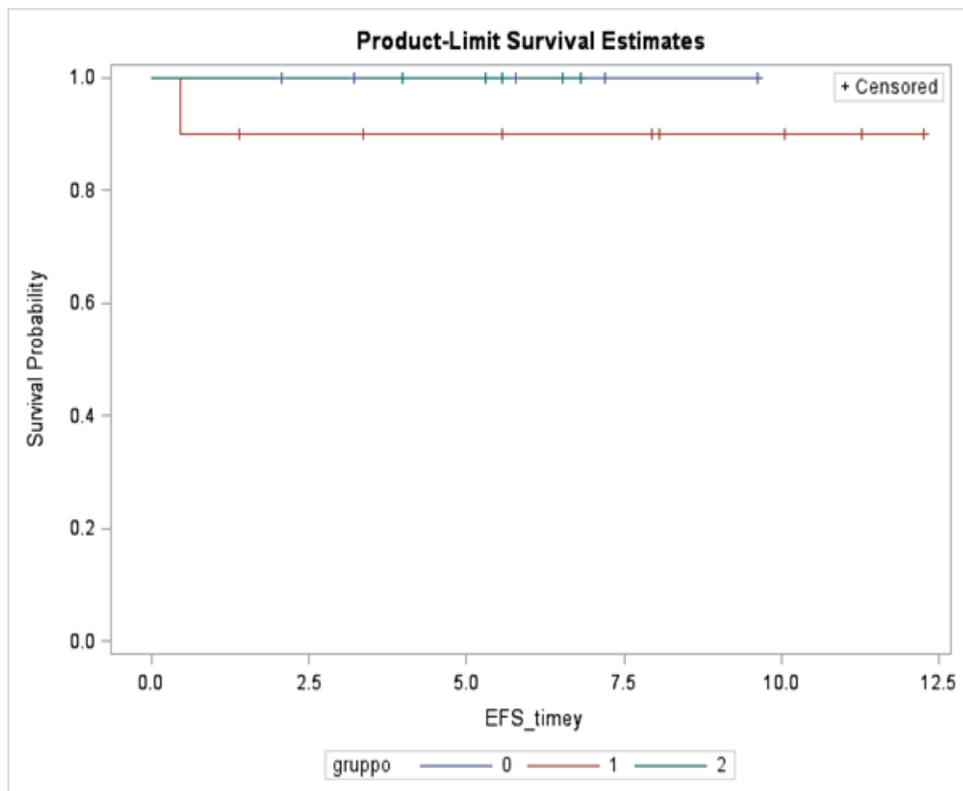


La EFS è stata calcolata a partire dalla data di trapianto fino alla data del primo evento (definito come progressione di malattia o recidiva) o dell'ultimo follow-up: solo un paziente, appartenente al gruppo MSD, ha avuto una recidiva di malattia in seguito al rigetto del trapianto. Pertanto, considerando l'intera popolazione dello studio, abbiamo registrato una EFS = 95%; nel gruppo MSD l'EFS è del 90%, mentre nei gruppi Aplo e MUD del 100%.

Tabella 4.5

Gruppo	N	eventi	5-y EFS% (SE%)	p-value
Aplo	5	0	100	0.61
MSD	10	1	90 (10)	
MUD	5	0	100	

Grafico 2: Event-Free Survival in funzione del tempo. Legenda: 0 = Aplo; 1 = MSD; 2 = MUD



DISCUSSIONE

Attualmente, l'unico trattamento risolutivo per l'anemia falciforme è l'allo-TCSE. Ciò che limita oggi l'utilizzo dell'allo-TCSE nei pazienti SCA è la poca disponibilità di donatori compatibili: la probabilità di avere un donatore MSD è inferiore al 15% (7). Inoltre, per i pazienti di origine afroamericana, che costituiscono la gran parte dei drepanocitici, la probabilità di trovare un donatore HLA-compatibile da registro è bassa, rappresentando circa il 16-19% (79). Un donatore aploidentico è invece spesso disponibile, rappresentando dunque una valida fonte alternativa di CSE. Per permettere ad un numero maggiore di pazienti di ricevere un TCSE, sono state quindi sperimentate diverse fonti alternative di CSE, inclusi i donatori familiari aploidentici oggetto di questa tesi.

Quando un donatore MUD non è disponibile, deve essere considerato un donatore familiare aploidentico.

Con il continuo avanzamento della ricerca scientifica nell'ambito del trapianto aploidentico, negli anni sono state sviluppate diverse piattaforme di manipolazione cellulare. Quelle più largamente impiegate nei diversi Centri di Trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche riguardano la deplezione di cellule T CD3/CD19 o TCR $\alpha\beta$ /CD19 da CSE da sangue periferico raccolte previa stimolazione con G-CSF del donatore, oppure l'utilizzo di ciclofosfamide post-TCSE (PT-CY) somministrata al ricevente a distanza dall'infusione di CSE midollari (90,91). Quest'ultima piattaforma, ideata per la prima volta dal gruppo di Baltimora e ampiamente impiegata in ambito delle patologie oncologiche, si basa sull'impiego della CY ai giorni +3 e +4 post-TCSE aploidentico non manipolato. Esso è basato sull'idea che la CY ad alte dosi (50mg/kg) uccide le cellule T alloreattive che proliferano ai giorni +3 e +4, mentre le altre CSE non vengono toccate in quanto non ancora in fase di proliferazione e con un'alta concentrazione di aldeide deidrogenasi (92). Le due strategie in ambito oncologico sono, al momento, comparabili in termini di *Overall Survival*, *Disease-Free Survival* e *Transplant-Related Mortality* (88,93). Per quanto riguarda il loro impiego per patologie non oncologiche, dai dati riportati in letteratura la deplezione linfocitaria ex vivo si è dimostrata sicura ed efficace in pazienti affetti da patologie genetiche (OS=91%, EFS=74%) (90), inclusa la SCD (94).

Un'estensiva deplezione delle cellule T può ridurre significativamente il rischio di GvHD ma è associata ad un ritardato recupero del funzionamento del sistema

immunitario e ad un aumentato rischio di rigetto, soprattutto nelle patologie non maligne (95). Per questo l'approccio basato sull'infusione di megadosi di CD34+ ($>10 \times 10^6/\text{kg}$) è stato molto discusso e ormai abbandonato, in quanto si è scoperto che le cellule T del donatore svolgono un ruolo importante anche nel promuovere l'attecchimento dopo il trapianto (96). Nello studio del 2018 di Gaziev et al. è stata registrata un'incidenza di rigetto del trapianto del 53,8% (7/13) nel gruppo di pazienti che hanno ricevuto megadosi di CD34+, nonostante il regime di condizionamento mieloablattivo e la terapia immunosoppressiva post-trapianto (97).

Nel nostro studio, in una popolazione di 20 pazienti pediatriche con SCD in stadio avanzato, 5 pazienti sono stati trapiantati con cellule staminali TCR $\alpha\beta$ /CD19-deplete da donatore familiare aploidentico previo *priming* con G-CSF, 5 pazienti hanno ricevuto un TCSE da donatore da registro e 10 pazienti sono stati sottoposti a TCSE da donatore MSD: tutti i pazienti hanno ricevuto lo stesso regime di condizionamento di tipo mieloablattivo, basato sull'impiego di thiotepa-treosulfan-fludarabina e siero antilinfocitario di coniglio (ATG). Durante il periodo post-TCSE, tutti i riceventi da MUD e MSD hanno ricevuto una profilassi immunosoppressiva con Ciclosporina A, mentre, tra i riceventi da donatore aploidentico, solo un paziente ha ricevuto immunoprofilassi per valori di cellule TcR alfa/beta infuse $>25.000/\text{Kg}$ di peso corporeo del ricevente, gli altri 4 non hanno necessitato di alcuna immunosoppressione. La sopravvivenza globale dei tre gruppi è stata del 100%, nessun paziente in tutti e tre i gruppi ha avuto complicanze fatali derivanti dal TCSE. L'EFS globale è stata del 95%, con un caso di rigetto in un paziente sottoposto a TCSE MSD.

Anche i dati sul chimerismo post TCSE sono abbastanza confrontabili nei tre gruppi di pazienti: la maggior parte dei pazienti ha sviluppato un chimerismo misto senza avere tuttavia segni di ripresa della malattia (ad eccezione dell'unico paziente che ha presentato rigetto, nel gruppo dei TCSE MSD). Ancora una volta, si conferma come lo stato di chimerismo misto è sufficiente per indirizzare il midollo osseo a produrre preferenzialmente emoglobina del donatore in modo da eliminare le manifestazioni cliniche della SCD: Abraham et al. hanno riportato che con un chimerismo misto stabile al di sopra del 25% l'HbS può essere mantenuta sotto il 50% e le manifestazioni cliniche possono essere prevenute (98).

I pazienti del gruppo Aplo hanno registrato tempi di attecchimento, sia dei PMN che delle piastrine, più rapidi, soprattutto rispetto al gruppo MSD. Questo è

verosimilmente legato al fatto che tutti i pazienti sottoposti a TCSE aploidentico hanno ricevuto CSE da sangue periferico, contrariamente ai pazienti sottoposti a TCSE MSD che hanno ricevuto cellule da sangue midollare, i cui tempi di attecchimento sono notoriamente più lunghi. Il recupero ematologico più rapido ha comportato anche una durata del ricovero inferiore per i pazienti sottoposti a TCSE aploidentico rispetto al gruppo di pazienti post TCSE MSD.

Tuttavia, dopo il TCSE, tutti i pazienti sottoposti a trapianto aploidentico hanno avuto bisogno di nuovi ricoveri, con in media 1,4 ricoveri per paziente, contro i 5 pazienti su 10 del gruppo MSD, con in media 0,6 ricoveri per paziente, e i 4 su 5 del gruppo MUD. Questa differenza si può giustificare almeno in parte con le più alte incidenze di riattivazioni virali proprio nei gruppi Aplo per quanto riguarda CMV (60% nel gruppo Aplo contro il 20% del MUD e lo 0% del MSD), e MUD per quanto riguarda EBV (60% nel gruppo MUD contro il 20% dell'Aplo e il 10% del MSD). Il numero di riattivazioni virali osservato nei pazienti sottoposti a TCSE aploidentico è stato sovrapponibile a quello dei pazienti sottoposti a TCSE MUD, ma superiore a quelli sottoposti a TCSE MSD. In ogni caso, nessuna delle riattivazioni virali osservata è stata clinicamente significativa e tutte si sono verificate entro i primi 3 mesi dal TCSE, dato che coincide con il recupero immunologico post TCSE.

Un dato interessante riguarda l'incidenza di GvHD acuta e cronica. Nessun paziente dello studio ha manifestato una cGvHD, il che si può giustificare con una buona profilassi immunosoppressiva, ma anche con il fatto che uno dei principali fattori di rischio per l'insorgenza di questa complicanza è l'età (68). In uno studio del 2020 di Foell et al., l'incidenza della cGvHD è stata distinta in base all'età al momento del trapianto minore o maggiore di 18 anni, risultando rispettivamente del 4% (1/23) e del 33% (5/15): l'intera popolazione del nostro studio aveva meno di 18 anni al TCSE, fattore che si è dimostrato protettivo verso questa complicanza. A tal proposito, è noto come migliore sia avviare l'opzione trapiantologica precocemente in modo da prevenire un danno d'organo secondario a SCD e le complicanze tipiche dell'età infantile e da ottenere risultati migliori dopo il TCSE grazie ad un minore danno d'organo preesistente e ad una minore alloimmunizzazione. È stato dimostrato che i pazienti trapiantati in giovane età hanno migliori OS e EFS a tre anni, con un minor rischio di aGvHD e cGvHD (68).

Per quanto riguarda la GvHD acuta, è molto interessante il fatto che tutti i casi di grado II-IV che si sono manifestati hanno interessato bambini trapiantati da MUD (4/5). Allo stesso modo, il gruppo MUD è quello che ha registrato una maggiore incidenza di altre complicanze sia precoci che tardive (escludendo dunque le riattivazioni virali e la GvHD).

Data la limitata disponibilità di donatori *matched*, esiste un bisogno urgente di trovare approcci alternativi per i pazienti con SCD. Tuttavia, Foell et al. non si fermano qui, ma sostengono che si debba anche discutere quale sia la migliore seconda tipologia di donatore dopo il MSD, se MUD o aploidentico (99). Uno studio osservazionale, retrospettivo, multicentrico ha riportato una EFS a 3 anni per MSD e MUD dell'89% e del 69% e una OS del 96% e del 82%, con un'incidenza di cGvHD del 19% e del 31%, rispettivamente (100). Dunque, oltre alla difficoltà di trovare un donatore *matched* da registro, anche i risultati ottenuti dalle due tipologie di trapianto, da MUD e da aploidentico, depongono a favore di quest'ultima; pertanto, lo standard di selezione del donatore (MSD > MUD > donatore alternativo) dovrà essere ridiscusso (99). Inoltre, Gluckman et al. ha riportato che un ritardo del TCSE di 10 anni è associato a un calo dell'OS del 12%, per non parlare dell'aumentato rischio di complicanze irreversibili legate alla patologia, che impattano significativamente sulla qualità di vita del paziente (68).

La più grande sfida nell'ambito delle patologie non maligne è quella di offrire un trapianto libero da GvHD e da rigetto, il che è particolarmente difficile in pazienti drepanocitici con vasculopatia sistemica, alto rischio di alloimmunizzazione e di rigetto per via delle multiple trasfusioni pre-TCSE (99). Nella nostra casistica, in cui tutta la popolazione ha ricevuto lo stesso regime di condizionamento con un approccio immunosoppressivo standardizzato, i risultati riguardo a OS, EFS e incidenza di GvHD acuta e cronica sono stati comparabili tra i tre gruppi. Tuttavia, il gruppo di pazienti sottoposti a TCSE MUD, ha mostrato maggiori complicanze anche tardive rispetto agli altri due gruppi di pazienti. Infine, non è stato osservato alcun evento maggiore in nessuno dei donatori aploidentici sottoposti a stimolazione con G-CSF prima della raccolta delle CSE periferiche.

Il nostro studio ha dei limiti, avendo una coorte ristretta in termini numerici ed essendo uno studio retrospettivo e monocentrico. Tuttavia, tutti i pazienti hanno ricevuto un follow-up di almeno un anno e tutti i bambini del gruppo Aplo di almeno due anni, permettendoci di trarre conclusioni affidabili per quanto riguarda le complicanze a breve ma anche a lungo termine; inoltre, i risultati sono paragonabili a quelli riportati in letteratura anche da studi con coorti più ampie. Se questi risultati verranno confermati da uno studio largo, prospettico, multicentrico (EudraCT 2018-002652-33), esso potrà portare ad una ridefinizione delle indicazioni al trapianto di cellule staminali ematopoietiche in SCD, in modo da evitare le complicanze peggiori ed irreversibili della patologia, come i deficit cognitivi, e da ridurre anche le complicanze correlate al trapianto stesso, come la GvHD, che viene più spesso osservata nei pazienti con età più avanzata.

In conclusione, il nostro studio dimostra una non inferiorità del TCSE da familiare aploidentico in pazienti in età pediatrica affetti da drepanocitosi. Tale dato dovrà essere confermato mediante studi prospettici, multicentrici e con una casistica di pazienti maggiore.

BIBLIOGRAFIA

1. Gluckman E. Allogeneic transplantation strategies including haploidentical transplantation in sickle cell disease. *Hematology*. 6 dicembre 2013;2013(1):370–6.
2. Piel Fb, Patil Ap, Howes Re, Nyangiri Oa, Gething Pw, Tn W, et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun* [Internet]. 11 febbraio 2010 [citato 19 aprile 2022];1. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21045822/>
3. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *The Lancet*. 12 gennaio 2013;381(9861):142–51.
4. Bernaudin F, Socie G, Kuentz M, Chevret S, Duval M, Bertrand Y, et al. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood*. 1 ottobre 2007;110(7):2749–56.
5. Walters MC, De Castro LM, Sullivan KM, Krishnamurti L, Kamani N, Bre-deson C, et al. Indications and Results of HLA-Identical Sibling Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. febbraio 2016;22(2):207–11.
6. Spierings E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue Antigens*. 2014;84(4):374–360.
7. Justus D, Perez-Albuerne E, Dioguardi J, Jacobsohn D, Abraham A. Allogeneic donor availability for hematopoietic stem cell transplantation in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(7):1285–7.
8. Williams TN, Thein SL. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2018;19(1):113–47.
9. Herrick JB. Peculiar Elongated and Sickle-Shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. *JAMA*. 10 settembre 2014;312(10):1063.
10. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. *Science*. 25 novembre 1949;110(2865):543–8.
11. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*. 17 agosto 1957;180(4581):326–8.
12. Goldstein J, Konigsberg W, Hill RJ. The structure of human hemoglobin. VI. The sequence of amino acids in the tryptic peptides of the beta chain. *J Biol Chem*. giugno 1963;238:2016–27.

-
13. Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study - PubMed [Internet]. [citato 19 aprile 2022]. Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25261933/>
 14. CDC. Data & Statistics on Sickle Cell Disease | CDC [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2022 [citato 19 aprile 2022]. Disponibile su: <https://www.cdc.gov/ncbddd/sicklecell/data.html>
 15. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med.* 11 settembre 1997;337(11):762–9.
 16. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management [Internet]. 2^a ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009 [citato 20 aprile 2022]. Disponibile su: <https://www.cambridge.org/core/books/disorders-of-hemoglobin/34CA27FF445ABBBB21512FD855F7EC33>
 17. Hebbel RP. Reconstructing sickle cell disease: a data-based analysis of the «hyperhemolysis paradigm» for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. *Am J Hematol.* febbraio 2011;86(2):123–54.
 18. Reiter CD, Gladwin MT. An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. *Curr Opin Hematol.* marzo 2003;10(2):99–107.
 19. Dominical VM, Vital DM, O’Dowd F, Saad STO, Costa FF, Conran N. In vitro microfluidic model for the study of vaso-occlusive processes. *Exp Hematol.* marzo 2015;43(3):223–8.
 20. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood.* 12 giugno 2014;123(24):3818–27.
 21. Inwald DP, Kirkham FJ, Peters MJ, Lane R, Wade A, Evans JP, et al. Platelet and leucocyte activation in childhood sickle cell disease: association with nocturnal hypoxaemia. *Br J Haematol.* novembre 2000;111(2):474–81.
 22. Ballas SK. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. *Blood.* 3 gennaio 2013;121(1):243–4.
 23. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood.* 15 settembre 2001;98(6):1802–11.
 24. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med.* 26 febbraio 2004;350(9):886–95.
 25. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* gennaio 2007;21(1):37–47.

-
26. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sick cell disease. *The Lancet*. dicembre 2010;376(9757):2018–31.
 27. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol*. 2010;149(1):35–49.
 28. Vichinsky E, Hurst D, Earles A, Kleman K, Lubin B. Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. *Pediatrics*. giugno 1988;81(6):749–55.
 29. Yawn BP, Buchanan GR, Afenyi-Annan AN, Ballas SK, Hassell KL, James AH, et al. Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. *JAMA*. 10 settembre 2014;312(10):1033–48.
 30. Berry PA, Cross TJS, Thein SL, Portmann BC, Wendon JA, Karani JB, et al. Hepatic dysfunction in sickle cell disease: a new system of classification based on global assessment. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. dicembre 2007;5(12):1469–76; quiz 1369.
 31. Serjeant GR, Topley JM, Mason K, Serjeant BE, Pattison JR, Jones SE, et al. Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet Lond Engl*. 19 settembre 1981;2(8247):595–7.
 32. Booth C, Inusa B, Obaro SK. Infection in sickle cell disease: a review. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. gennaio 2010;14(1):e2–12.
 33. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*. 1 gennaio 1998;91(1):288–94.
 34. Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, McKie K, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med*. 27 febbraio 1992;326(9):605–10.
 35. Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Chevret S, Hau I, et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood*. 27 gennaio 2011;117(4):1130–40.
 36. DeBaun MR, Sarnaik SA, Rodeghier MJ, Minniti CP, Howard TH, Iyer RV, et al. Associated risk factors for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: low baseline hemoglobin, sex, and relative high systolic blood pressure. *Blood*. 19 aprile 2012;119(16):3684–90.
 37. Gordeuk Vr, Castro Ol, Machado Rf. Pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood [Internet]*. 18 febbraio 2016 [citato 21 aprile 2022];127(7). Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26758918/>
 38. Mushemi-Blake S, Melikian N, Drasar E, Bhan A, Lunt A, Desai SR, et al. Pulmonary Haemodynamics in Sickle Cell Disease Are Driven Predominantly by a

High-Output State Rather Than Elevated Pulmonary Vascular Resistance: A Prospective 3-Dimensional Echocardiography/Doppler Study. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135472.

39. Elford HL. Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. *Biochem Biophys Res Commun*. 10 ottobre 1968;33(1):129–35.
40. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 9 giugno 1994;330(23):1639–44.
41. Ware RE. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1 luglio 2010;115(26):5300–11.
42. DeBaun MR, Gordon M, McKinstry RC, Noetzel MJ, White DA, Sarnaik SA, et al. Controlled trial of transfusions for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 21 agosto 2014;371(8):699–710.
43. Ware RE, Helms RW, SWiTCH Investigators. Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea (SWiTCH). *Blood*. 26 aprile 2012;119(17):3925–32.
44. Yazdanbakhsh K, Ware RE, Noizat-Pirenne F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood*. 19 luglio 2012;120(3):528–37.
45. John AB, Ramlal A, Jackson H, Maude GH, Sharma AW, Serjeant GR. Prevention of pneumococcal infection in children with homozygous sickle cell disease. *Br Med J Clin Res Ed*. 26 maggio 1984;288(6430):1567–70.
46. Gaston MH, Verter JI, Woods G, Pegelow C, Kelleher J, Presbury G, et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. *N Engl J Med*. 19 giugno 1986;314(25):1593–9.
47. Halasa NB, Shankar SM, Talbot TR, Arbogast PG, Mitchel EF, Wang WC, et al. Incidence of invasive pneumococcal disease among individuals with sickle cell disease before and after the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1 giugno 2007;44(11):1428–33.
48. Jacobson SJ, Kopecky EA, Joshi P, Babul N. Randomised trial of oral morphine for painful episodes of sickle-cell disease in children. *Lancet Lond Engl*. 8 novembre 1997;350(9088):1358–61.
49. Vichinsky E, Hoppe CC, Ataga KI, Ware RE, Nduba V, El-Beshlawy A, et al. A Phase 3 Randomized Trial of Voxelotor in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 8 agosto 2019;381(6):509–19.
50. Niihara Y, Miller ST, Kanter J, Lanzkron S, Smith WR, Hsu LL, et al. A Phase 3 Trial of L-Glutamine in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 19 luglio 2018;379(3):226–35.

-
51. Wilmore DW. Food and Drug Administration Approval of Glutamine for Sickle Cell Disease: Success and Precautions in Glutamine Research. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* agosto 2017;41(6):912–7.
 52. Ogu UO, Thomas M, Chan F, Vattappally L, Sebastian G, Crouch A, et al. L-glutamine use in adults with sickle cell disease: Clinical trials where success meets reality. *Am J Hematol.* 2021;96(1):E38–40.
 53. Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, Liles D, Cancado R, Friedrisch J, et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2 febbraio 2017;376(5):429–39.
 54. Bradt P, Spackman E, Synnott PG, Chapman R, Beinfeld M, Rind DM, et al. Crizanlizumab, Voxelotor, and L-Glutamine for Sickle Cell Disease: Effectiveness and Value. *Inst Clin Econ Rev.* 23 gennaio 2020;
 55. Leonard A, Tisdale J, Abraham A. Curative options for sickle cell disease: haploidentical stem cell transplantation or gene therapy? *Br J Haematol.* 2020;189(3):408–23.
 56. Rogers S, Pfuderer P. Use of viruses as carriers of added genetic information. *Nature.* 17 agosto 1968;219(5155):749–51.
 57. Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, Payen E, Tighe R, Bouhassira EE, et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science.* 14 dicembre 2001;294(5550):2368–71.
 58. Tasan I, Jain S, Zhao H. Use of genome-editing tools to treat sickle cell disease. *Hum Genet.* settembre 2016;135(9):1011–28.
 59. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 28 novembre 2014;346(6213):1258096.
 60. Huang X, Wang Y, Yan W, Smith C, Ye Z, Wang J, et al. Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient iPSCs After Genome Editing of the Sickle Point Mutation. *Stem Cells Dayt Ohio.* maggio 2015;33(5):1470–9.
 61. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, curatori. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citato 13 aprile 2022]. Disponibile su: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02278-5>
 62. Santos GW. Bone marrow transplantation in hematologic malignancies. Current status. *Cancer.* 1 febbraio 1990;65(3 Suppl):786–91.
 63. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med.* 7 agosto 1997;337(6):373–81.

-
64. Passweg JR, Baldomero H, Gratwohl A, Bregni M, Cesaro S, Dreger P, et al. The EBMT activity survey: 1990-2010. *Bone Marrow Transplant.* luglio 2012;47(7):906–23.
65. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant.* giugno 2016;51(6):786–92.
66. Angelucci E, Matthes-Martin S, Baronciani D, Bernaudin F, Bonanomi S, Cappellini MD, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. *Haematologica.* maggio 2014;99(5):811–20.
67. Johnson FL, Look AT, Gockerman J, Ruggiero MR, Dalla-Pozza L, Billings FT. Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. *N Engl J Med.* 20 settembre 1984;311(12):780–3.
68. Gluckman E, Cappelli B, Bernaudin F, Labopin M, Volt F, Carreras J, et al. Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 16 marzo 2017;129(11):1548–56.
69. Inamoto Y, Lee SJ. Late effects of blood and marrow transplantation. *Haematologica.* aprile 2017;102(4):614–25.
70. Bazinet A, Popradi G. A general practitioner's guide to hematopoietic stem-cell transplantation. *Curr Oncol.* giugno 2019;26(3):187–91.
71. Grube M, Holler E, Weber D, Holler B, Herr W, Wolff D. Risk Factors and Outcome of Chronic Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation-Results from a Single-Center Observational Study. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* ottobre 2016;22(10):1781–91.
72. 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 J Am Soc Blood Marrow Transplant.* febbraio 2015;21(2):266–74.
73. 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 J Am Soc Blood Marrow Transplant.* febbraio 2017;23(2):211–34.
74. Baird K, Cooke K, Schultz KR. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) in children. *Pediatr Clin North Am.* febbraio 2010;57(1):297–322.
75. 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 J Am Soc Blood Marrow Transplant.* marzo 2015;21(3):389-401.e1.

76. 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.* febbraio 2014;49(2):168–73.

77. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* dicembre 2005;11(12):945–56.

78. 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.* ottobre 1974;18(4):295–304.

79. 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.* 24 luglio 2014;371(4):339–48.

80. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med.* 22 ottobre 1998;339(17):1186–93.

81. Ciceri F, Labopin M, Aversa F, Rowe JM, Bunjes D, Lewalle P, et al. A survey of fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in adults with high-risk acute leukemia: a risk factor analysis of outcomes for patients in remission at transplantation. *Blood.* 1 novembre 2008;112(9):3574–81.

82. Reisner Y, Hagin D, Martelli MF. Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives. *Blood.* 1 dicembre 2011;118(23):6006–17.

83. Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, Topini F, Ruggeri L, Carotti A, et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood [Internet].* 15 dicembre 2005 [citato 27 aprile 2022];106(13). Disponibile su: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16123217/>

84. Bethge WA, Haegle M, Faul C, Lang P, Schumm M, Bornhauser M, et al. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning and CD3/CD19 depletion: fast engraftment and low toxicity. *Exp Hematol.* dicembre 2006;34(12):1746–52.

85. Federmann B, Hägele M, Pfeiffer M, Wirths S, Schumm M, Faul C, et al. Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts. *Leukemia.* gennaio 2011;25(1):121–9.

-
86. Strocchio L, Zecca M, Comoli P, Mina T, Giorgiani G, Giraldi E, et al. Treosulfan-based conditioning regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in children with sickle cell disease. *Br J Haematol.* giugno 2015;169(5):726–36.
87. Rangarajan HG, Abu-Arja R, Pai V, Guilcher GMT, Soni S. Outcomes of Unrelated Donor Stem Cell Transplantation with Post-Transplant Cyclophosphamide for Graft-versus-Host Disease Prophylaxis in Patients with Severe Sickle Cell Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* febbraio 2018;24(2):413–7.
88. Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Pierini A, Falzetti F, Carotti A, et al. «Designed» grafts for HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Blood.* 13 febbraio 2014;123(7):967–73.
89. Kamani NR, Walters MC, Carter S, Aquino V, Brochstein JA, Chaudhury S, et al. Unrelated donor cord blood transplantation for children with severe sickle cell disease: results of one cohort from the phase II study from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN). *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* agosto 2012;18(8):1265–72.
90. Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo ME, Masetti R, et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta^+$ T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood.* 31 luglio 2014;124(5):822–6.
91. Luznik L, Fuchs EJ. High-dose, post-transplantation cyclophosphamide to promote graft-host tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Res.* luglio 2010;47(1–3):65–77.
92. Luznik L, Jalla S, Engstrom LW, Iannone R, Fuchs EJ. Durable engraftment of major histocompatibility complex-incompatible cells after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, low-dose total body irradiation, and posttransplantation cyclophosphamide. *Blood.* 1 dicembre 2001;98(12):3456–64.
93. Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* giugno 2008;14(6):641–50.
94. de la Fuente J, Dhedin N, Koyama T, Bernaudin F, Kuentz M, Karnik L, et al. Haploidentical Bone Marrow Transplantation with Post-Transplantation Cyclophosphamide Plus Thiotepa Improves Donor Engraftment in Patients with Sickle Cell Anemia: Results of an International Learning Collaborative. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* giugno 2019;25(6):1197–209.
95. McDonough CH, Jacobsohn DA, Vogelsang GB, Noga SJ, Chen AR. High incidence of graft failure in children receiving CD34+ augmented elutriated allografts for nonmalignant diseases. *Bone Marrow Transplant.* giugno 2003;31(12):1073–80.

-
96. Jiang Z, Adams GB, Hanash AM, Scadden DT, Levy RB. The contribution of cytotoxic and noncytotoxic function by donor T-cells that support engraftment after allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2002;8(11):588–96.
97. Gaziev J, Isgro A, Sodani P, Paciaroni K, De Angelis G, Marziali M, et al. Haploidentical HSCT for hemoglobinopathies: improved outcomes with TCR $\alpha\beta$ + /CD19+-depleted grafts. *Blood Adv*. 5 febbraio 2018;2(3):263–70.
98. Abraham A, Hsieh M, Eapen M, Fitzhugh C, Carreras J, Keesler D, et al. Relationship between Mixed Donor–Recipient Chimerism and Disease Recurrence after Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. dicembre 2017;23(12):2178–83.
99. Foell J, Kleinschmidt K, Jakob M, Troeger A, Corbacioglu S. Alternative donor: $\alpha\beta$ /CD19 T-cell-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease [Internet]. Elsevier Enhanced Reader. 2020 [citato 29 marzo 2022]. Disponibile su: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1658387620300248?to-ken=879469F8A10C88ADBE35ED60CBE6FB3E5A751C6BDB198035AC079B9B38445C2AC22E15D43ECB51B778873E4662A23545&originRegion=euro-west-1&originCreation=20220329170742>
100. Eapen M, Brazauskas R, Walters MC, Bernaudin F, Bo-Subait K, Fitzhugh CD, et al. Impact of donor type and conditioning regimen intensity on allogeneic transplantation outcomes in patients with Sickle Cell Disease: a retrospective, cohort study. *Lancet Haematol*. novembre 2019;6(11):e585–96.

RINGRAZIAMENTI