

Indice

1. INTRODUZIONE

1.1 Il trapianto allogenico di midollo

1.1.1 Caratteristiche generali	3
1.1.2 I donatori di CSE	4
1.1.3 Immunosoppressione e profilassi della GVHD	5
1.1.4 Recupero del sistema immunitario dopo il trapianto	6
1.1.5 Le complicanze gastro-intestinali	7

1.2 Le complicanze immuno-mediate: la graft-versus-host disease

1.2.1 Il ruolo del regime di condizionamento	9
1.2.2 La aGVHD	10
1.2.3 La cGVHD	14
1.2.4 Ruolo dell'endoscopia nella diagnosi di GVHD e nella diagnostica differenziale	15

1.3 La diagnosi differenziale

1.3.1 Complicanze tossiche	16
1.3.2 Complicanze vascolari	21
1.3.3 Complicanze infettive	23

2. SCOPO DELLA TESI 25

3. PAZIENTI E METODI

3.1 La fase pre-trapianto	26
3.2 La fase post-trapianto	26
3.3 Analisi statistica	28
3.4 Etica	28

4. RISULTATI

4.1 Le caratteristiche della coorte	29
4.2 Complicanze gastrointestinali ed epatiche	29
4.3 La GVHD: analisi delle variabili associate alla diagnosi e alla severità	30
4.4 La GVHD acuta gastrointestinale	30

4.5 Fattori di rischio di mortalità a 12 mesi dal trapianto	31
4.6 Attendibilità diagnostica delle procedure endoscopiche ed istologiche	31
5. DISCUSSIONE	37
6. RINGRAZIAMENTI	42
7. BIBLIOGRAFIA	43

Introduzione

1.1 IL TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

1.1.1 CARATTERISTICHE GENERALI

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (CSE) è una procedura ampiamente utilizzata per emopatie ereditarie oppure acquisite, sia di natura benigna sia di natura maligna. In base ai dati dell'EBMT nel 2017 sono stati effettuati 45,418 trapianti, dei quali 18,281 allogenici e 27,137 autologhi con un aumento rispetto al 2016 dello 3,6% per l'allotrapianto e del 4,4% per il trapianto autologo. Le indicazioni al trapianto di CSE sono rappresentate principalmente da patologie neoplastiche della linea linfoide (64% del totale) e della linea mieloide (25% del totale), quindi si aggiungono i tumori solidi e le patologie non neoplastiche. La distribuzione di tali indicazioni in accordo con i riferimenti suddetti è la seguente:

- neoplasie della linea mieloide, principalmente la leucemia mieloide acuta (39,9%),
- disordini mieloproliferativi (18,1%);
- leucemia linfatica acuta (15,6%);
- emoglobinopatie, in particolare le talassemie e la drepanocitosi, e i disordini ereditari del metabolismo;
- neoplasie della linea linfoide (LH, LNH), nel 53% dei casi¹.

Prima del trapianto, il paziente nonché il ricevente, viene sottoposto ad un regime di condizionamento chemioterapico, eventualmente associato a radioterapia; questi trattamenti precedono l'infusione di cellule ematopoietiche con lo scopo di eliminare le cellule maligne o deficitarie appartenenti al sistema ematopoietico in modo tale da creare un ambiente idoneo per l'attecchimento delle cellule staminali trapiantate. La prerogativa fisiopatologica del trapianto allogenico consiste proprio nella diversità HLA tra le cellule del ricevente e quelle del donatore; questa condizione che da un lato, rende indispensabile l'induzione di uno stato di immunosoppressione nel post-trapianto per prevenire il rigetto, dall'altro garantisce una reattività linfocitaria nei confronti delle cellule maligne residue (malattia cellulare minima) dopo il condizionamento, attraverso un processo definito graft-versus leukemia/tumor. L'alloreattività è responsabile di una delle maggiori complicanze legate al trapianto, ossia il

graft versus host disease (GVHD), considerata la principale causa di mortalità non correlata alla recidiva di malattia di base, che colpisce il 40-50% dei trapiantati². La GVHD coinvolge diversi distretti, in particolare il tratto gastrointestinale compreso il fegato e le vie biliari e complessa è la diagnosi differenziale con altre manifestazioni gastrointestinali che si possono sviluppare in questo contesto clinico.

1.1.2 I DONATORI DI CSE

La diversità degli antigeni del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC, Major Histocompatibility Complex or Human Leukocyte Antigens), rappresenta una delle principali barriere al successo del trapianto. Gli antigeni HLA di classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) e di classe II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) sono espressi sulla superficie delle cellule nucleate e sono codificati da un insieme di geni collocati sul braccio corto del cromosoma 6, sistema con un'ampia variabilità genetica e di polimorfismi. Nell'allo-trapianto di CSE le cellule NK e i linfociti T alloreattivi possono riconoscere antigeni HLA non-self sulla superficie delle cellule neoplastiche residue e sulle cellule sane dei tessuti del ricevente, mediando quindi rispettivamente, sia un effetto terapeutico GVL (Graft-versus-Leukemia) che un effetto dannoso. Ne consegue che maggiore è la somiglianza genetico-fenotipica tra ricevente e donatore e minori saranno le problematiche nel post-trapianto, ed in particolare l'incidenza di GVHD³. Pertanto, i donatori perfetti sono quelli cosiddetti fenoidentici, ossia HLA-siblings: si tratta di un fratello o di una sorella con HLA genotipicamente identici o molto simili in tutti i loci. Tuttavia, questi donatori sono disponibili solo in un terzo dei casi. Infatti, il progressivo restringimento dei nuclei familiari sta riducendo questa probabilità in molte società occidentali. Pertanto, sono stati istituiti dei registri contenenti volontari adulti donatori, per poter disporre di donatori il più possibili HLA-compatibili (*matched unrelated donor o MUD*) e più recentemente sono state create banche di sangue cordonale. La compatibilità si basa sulla valutazione dei loci HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DRB1 per i quali un donatore ottimale dovrebbe appunto uguagliare il ricevente. La probabilità di poter trovare un donatore HLA-compatibile è variabile tra le diverse etnie e oscilla tra il 16% e il 75%; tuttavia l'ampia varietà di polimorfismi HLA e la specificità di popolazione delle varianti alleliche non permette spesso di poter disporre di un donatore ottimale. La restante parte dei pazienti può attingere al sangue cordonale (*matching* meno stringente), ai donatori unrelated non compatibili (*mismatch unrelated donor o MMUD*) e ai donatori aploidentici, ossia donatori familiari che condividono con il ricevente un solo allele dei loci genici HLA (identità pari al 50%)⁴⁻⁵.

Le CSE dei donatori possono essere prelevate dal midollo osseo (BM), dal sangue periferico (PBSC) e dal sangue cordonale (UCB). Per molti anni, la fonte principale di CSE è stato il midollo osseo prelevato attraverso la puntura della cresta iliaca; più recentemente si sono iniziate ad impiegare le cellule staminali isolate e prelevate dal sangue periferico dopo stimolazione con filgastrim (G-CSF, Granulocyte colony-stimulating factor) che ne favorisce la mobilitazione midollare. Un'altra possibilità è rappresentata dal trapianto di sangue cordonale prelevato dal cordone ombelicale subito dopo la nascita, utile soprattutto nei casi in cui sia necessario un trapianto urgente e non siano prontamente disponibili donatori di midollo osseo o di PBSC. Infatti, il principale vantaggio nell'uso del sangue cordonale è quello che non necessita di una compatibilità HLA molto stringente, incrementando in tal modo la disponibilità di donatori. Anche l'incidenza di GVHD si è dimostrata più bassa rispetto alle casistiche dei trapianti da midollo e PBSC, tuttavia l'attecchimento e la ricostituzione del sistema immunitario sono più lenti e uno dei rischi principali è rappresentato dal fallimento del trapianto⁶.

1.1.3 IMMUNOSOPPRESSIONE E PROFILASSI DELLA GVHD

Nella profilassi della GVHD non sono stati definiti metodi ottimali di prevenzione e questo comporta un approccio eterogeneo. Il gruppo di lavoro EBMT-ELN (European Leukemia Network) ha sviluppato delle raccomandazioni per la profilassi della GVHD nei vari setting dell'allogtrapianto, sia con il condizionamento mieloablativo standard sia con un regime di condizionamento a ridotta intensità⁷. I farmaci che si utilizzano a tal scopo hanno un'azione immunosoppressiva, tra questi:

- metotrexate (MTX), antagonista dell'acido folico in grado di legarsi al sito catalitico della di-idrofolato reduttasi bloccando l'attivazione dell'acido folico. La mancanza di questo co-fattore interrompe la sintesi della timidina e dei nucleotidi purinici inibendo infine la sintesi degli acidi nucleici;
- inibitori della calcineurina, ciclosporina A (CsA) e tacrolimus (FK-506), inibiscono la produzione di citochine pro-infiammatorie tra cui IL-2, così bloccano la proliferazione linfocitaria;
- anti-timoglobuline, immunoglobuline anti-timociti ottenute iniettando nel coniglio timociti umani; queste esercitano un'azione immunosoppressiva attraverso un'ampia gamma di bersagli inducendo una deplezione di linfociti CD3+, CD8+, CD4+ e cellule NK⁸;
- micofenolato mofetile (MMF), inibitore della inosina monofosfato deidrogenasi con conseguente blocco della pathway della sintesi de novo delle purine.

Nelle varie schedule di trattamento standardizzate, questi farmaci vengono variabilmente associati tra loro e somministrati sia nei giorni precedenti il trapianto, che nei giorni successivi, in modo da mantenere uno stato di immunosoppressione. La profilassi standard, nell'ambito di un regime mieloablativo, prevede l'associazione della ciclosporina A con il metotrexate⁷.

Alcuni aggiustamenti della profilassi sono previsti in base alla tipologia di donatore, ad esempio:

- nel trapianto da donatore unrelated: l'aggiunta alla profilassi standard del siero antilinfocitario ATG ha prodotto un miglioramento della qualità di vita e una riduzione dell'incidenza della cGVHD;
- nel trapianto da donatore aploidentico, l'aggiunta di ciclofosfamide post-trapianto produce riduzione del rischio di GVHD⁹;
- nel trapianto con sangue cordonale: si utilizza la sola profilassi con CsA e MMF.

I vari regimi di condizionamento e/o immunosoppressivi suddetti, con intensità variabile, sono tossici per il tratto gastro-intestinale e le compromissioni funzionali spesso si ripercuotono sulle capacità assorbitive, producendo malassorbimento e deficit nutrizionale. La nutrizione enterale precoce si è dimostrata protettiva per il rischio di GVHD ed in ogni caso, promuove il recupero funzionale ed energetico, favorendo il mantenimento di una flora batterica bilanciata². Infatti, l'integrità del microbiota intestinale, in termini di biodiversità e di ricchezza di specie, da studi recenti, è stata associata ad un migliore outcome (sopravvivenza globale, minore incidenza di mortalità da GVHD). In pazienti con disregolazione del microbiota intestinale associato a complicanze nel post trapianto, si sta valutando l'indicazione del trapianto fecale. Questa opzione terapeutica, sulla base di diverse serie di casi e da piccoli trial disponibili, sembra essere un trattamento promettente in pazienti con infezioni da germi multiresistenti (inclusa la colite da *Clostridium Difficile*) e in pazienti con GVHD refrattaria, altresì nella profilassi della GVHD in pazienti che presentano fattori di rischio¹⁰.

1.1.4 RECUPERO DEL SISTEMA IMMUNITARIO DOPO IL TRAPIANTO

L'obiettivo del trapianto è quello di ottenere un attecchimento delle cellule trapiantate duraturo: questa condizione si verifica quando il sistema ematopoietico è completamente

ricostituito dalla progenie delle cellule staminali somministrate. La ricostituzione del sistema immunitario è un processo molto dinamico e ha inizio con il recupero dell'immunità innata seguita da quella adattativa: le tempistiche di questo processo sono influenzate da fattori come l'età, l'intensità del regime di condizionamento e la risorsa di CSE. Sinteticamente possono essere distinte tre fasi:

1. Fase pre-engraftment (< 15-45 giorni dal trapianto): caratterizzata da profonda pancitopenia della durata di giorni o settimane. In particolare, la neutropenia e il danno alle barriere muco-cutanee comporta un rischio molto alto di sepsi da batteriemia ed infezioni opportunistiche fungine anche disseminate;
2. Fase precoce post-engraftment (30-100 giorni dal trapianto), si verifica un recupero delle cellule NK ed iniziano a ricostituirsi i linfociti T, ma il repertorio è ancora ristretto. Ne risulta quindi un'alterazione dell'immunità cellulare e umorale, con aumentato rischio di infezioni virali e riattivazioni di infezioni latenti. Un'altra complicanza che può emergere acutamente in questa fase, è la GVHD;
3. Fase tardiva post-engraftment (> 100 giorni dal trapianto), continua il recupero dei linfociti T e B e il repertorio cellulare si diversifica. Accanto alle complicanze infettive sempre possibili (batteri capsulati, funghi o virus) si può verificare la GVHD ad esordio e progressione cronici (cGVHD)¹¹⁻¹².

1.1.5 LE COMPLICANZE GASTROINTESTINALI

L'apparato gastrointestinale è tra i distretti più colpiti dai meccanismi patologici in seno al trapianto allogenico di CSE. Ciò avviene per vari motivi: per la sua ricca vascolarizzazione, l'elevato contenuto di cellule immunocompetenti, il rapido turn-over epiteliale della sua mucosa, l'alterazione dell'integrità della barriera muco-epiteliale per effetto della tossicità dei farmaci ed infine, ma non da meno, per la modificazione degli equilibri simbiotici tra le varie specie che costituiscono il microbiota intestinale.

Le complicanze gastrointestinali possono essere distinte secondo un criterio temporale in 2 gruppi: *precoci* (entro 3 mesi dal trapianto) e *tardive* (dopo 3 mesi dal trapianto). Secondo un criterio eziologico, invece si possono distinguere¹³:

- **complicanze immuno-mediate**, GVHD acuta e/o cronica: la diagnosi è frequentemente d'esclusione, specialmente in pazienti con altre cause sovrappendenti, e deve sempre essere considerata qualora i sintomi persistano nonostante la terapia mirata;

- **complicanze tossiche**, tossicità da farmaci;
- **complicanze vascolari**, trombotiche e/o emorragiche;
- **complicanze infettive**, che come infezioni *de novo* o riattivazioni di infezioni latenti, possono verificarsi in ogni momento del post-trapianto.

In base al distretto coinvolto, nei pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali sono state registrate complicanze ¹⁴⁻¹⁵:

- epatiche, da varie cause con danno epatocitario, biliare o vascolare e manifestazione clinica di varia intensità con ittero citolitico-colestatico;
- gastrointestinali superiori, mucositi (orale, esofago-gastrica) o GVHD che causano dispepsia (nausea e vomito) fino a quadri più gravi con ulcerazioni (sanguinamento, perforazione, esiti cicatriziali stenotici);
- gastrointestinali inferiori, diarrea su base tossica, infettiva, immunomediata (GVHD). La diarrea è uno dei sintomi più riportati delle varie casistiche; è principalmente causata dal danno mucosale dovuto al condizionamento con la possibilità di evoluzione in enterocolite neutropenica. In tal caso il danno alla mucosa intestinale determina l'edema intestinale, la vasodilatazione e l'aumento della permeabilità che conduce ad una maggiore vulnerabilità all'invasione batterica.

1.2 LE COMPLICANZE IMMUNO-MEDIATE: LA GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE (GVHD)

La **GVHD** è un disordine autoimmune che colpisce molteplici organi e tessuti del donatore con un decorso variabile, condizionando l'aspettativa di vita dei pazienti interessati. Secondo un criterio temporale, viene distinta in GVHD acuta e GVHD cronica, tuttavia si tratta di una convenzione semantica dato che le manifestazioni cliniche acute e croniche spesso hanno un *continuum temporale* e quindi si sovrappongono¹⁶. Il meccanismo patogenetico consiste nel mancato riconoscimento, da parte dei linfociti del donatore, degli antigeni espressi dai tessuti del ricevente, innescando un'intensa risposta infiammatoria. Questa coinvolge le cellule APC degli organi linfoidi secondari, i linfociti T e i linfociti B. La conseguente cascata infiammatoria si autoalimenta mediante il rilascio di citochine pro-infiammatorie con espansione, differenziazione e *homing* di linfociti T alloreattivi, e specifici contro i tessuti dell'ospite. La GVHD è stata identificata come una reazione Th1 mediata per l'elevata espressione di citochine quali IFN- γ , TNF- α , IL1. Tuttavia, nuovi studi hanno

stabilito un ruolo anche dei linfociti Th2 e Th17. Infatti, l'interleuchina 6, citochina di tipo Th2, promuove la GVHD non solo attivando i linfociti Th1, ma anche i linfociti Th17 e diminuendo l'espressione di linfociti T regolatori (Treg). Un'altra citochina pro-infiammatoria fondamentale per la proliferazione e differenziamento dei linfociti T è l'IL-2, prodotta dai linfociti stessi in seguito all'interazione con le cellule APC. Infatti, l'interruzione della sua produzione ed attività autocrina e paracrina, attraverso gli inibitori della calcineurina è lo standard nella prevenzione della GVHD. La cascata citochinica culmina con l'attivazione di mediatori, quali i linfociti T CD8+, che perpetuano il danno a carico delle cellule del ricevente, quindi di organi quali la cute, l'intestino e il fegato¹⁷. Tra i fattori di rischio per l'insorgenza della GVHD vi sono l'età, l'intensità del regime di condizionamento, la profilassi utilizzata e il tipo di donatore, nonché la compatibilità HLA. Pertanto, è chiaro che la somiglianza genetica tra il donatore e l'ospite (espressa come il grado di disparità HLA), condiziona il rischio di GVHD ed è inversamente proporzionale alla severità della GVHD, eventualmente sviluppata².

1.2.1 IL RUOLO DEL REGIME DI CONDIZIONAMENTO

I regimi di condizionamento rappresentano una fase cruciale del trapianto allogenico di CSE e hanno la duplice funzione di eliminare o ridurre drasticamente il carico tumorale (nel caso delle patologie neoplastiche), sopprimendo il sistema immunitario del ricevente per garantire l'attecchimento del trapianto. Questi regimi impiegati possono essere distinti in base alla dose, alle tipologie di farmaci utilizzati e alla loro eventuale associazione con la radioterapia¹⁸. È possibile distinguere i seguenti regimi:

- MAC, regime di condizionamento mieloablativo caratterizzato dalla combinazione di chemioterapici alchilanti, quali ciclofosfamide (CY), busolfano (BU), melfalan, etoposide con/senza la total body irradiation (TBI) a dosi pari a 10 Gy. Il MAC può condizionare un'elevata tossicità e mortalità, influenzate da diverse variabili, tra cui l'età del paziente e del donatore, stadio della patologia sottostante ed il grado di compatibilità HLA tra donatore e ricevente;
- RIC, regime a ridotta intensità in cui i dosaggi degli agenti alchilanti e dell'eventuale TBI sono ridotti rispetto al MAC. Frequentemente consiste nell'impiego di fludarabina combinata con un agente alchilante (melfalan, busolfano, thiotepa) oppure fludarabina-TBI. Si ottiene sempre citopenia, anche prolungata, ma la mortalità correlata al trapianto è inferiore in confronto al regime precedente;

- NMAC, introdotto con lo scopo di ridurre la tossicità legata al condizionamento, specie nella popolazione più anziana. La citopenia e la tossicità sono minime, quindi la mortalità legata al trapianto è inferiore rispetto agli altri regimi di condizionamento. Permette l'attecchimento delle cellule del donatore, ma richiede un'elevata quantità di cellule CD34+ per avere successo. Alcuni esempi di NMAC sono rappresentati dall'accostamento di fludarabina-CY, TBI 2 Gy, TBI 1 Gy, ATG.

Uno studio del 2012 condotto su 6,848 pazienti ha evidenziato come l'uso di trattamenti più aggressivi (MAC-TBI), addebiti un rischio aumentato di aGVHD di grado moderato-severo (2-4), principalmente con localizzazione cutanea e gastrointestinale. Infatti la tossicità tissutale causata dal condizionamento viene considerata il primo step nell'attivazione delle cellule con funzione APC del ricevente creando una condizione pro-infiammatoria attraverso la produzione di citochine quali IFN- γ , IL6, TNF- α ¹⁹. La radioterapia come noto, determina un danno dose dipendente sull'intestino, causando alterazioni endoteliali, epiteliali e alle cripte intestinali. I chemioterapici, in particolare il busulfano, la CY, l'irinotecano ed il 5-FU, sono spesso responsabili di mucositi e diarrea. L'aumento della permeabilità intestinale che ne deriva può agevolare la traslocazione di batteri attraverso la barriera muco-epiteliale, una condizione definita con il termine di "*leaky bowel syndrome*". Questa condizione amplifica l'attivazione del sistema immune locale attraverso il passaggio di PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) con attivazione a cascata dei sistemi di risposta immune (innata → semiadattativa → adattativa) che quindi, innescano, autoalimentano ed infine mantengono la GVHD².

1.2.2 LA GVHD ACUTA

Comunemente la GVHD acuta si realizza entro 100 giorni dal trapianto, con un'incidenza compresa tra il 10% e l'80% dei pazienti sottoposti a trapianto di CSE. Coinvolge principalmente tre apparati, quello cutaneo il più precocemente colpito, seguito dal tubo digerente ed il sistema epato-biliare.

L'interessamento della cute, almeno nelle fasi iniziali, produce un rash maculo-papuloso che si sviluppa a partire dalla palma delle mani e dei piedi, quindi si diffonde al resto del corpo, compreso il volto. Nei casi più gravi sono stati registrati manifestazioni simili alla necrolisi epidermica tossica, diffuse ulcerazioni muco-cutanee e bolle. La diagnosi differenziale include gli effetti collaterali della chemioterapia e/o dell'irradiazione, gli esantemi virali e le

reazioni avverse da farmaci. La biopsia cutanea è spesso necessaria per chiarire la diagnosi. Le caratteristiche istopatologiche consistono nell'apoptosi dei cheratinociti alla base delle papille dermiche, discheratosi e l'infiltrazione linfocitaria perivascolare a livello del derma.

La aGVHD epatica si presenta con ittero colestatico, associato a coagulopatia, iperammonemia e ipoalbuminemia nei casi più severi. Si riscontrano, altresì sovente, epatomegalia, urine ipercromiche e feci acoliche. Possono presentarsi sintomi non specifici come la febbre, iporessia e nausea. Le caratteristiche istopatologiche su biopsia epatica consistono in un infiltrato linfocitario degli spazi portalì e vari gradi di distruzione dei dotti biliari. Purtroppo nella pratica il rischio di sanguinamento associato a trombocitopenia rende di difficile praticabilità la procedura biotica e pertanto spesso la diagnosi di GVHD epatica si sospetta sulla base dell'andamento clinico e dei parametri laboratoristici. La diagnosi differenziale può essere complessa e devono essere considerate: la malattia veno-occlusiva, le infezioni/riattivazioni virali e la tossicità da farmaci.

Il coinvolgimento intestinale si manifesta con diarrea tipicamente acquosa, associata a dolore addominale a tipo colico e distensione addominale, nei casi più gravi a sanguinamento, causato da ulcerazioni della mucosa intestinale. La compromissione della porzione superiore del tratto gastrointestinale comporta invece l'insorgenza di vari gradi di dispepsia, vomito e calo ponderale. La diagnosi differenziale è il principale problema in questo caso, dato che la mucosite, le infezioni e la tossicità farmacologica possono coesistere o variabilmente insistere sul quadro clinico-sintomatologico del paziente. Pertanto, spesso le suddette problematiche, specie quando persistono nel tempo, richiedono l'esecuzione di esami endoscopici (l'esofago-gastrosopia e/o la retto-sigmoidoscopia-colonsocopia) corredati dalla biopsia della mucosa. L'esame istologico dimostra la presenza di: corpi apoptotici alla base delle cripte, ascessi criptici, infiltrato infiammatorio e appiattimento della superficie epiteliale (atrofia dei villi). Tuttavia, spesso l'esame istologico può non essere dirimente per la diagnosi, quindi necessitare di approfondimenti con colorazioni immuno-istochimiche, mediante Ab monoclonali o altre tecniche colorimetriche, finalizzate ad escludere la presenza di microrganismi patogeni opportunisti come il CMV²⁰.

La prima classificazione della aGVHD è stata sviluppata da Glucksberg e collaboratori (nel 1974): ogni distretto coinvolto tra cute, fegato e tratto gastrointestinale è stadiato da 0 (assente) a 4 (severa). Gli stadi risultanti sono poi combinati in modo da ottenere un grading globale della GVHD compreso tra I (lieve) a IV (life-threatening). Il grading proposto da

Glucksberg è stato successivamente rivisitato con la formulazione dei criteri di Keystone (modified *Glucksberg criteria*), riportati nella seconda tabella ²¹.

Stadio	Coinvolgimento cutaneo	Coinvolgimento epatico (livelli di bilirubina)	Coinvolgimento intestinale (diarrea)
1	rash maculo-papulare < 25% della superficie corporea	2-3 mg/dL	500-1000 mL/ die (GVHD intestinale), con nausea persistente, vomito o anoressia (upper GVHD)
2	rash maculo-papulare 25-50%	3,1-6 mg/dL	1001-1500 mL/die
3	Rash maculo-papulare > 50% ed eritrodermia generalizzata	6,1-15 mg/dL	> 1500 mL/die
4	Eritrodermia generalizzata con bolle e desquamazione	>15 mg/dL	Diarrea > 1500 mL/die associata a dolore addominale severo con o senza ileo

Grado	Cute	Intestino	Fegato
I	stadio 1-2		
II	stadio 3 e/o	stadio 1 e/o	stadio 1
III	stadio 0-3 e/o	stadio 2-4 e/o	stadio 2-3
IV	stadio 4 e/o		stadio 4

Terapia

Il trattamento della GVHD acuta dovrebbe essere iniziato alla comparsa di sintomi e segni clinici, senza necessità di conferma istologica. La terapia della GVHD differisce sulla base del grado di malattia. Nel grado I in genere non è necessario un trattamento sistemico, ma solo topico. Le manifestazioni cutanee rispondono bene a creme a base di corticosteroidi e gli antistaminici sono raccomandati in caso di prurito. Eventualmente occorre ottimizzare il dosaggio degli inibitori della calcineurina, usati come profilassi. Nel caso del paziente con grado II-IV il trattamento di scelta è rappresentato dai corticosteroidi sistemici, come il prednisone, al dosaggio di 2 mg/kg/die associato variabilmente a inibitori della calcineurina. In genere la aGVHD epatica e intestinale richiede una terapia corticosteroidica più prolungata rispetto alla malattia cutanea con tempi di risposta variabili da paziente a paziente²⁰⁻²².

In caso di refrattarietà o resistenza al trattamento standard, pur non disponendo di criteri standardizzati, ci si avvale della fotoafèresi extracorporea, degli anticorpi anti-TNF α , del MMF, degli inibitori di mTOR e degli Ab anti-IL-2R. Eventuali altri tentativi terapeutici come la pentostatina, alemtuzimab e le cellule staminali mesenchimali sono stati provati in casi aneddotici.

Nel tentativo di identificare dei marker prognostici e predittivi di risposta (o resistenza), sono stati valutati i livelli di varie molecole come il dosaggio dei livelli di calprotectina e l' $\alpha 1$ antitripsina fecali. Da uno studio condotto su 72 pazienti, dei quali 51 sviluppavano GVHD acuta, l'incremento dei livelli di questi biomarcatori veniva riscontrato in pazienti affetti da GVHD del tratto gastrointestinale. La calprotectina è una proteina di 36,5 kDa, appartenente ad una famiglia delle proteine leganti il calcio e lo zinco. È contenuta nei neutrofili, monociti, macrofagi e in quantità inferiori in alcune cellule epiteliali e svolge un'azione micostatica e batteriostatica. I livelli di calprotectina fecale riflettono l'infiammazione della mucosa intestinale, dato che nei processi flogistici si verifica un aumento dei neutrofili e macrofagi nei tessuti coinvolti. L' $\alpha 1$ -antitripsina è una serina proteasi che inibisce i mediatori pro-infiammatori, in particolare contrasta la risposta citochinica che si verifica in seguito al trapianto: dunque un suo aumento indica infiammazione. Questi due marcatori non possono essere considerati utili a scopo diagnostico, data principalmente la loro scarsa specificità; infatti una qualsiasi infezione o processo infiammatorio del tratto GI può determinare un'elevazione dei livelli. Tuttavia, si sono dimostrati utili nel predire la risposta ai corticosteroidi e la severità della GVHD²³.

1.2.3 LA GVHD CRONICA

La GVHD cronica convenzionalmente viene definita tale quando le manifestazioni cliniche si sviluppano o si protraggono oltre 100 giorni dall'allottrapianto di CSE. È spesso preceduta da una storia di GVDH acuta. Si caratterizza da manifestazioni che interessano un singolo organo o vari distretti ed assume connotazioni che ricordano vari disordini autoimmuni:

- La cavità orale (tra il 45-83% dei casi) con lesioni lichenoidi, placche ipercheratosiche, ulcere, restrizione dell'apertura buccale causata da sclerosi, atrofia della mucosa e delle ghiandole salivari con conseguente xerostomia¹⁶.
- Il tratto gastrointestinale con lesioni ulcerative che esitano in fenomeni cicatriziali – fibrotici con sviluppo di stenosi;
- La cute con le manifestazioni che includono atrofia, alterazioni della pigmentazione, lesioni lichenoidi, erosioni, fissurazioni ed ulcerazioni²⁴;
- Il fegato colpito nel 50% dei casi, soffre di un sovvertimento strutturale più o meno intenso per la formazione di setti fibrotici quale esito di persistenti fenomeni infiammatori. Nelle fasi più avanzate tali alterazioni parenchimali, appaiono indistinguibili da quelle che caratterizzano la cirrosi epatica. Le manifestazioni cliniche vanno dall' alterazione funzionale epatica con colestasi ed ittero fino allo scompenso epatico con ascite, coagulopatia, ipertensione portale ed emorragia digestiva nonché encefalopatia porto-sistemica²⁴.

Terapia

La terapia di prima linea comprende i corticosteroidi sistemici e gli inibitori della calcineurina. Anche per la cGVHD non esiste una terapia standardizzata di seconda linea; la fotoaferesi extracorporea, il MMF, rituximab, gli inibitori di mTOR, sono tutti farmaci utilizzati in caso di refrattarietà al trattamento steroideo. La prolungata immunosoppressione che ne consegue spesso condiziona un elevato rischio di infezioni secondarie, principalmente virali e fungine come quelle da HSV e da Candida, altresì neoplasie ematologiche secondarie, quali disordini linfoproliferativi e tumori solidi¹⁶.

1.2.4 RUOLO DELL'ENDOSCOPIA NELLA DIAGNOSI E NELLA DIAGNOSTICA DIFFERENZIALE

Le più comuni manifestazioni cliniche associate alla GVHD del tratto gastrointestinale (nausea, vomito, anoressia e diarrea) sono sintomi del tutto aspecifici, complicando sovente la diagnosi clinica di GVHD: il ritardo diagnostico e terapeutico che ne consegue può avere un impatto drammatico sull'outcome di questi pazienti. Pertanto, nei pazienti sintomatici l'esofagogastroduodenoscopia (EGDS) e/o la retto-sigmoido-colonscopia associate a biopsia e successivo esame istologico si rendono necessarie. La localizzazione della sintomatologia è il principale fattore che orienta la scelta della metodica endoscopica, tuttavia non di rado vengono utilizzate entrambe nei pazienti con sintomi diffusi. Studi recenti hanno evidenziato una maggiore attendibilità diagnostica delle indagini "basse", rispetto a quelle gastro-duodenali, per l'accertamento diagnostico di GVHD. La retto-sigmoido-colonscopia con biopsia, infatti è stata riportata essere utile a sciogliere il quesito diagnostico di GVHD, persino in pazienti con esclusivi sintomi alti, sebbene l'EGDS e l'istologia gastro-duodenale risultassero non dirimenti per la diagnosi²⁵. A supporto di quanto detto, alcuni studi riportano, dal 30% fino all'80% dei pazienti sintomatici ma con endoscopia negativa una diagnosi di GVHD all'esame istologico da biopsia rettale. Le alterazioni endoscopiche più frequentemente riportate consistono in: erosioni, ulcere, emorragie subepiteliali, iperemia, edema e disepitelizzazione/atrofia della mucosa. Quelle istologiche, come peraltro già prima riportato, consistono nell'infiltrato infiammatorio leucocitario, nella presenza dei corpi apoptotici, nell'atrofia dei villi con alterazione del rapporto villo/cripta, corpi apoptotici nelle cripte intestinali e abbondante infiltrato infiammatorio²⁶⁻²⁷.

In dettaglio, a livello intestinale, la disepitelizzazione della mucosa è un marker endoscopico importante: ha infatti un valore predittivo elevato per la GVHD severa (grado III-IV) con la necessità di un intervento terapeutico precoce. Inoltre, l'atrofia della valvola ileocecale e l'atrofia dei villi del tenue sono caratteristiche endoscopiche frequenti (fino al 70% dei casi riportati), che presentano una buona specificità e alto valore predittivo positivo: ne deriva che l'esame endoscopico intestinale più è profondo e più risulta predittivo in paziente con diarrea cronica. Tuttavia, nella pratica clinica non di rado si riscontrano difficoltà che riducono la performance dell'esame stesso: l'insufficiente toilette intestinale e le condizioni cliniche spesso molto compromesse impediscono il completamento dell'esplorazione ed aumentano il rischio di complicanze iatrogene (sanguinamento, perforazione e sovrainfezioni)²⁷. Il ruolo forse più rilevante dell'endoscopia/istologia, in questo contesto clinico, è tuttavia quello di

escludere altre condizioni patologiche. Ad esempio, una Micro-Angiopatia Trombotica (TMA) viene sospettata in presenza di petecchie, sebbene possa essere riscontrata una disepitelizzazione analogamente alla GVHD; l'esame istologico identifica una degenerazione non infiammatoria delle cripte intestinali senza rilevanti figure apoptotiche bensì con emorragie intestinali, globuli rossi frammentati e/o trombi ialini nelle arteriole terminali pre-capillari. Nelle coliti infettive, ad esempio da CMV, la presenza di erosioni, ulcere ed edema è condivisa con la GVHD, ma microscopicamente gli inclusi intranucleari basofili da un lato ed i corpi apoptotici alla base delle cripte dall'altro, fanno propendere la diagnosi specificatamente e rispettivamente verso la colite da CMV piuttosto che verso la GVHD intestinale. Inoltre, le tecniche di immuno-istochimica sono sempre più frequentemente impiegate per escludere la presenza di latrati patogeni opportunisti (adenovirus, rotavirus, herpes virus, enterovirus) nelle sezioni istologiche di biopsie intestinali²⁸.

1.3 LA DIAGNOSI DIFFERENZIALE

1.3.1 COMPLICANZE TOSSICHE

Mucositi

Le mucositi sono complicanze, spesso osservate nel paziente oncologico in terapia, caratterizzate da lesioni infiammatorie e/o ulcerative, ricoperte da pseudomembrane fibrinose. Interessano la cavità orale, estendendosi, in funzione della gravità, a tutto il tratto gastrointestinale. È stata stabilita una precisa correlazione con l'intensità della chemioterapia e/o radioterapia precedentemente praticate. Tali lesioni spesso si accompagnano ad intenso dolore che rende necessario il ricorso ad analgesici e alla riduzione dell'intensità della terapia antineoplastica. L'incidenza delle mucositi orali di grado moderato-severo, in pazienti che ricevono un'irradiazione del distretto testa-collo raggiunge l'85% dei casi; tuttavia tutti i pazienti sviluppano mucositi di vario grado. Tra i pazienti sottoposti a trapianto di CSE, le mucositi di grado severo si sviluppano nel 75% dei casi e sono correlabili all'intensità del regime di condizionamento e talora al trattamento impiegato per la prevenzione della GVHD. In particolare, durante la fase di aplasia midollare è fondamentale la gestione delle mucositi dato che vi è un rischio di sepsi da perdita dei meccanismi di barriera mucosale nonché per la profonda immunodepressione²⁹.

Le mucositi orali

Le mucositi orali possono compromettere l'alimentazione, l'igiene orale e quindi la qualità di vita del paziente e le forme più severe gravare sulla sopravvivenza post-trapianto. La compromissione dell'alimentazione orale in pazienti con faringodinia ed odinofagia può richiedere il supporto nutrizionale parenterale o addirittura il ricorso alla gastro-digiunostomia percutanea. Sono state proposte delle scale per misurare la gravità delle mucositi orali e tra le più utilizzate, quella seguente proposta dall'OMS³⁰⁻³¹:

Grado 0	Assenza di mucosite orale
Grado 1	Eritema e dolore
Grado 2	Ulcere, in grado di assumere cibi solidi
Grado 3	Ulcere, richiede dieta liquida
Grado 4	Ulcere e alimentazione non possibile

Patogenesi

Nel determinismo delle lesioni che caratterizzano le mucositi concorrono diversi fattori quali: l'alterazione del microbiota orale, l'età, il sesso, le comorbidità, e la predisposizione genetica. Infatti, mutazioni o polimorfismi dell'enzima *diidropirimidina deidrogenasi* *DPD*, si associano ad una maggiore suscettibilità alla tossicità indotta dal 5-FU. Allo stesso modo alcuni polimorfismi del gene codificante la *timidilato sintetasi* sono correlati ad una ridotta espressione dell'enzima e maggiore predisposizione a sviluppare la mucosite³¹. In sintesi, viene proposto un modello costituito da 5 fasi per spiegare la patogenesi delle mucositi:

1. Fattore scatenante del danno tissutale: la radioterapia e/o la chemioterapia avviano il danno cellulare con morte delle cellule epiteliali basali. La radio-chemioterapia determina anche la produzione di radicali liberi dell'ossigeno che giocano un ruolo nella genesi del danno;
2. Interazione dei ROS con recettori espressi sulla membrana cellulare e conseguente attivazione delle *pathways* intracellulari da cui deriva un up-regolazione di citochine pro-infiammatorie;

3. Attivazione di *pathways* molecolari che amplificano il danno mucosale: NFkB, IL6 e ciclossigenasi 2;
4. Ulcerazione e infiammazione: formazione di un abbondante infiltrato infiammatorio associato ad ulcerazioni della mucosa. Eventuali sovrainfezioni secondarie possono ulteriormente amplificare la risposta infiammatoria mediante sovra-produzione di citochine;
5. Fase di guarigione: proliferazione epiteliale e differenziazione cellulare con recupero dell'integrità epiteliale, tipicamente dopo 2-4 settimane. Tuttavia, la fase di recupero potrebbe essere ostacolata da eventuali sovrainfezioni (anche virali o fungine)³⁰.

Trattamento

La gestione della mucosite orale prevede anzitutto la prevenzione delle infezioni ed il controllo della sintomatologia. Il primo passo è il mantenimento di una buona igiene orale con sciacqui salini e con l'uso di uno spazzolino morbido²⁹. Quindi si può utilizzare la crioterapia e colluttori contenenti anestetici locali (2% lidocaina) per la gestione del dolore. La crioterapia svolge una duplice funzione, sul dolore e sull'infiammazione, attraverso la vasocostrizione: questa proprietà riduce peraltro l'esposizione della mucosa ai chemioterapici. Un altro aspetto fondamentale è quello dietetico: è necessario assicurare l'intake calorico a pazienti che facilmente incorrono in uno stato di denutrizione, ricorrendo eventualmente ad una dieta "*morbida*". Altri accorgimenti terapeutici sono rappresentati dalla: palliazione della xerostomia e dell'iposalivazione, utilizzo di agenti emostatici topici per la gestione dei sanguinamenti dalle ulcerazioni, utilizzo di fattori di crescita, di agenti anti-infiammatori, come benzidamina cloridrato, di antiossidanti per contrastare il danno ROS-mediato. Infine, ultimamente è stata proposta la laser terapia a bassi livelli, che contrasta l'azione dei ROS e delle citochine pro-infiammatorie³⁰.

Le mucositi intestinali

Le mucositi gastrointestinali possono, analogamente alle forme orali, rappresentare un importante problema clinico con impatto sull'*outcome* del trapianto. Le principali manifestazioni cliniche consistono in dolore addominale crampiforme, diarrea e gonfiore. Le lesioni presenti sono simili a quelle osservate nella cavità orale, con edema, erosioni ed

ulcerazioni della mucosa. Ovviamente l'accertamento diagnostico è più complicato e necessita di esami invasivi (endoscopia); pertanto spesso queste lesioni vengono sospettate e monitorate mediante parametri indiretti come il *timing* e l'entità della diarrea²⁹.

Fattori di rischio e patogenesi

Anche la mucosite intestinale riconosce un meccanismo multifattoriale, l'intensità dei trattamenti impiegati nel condizionamento. L'alterazione del microbiota intestinale e condizioni genetiche sono stati invocati come fattori predisponenti lo sviluppo di mucosite. Riguardo al ruolo del microbiota, un incremento di *Proteobacteria*, tra cui *E.coli* e *Salmonella spp*, ed una riduzione di *Firmicutes* ed in particolare di *Clostridiales* sono stati associati ad un maggior rischio di sviluppare una mucosite intestinale ma anche la GVHD. Le citochine pro-infiammatorie svolgono un'azione centrale per la formazione del danno mucosale: sono coinvolti Nf-kB, IL6, IL1- β , TNF- α , ROS e chemochine (CXCL4, CXCL9). Altresì, i regimi di condizionamento provocano anche un danno a carico delle cellule neuronali e della glia enteriche, determinante un'alterazione della motilità gastrointestinale³².

Trattamento

Una buona gestione delle mucositi intestinali deve includere il controllo del dolore tramite analgesici, il mantenimento di un'adeguata idratazione ed alimentazione, tenendo conto anche di una potenziale transitoria intolleranza al lattosio e alla esclusione di infezioni da batteri enteropatogeni. I trattamenti empirici della diarrea comprendono l'uso della loperamide, dell'octreotide e di antibiotici intestinali quali la rifaximina ed il metronidazolo. Il verificarsi di sanguinamenti può stimolare l'uso di clisteri di sucralfato, come nel caso di pazienti con rettorragia causata da una proctite attinica²⁹.

Tossicità indotta dai farmaci

Diarrea indotta da antibiotici

La diarrea si sviluppa frequentemente a seguito di un trattamento antibiotico ad ampio spettro, specie se prolungato. Gli antibiotici più frequentemente chiamati in causa sono le cefalosporine, la clindamicina e le penicilline ad ampio spettro, quali l'amoxicillina e la piperacillina. Al contrario i chinolonici, le tetracicline ed il cotrimossazolo costituiscono un

rischio più basso. Altri fattori di rischio sono rappresentati dall'età (> 65 anni), dalla durata della terapia (> 3 giorni) e dalla presenza di comorbidità quali il diabete mellito o l'IRC³³. Inoltre, l'alterazione della normale flora batterica intestinale causata dagli antibiotici può favorire la *fitness* di specie patogene e compromettere il metabolismo dei carboidrati e degli acidi biliari a livello intestinale con conseguente diarrea osmotica. Tra i batteri patogeni più frequentemente coinvolti si annovera il *Clostridium difficile* che causa fino al 20% delle diarree associate agli antibiotici. Lo standard diagnostico consiste nella ricerca delle citotossine A e B su campioni fecali e l'esame colturale delle feci corredato da test biomolecolare (RT-PCR) che ne documenta la presenza del genoma³⁴.

Tossicità da immunosoppressori

Il largo impiego di farmaci immunosoppressori nel nostro ambito clinico ha posto l'attenzione sulle loro tossicità a breve termine e lungo termine. Questi effetti collaterali possono essere moderati (nausea, perdita di appetito e malessere) oppure severi come nel caso producano alterazioni metaboliche, nefrotossicità e diarrea severa. In genere tali effetti collaterali sono di facile gestione in quanto temporanei e/o reversibili con la riduzione dei dosaggi o la sospensione³⁵⁻³⁶. Il MMF, attraverso il suo metabolita attivo l'acido micofenolico (MPA), causa un'inibizione della proliferazione delle cellule epiteliali gastrointestinali; questo determina una riduzione dell'assorbimento di fluidi e quindi la diarrea. È stata inoltre riportata atrofia dei villi intestinali associata a casi di diarrea severa. I metaboliti di MPA sostengono il danno, interferendo con la replicazione cellulare e attivando il sistema immunitario con lo scatenamento di reazioni autoimmuni³⁷.

Tossicità epatobiliari

La presenza di ittero dopo trapianto rappresenta un fattore prognostico sfavorevole associandosi ad un aumento della mortalità. Una delle principali problematiche è rappresentata dalla SOS (Sinusoidal Obstruction Syndrome) o più genericamente dalla VOD (Veno-Occlusive Disease). L'evento patogenetico iniziante è rappresentato dalla compromissione del sistema venoso epatico per azione tossica sull'endotelio sinusoidale principalmente della zona 3 dell'acino epatico, per effetto di metaboliti tossici. Infatti, alcuni farmaci, impiegati nel condizionamento, metabolizzati dal citocromo P450, generano sostanze dannose sulle cellule endoteliali e sugli epatociti, in particolare quelli della zona 3 (povera di glutazione e ricca di P450). Nella progressione del meccanismo fisiopatologico, si verifica un

progressivo restringimento delle venule epatiche con riduzione dell'*inflow* e conseguente sviluppo di ipertensione portale sinusoidale³⁸. La SOS è strettamente legata al regime di condizionamento in termini di molecole utilizzate e di intensità: vi è un rischio di SOS maggiore, fino al 50%, con impiego di ciclofosfamide associata a busulfano e TBI. La variabilità di incidenza di questa complicanza è in parte riconducibile anche a suscettibilità individuale legata alla variabilità genica degli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci³⁹. Altri fattori di rischio aggiuntivi sono rappresentati dalle epatopatie preesistenti, dall'età, dall'uso di altri farmaci epatotossici. La presentazione clinica consiste spesso in epatomegalia dolente, aumento di peso per ritenzione idrosalina, iperbilirubinemia e nei casi più severi da disfunzione multiorgano con coinvolgimento polmonare, renale ed encefalico. Il decorso clinico della SOS-VOD è variabile e legato alla severità del quadro clinico. I pazienti con una SOS di entità lieve-moderata riescono a recuperare nel 70% dei casi con un trattamento di supporto, mentre pazienti con un quadro clinico severo possono andare incontro al decesso a causa prevalentemente dell'insufficienza renale e cardiopolmonare⁴⁰⁻⁴¹. La terapia di supporto prevede la restrizione idrosalina e l'impiego di diuretici per correggere il sovraccarico di fluidi, la paracentesi evacuativa in caso di ascite. Il farmaco più utilizzato sia per la profilassi che per il trattamento è il defibrotide. Questa molecola, somministrata per via endovenosa, possiede proprietà antinfiammatorie, anti-ischemiche e antitrombotiche. Sono stati impiegati anche altri trattamenti, anche se nessuno di questi è attualmente raccomandato: l'attivatore tissutale del plasminogeno, l'N-acetilcisteina, il metilprednisolone e l'acido ursodesossicolico⁴⁰.

Anche la ciclosporina può sortire epatotossicità attraverso l'inibizione del trasporto di bile a livello canalicolare e talora causando un modesto aumento della bilirubina o un incremento delle transaminasi. Il tacrolimus meno frequentemente è causa di colestasi in genere legata ad accumulo da iperdosaggio. Infine, il cotrimossazolo e numerosi antifungini quali l'itraconazolo, il voriconazolo ed il fluconazolo possono provocare epatotossicità acuta⁴¹.

1.3.2 COMPLICANZE VASCOLARI

Il trapianto allogenico di midollo comporta un aumentato rischio di complicanze vascolari di natura emorragica e trombotica. Gli **eventi tromboembolici** originando dal distretto venoso profondo, per ipercoagulabilità legata a vari fattori (farmacologici, tossici, infiammatori, da dispositivi intravascolari come cateteri venosi), possono provocare embolia polmonare e quindi gravare ulteriormente sulla prognosi del paziente. La GVHD sia nella

forma acuta che in quella cronica rappresenta un riconosciuto fattore di rischio per lo sviluppo di tromboembolismo. Infatti, le citochine pro-infiammatorie prodotte, (come il $\text{TNF}\alpha$), alterano la funzione emostatica dell'endotelio riducendo l'espressione di fattori anticoagulanti. Le complicanze di natura trombotica possono, altresì coinvolgere il distretto arterioso; in questo caso portano allo sviluppo di ictus ischemico, occlusione coronarica e/o ischemie distrettuali⁴². L'**ischemia intestinale** nel post-trapianto allogenico è una rara complicanza, che per quanto poco riportata in letteratura, è sovente associata alla aGVHD così come la microangiopatia trombotica. La microangiopatia trombotica (TMA) è caratterizzata da anemia emolitica microangiopatica e trombocitopenia dovuta alla formazione di aggregati piastrinici nel microcircolo che possono causare ischemia tissutale. Tra i fattori patogenetici vi sono: il danno endoteliale indotto dal regime di condizionamento (chemioterapici), l'uso di inibitori della calcineurina e la GVHD. In uno studio condotto su 251 pazienti sono stati riportati 16 casi di dolore addominale, diarrea e sanguinamento intestinale con evidenze istopatologiche di microangiopatia trombotica, che evidentemente comportava lo sviluppo di ischemia intestinale. La diagnosi si avvale dell'analisi di parametri bioumorali surrogati, quali: i bassi livelli di aptoglobina, la presenza di schistociti nello striscio di sangue e l'aumento di LDH. Colpisce, in genere pazienti di sesso maschile e frequente è l'associazione con obesità e l'ipertrigliceridemia. Questo risultato suggerisce una possibile associazione tra la microangiopatia trombotica e la sindrome metabolica che condiziona un rischio aggiuntivo di ischemia intestinale e quindi di una peggiore prognosi per questa tipologia di pazienti⁴³.

Gli **eventi emorragici**, quando occorrono nel post-trapianto, hanno un impatto prognostico negativo e pesano sulla sopravvivenza globale più che gli eventi trombotici. Tra i fattori di rischio riconosciuti vi sono: la piastrinopenia, l'uso di sangue cordonale, l'assunzione di farmaci anticoagulanti, l'uso di ATG ed ancora la aGVHD moderata-severa. Paradossalmente anche la microangiopatia trombotica è un fattore di rischio per emorragia. Infatti, gli esiti distrofici, ad esempio nella mucosa intestinale, quale esito del danno vascolare, provocano lesioni ulcerative facilmente sanguinanti. Le sedi di sanguinamento più comunemente *life-threatening* sono a livello bronchiale, del tratto gastrointestinale e del sistema nervoso centrale. Si tratta di eventi che possono richiedere interventi intensivi (emotrasfusioni, agenti inotropi, radiologia interventistica, endoscopica, chirurgia) e che si associano ad una elevata mortalità⁴⁴.

1.3.3 COMPLICANZE INFETTIVE

I pazienti sottoposti a trapianto di CSE, specialmente in caso di trapianto allogenico, sono ad alto rischio di infezioni ad opera di microrganismi di ogni tipo: virus, batteri, parassiti e funghi (tra questi da Candida e Aspergillus). La diarrea è una delle manifestazioni cliniche correlate ad infezione più frequenti, basti pensare alla colite da **Clostridium difficile** che insiste nel 15-30% degli allo-trapianti, selezionato dallo stesso ospite a seguito di trattamenti antibiotici o trasmesso come infezione nosocomiale⁴⁵. In una quota significativa di pazienti l'infezione da Clostridium difficile occorre in una fase precoce dell'allotrapianto o addirittura precedente l'infusione cellulare⁴⁶. I fattori di rischio per le infezioni nel post-trapianto sono rappresentati dal regime di condizionamento, dall'uso di antibiotici, nonché dal numero di ospedalizzazioni. Dal punto di vista diagnostico, in pazienti con diarrea da sospetta infezione lo studio microbiologico deve essere orientato ad escludere infezioni da Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia e Cryptosporidium. Altresì, le gastroenteriti di natura virale sono spesso riportate in questi pazienti e causate da: rotavirus, adenovirus, norovirus ed herpes virus⁴⁵.

Infezioni da Rotavirus

Il rotavirus è l'agente eziologico più comunemente causale di gastroenteriti infettive tra i bambini. Nei pazienti sottoposti al trapianto di midollo la positività al rotavirus è riscontrata in circa il 10% dei campioni fecali e può essere causa di diarrea prolungata e di morbilità nel post-trapianto. Si tratta di un'infezione prevalentemente acquisita in comunità. In un soggetto immunocompetente i sintomi hanno una durata compresa tra i 3 e i 9 giorni, ma nell'ospite immuno-compromesso il rotavirus può causare una diarrea persistente ad andamento cronico, fino a 4 mesi secondo alcuni report. La sintomatologia comprende diarrea e vomito, ma anche dolore addominale, calo ponderale e perdita di appetito. In alcuni pazienti sono stati riportati anche sintomi extra-intestinali come rash cutanei, encefaliti e danno epatico. La maggior parte dei pazienti necessita di ospedalizzazione e di supporto nutrizionale parenterale. Non vi sono terapie e le immunoglobuline da sole o in combinazione con antibiotici, in alcuni report sono risultate efficaci nel ridurre la durata dei sintomi⁴⁷.

Infezioni da Herpes virus

Il cytomegalovirus (CMV) infetta circa il 70-80% dei soggetti sani, rimanendo latente nell'organismo, e il 75% dei pazienti trapiantati sieropositivi sviluppa una riattivazione virale

entro 3 mesi dal trapianto. La riattivazione virale può determinare polmoniti, epatiti, retiniti, encefaliti ed enteriti. Nei soggetti positivi per CMV, infatti viene effettuata la profilassi con ganciclovir. Nel trattamento della riattivazione si usano foscarnet e cidofovir, non scevri da importanti effetti avversi come la soppressione midollare con aumentata incidenza di infezioni fungine e batteriche⁴⁸. Lo Human Herpes Virus 6 (HHV6) può rimanere silente e la riattivazione colpire fino al 50% dei pazienti trapiantati provocando varie manifestazioni cliniche. L'infezione attiva/riattivazione si può associare ad encefalite, polmonite, epatite, soppressione midollare/rigetto e gastroenterite. La presenza di HHV-6 è stata riscontrata nelle biopsie duodenali e gastriche di pazienti con sintomi gastrointestinali (vomito e diarrea persistenti)⁴⁹.

Infezioni da Adenovirus

L'adenovirus è responsabile di infezioni autolimitanti nei soggetti immunocompetenti, ma può essere un patogeno incidente sulla prognosi dei soggetti trapiantati. L'incidenza dell'infezione nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo è compresa tra lo 0 ed il 6% e la metà di questi pazienti sviluppa patologie correlate: encefaliti, polmoniti, miocarditi, nefriti e gastroenteriti. Trai i fattori di rischio, l'età (giovani adulti), l'irradiazione TBI, aGVHD >2 ed il trapianto da MUD sembrano essere quelli prevalenti nelle varie casistiche. Al momento non c'è una terapia comprovata per il trattamento dell'infezione da adenovirus; la rivabirina è stata utilizzata empiricamente, ma la sua efficacia è controversa. Il cidofovir, un analogo nucleosidico, è stato impiegato in alcuni pazienti più gravi, con buoni risultati nonostante la nefrotossicità⁵⁰⁻⁵¹.

Infezioni parassitarie

Le infezioni parassitarie sono molto meno comuni rispetto a quelle causate da virus e batteri, tuttavia l'immunosoppressione profonda di alcuni pazienti trapiantati li espone al rischio di svilupparle. In Europa i patogeni più frequentemente causali di diarrea cronica da parassiti sono la *Giardia Lamblia* ed il *Cryptosporidium spp.* Queste infezioni danno gastroenteriti ad andamento cronico, quindi con malassorbimento, calo ponderale e possibile sviluppo di deficit nutrizionali. La diagnosi si esegue mediante l'esame colturale su liquido duodenale o nelle feci, allestendo un terreno specifico; altresì mediante la ricerca istologica su prelievo biotico⁵².

Scopo della tesi

La GVHD rappresenta una delle maggiori complicanze legate al trapianto allogenico di CSE ed è considerata la principale causa di mortalità non correlata alla recidiva della malattia ematologica di base dato che interessa circa la metà dei pazienti. Nel dettaglio, la GVHD quasi sempre colpisce il tratto gastrointestinale ed entra in diagnosi differenziale con altre complicanze che interessano l'apparato digerente nelle varie fasi trapiantologiche e dalle quali deve essere distinta per garantire al paziente il più adeguato percorso terapeutico. Gli obiettivi che ci siamo prefissi da questo studio sono i seguenti:

- Valutare l'impatto della GVHD gastro-intestinale ad esordio acuto, nell'ambito delle complicanze gastro-intestinali, in una coorte di pazienti sottoposti ad allotrapianto di CSE;
- Ricercare associazioni e quindi fattori di rischio per lo sviluppo di GVHD gastro-intestinale, analizzando le variabili anamnestiche, terapeutiche e cliniche della coorte;
- Altresì, valutare l'attendibilità diagnostica delle procedure endoscopiche ed istologiche per la conferma diagnostica di GVHD.

Pazienti e Metodi

Abbiamo inviato un'indagine retrospettiva e analizzato i dati clinici, anamnestici, laboratoristici e di *outcome* di 122 pazienti valutati consecutivamente prima e dopo l'allograft di CSE. I pazienti erano gestiti presso la SOD di Clinica Ematologica e Trapianto di CSE dell'Azienda Ospedaliera Universitaria "Ospedali Riuniti" di Ancona, nel periodo di tempo intercorso da gennaio 2015 a gennaio 2019. Sono state considerate due fasi: pre-trapianto e post-trapianto.

3.1 LA FASE PRE-TRAPIANTO

Gli elementi registrati al base-line erano specificamente i seguenti:

- Dati relativi al paziente: età alla diagnosi, sesso, stato infettivologico o di immunità relativa ad infezioni virali (HBV, HCV, HIV, CMV), emogruppo, comorbidità con particolare riferimento a quelle di carattere gastroenterologico (epatiti croniche, diabete, sindrome metabolica, malattie infiammatorie croniche intestinali, sovraccarico marziale). Sono stati considerati il SORROR risk score e l'EBMT risk score;
- Dati relativi alla malattia: emopatia di base ed il relativo status al trapianto;
- Regime di condizionamento ed intensità di questo, secondo i criteri di Bacigalupo¹⁸;
- Caratteristiche del donatore, compatibilità HLA, fonte delle CSE (midollo osseo BM, cellule staminali periferiche PBSC, sangue cordonale);
- variabili terapeutiche, quali: la profilassi utilizzata per evitare l'occorrenza di GVHD.

3.2 LA FASE POST-TRAPIANTO

Nella fase post-trapianto, intesa come il periodo che intercorre dal giorno 0 dopo l'infusione di CSE al 100° giorno (+100) post-trapianto, sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- Comparsa di complicanze gastroenterologiche acute, identificate tramite criteri clinici/strumentali/laboratoristici e/o istologici. Il work up diagnostico effettuato, in pazienti sintomatici era basato su:
 - Esofagogastroduodenoscopia (EGDS), eseguita nei casi di persistenti (>5-7 giorni) manifestazioni digestive definite "alte". Il test era considerato positivo ed

eventualmente sospetto per GVHD acuta gastro-duodenale (analizzando il contesto clinico), qualora fossero state rilevate le seguenti lesioni: edema/iperemia da moderate a severe, e/o erosioni/ulcerazioni e/o disepitelizzazione-atrofia della mucosa.

- Retto-sigmoido-colonscopia, eseguita ai pazienti con manifestazioni intestinali (in particolare diarrea persistente, ematochezia); anche in questo caso il test veniva considerato positivo o sospetto nel caso si fossero riscontrate le suddette alterazioni.
- Esame istologico di biopsie endoscopiche, dopo allestimento di sezioni paraffinate sottoposte a colorazioni cito-istologiche standard o sofisticate a seconda del caso clinico mediante il ricorso a tecniche di immuno-istochimica (IHC) per ricerca di cito-inclusi e patogeni.
- Coproculture mirate alla ricerca di patogeni batterici (*Clostridium Difficile*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *E.Coli* enteropatogeno), virali (CMV, adenovirus, rotavirus, norovirus, herpes virus) e parassitari (*Giardia* e *Cryptosporidium*); spesso corredato da esame chimico-fisico delle feci e dosaggio di calprotectina fecale.
- Esami ematochimici, comprendenti test di funzionalità epatica e pancreatica.

Pertanto, ai pazienti sintomatici che venivano sottoposti alle indagini suddette ed in virtù dell'andamento clinico, venivano identificati i seguenti quadri gastroenterologici, ossia:

- *Mucosite delle vie digestive superiori*, in particolare quelli affetti da manifestazioni più severe, classificabili con il grado 3-4 secondo i criteri OMS²⁹;
- *Mucosite delle vie digestive inferiori*: anche in questo contesto, venivano considerate quelle gravi e durature nel tempo quindi analogamente indagate mediante endoscopia ed esami microbiologici;
- *Complicanze infettive*, comprendenti quadri di origine batterica, virale e parassitaria; evidenziabili tramite coprocultura-parassitologico e nei casi dubbi endoscopia con biopsie intestinali;
- *Complicanze di natura vascolare*, ad esempio quadri di emorragia digestiva, o sospetti per ischemia intestinale;
- *GVHD acuta gastrointestinale*: “upper”, “intestinale” o “mista” nel caso di manifestazioni diffuse o generalizzate del tubo digerente. La diagnosi veniva confermata da criteri clinici, tuttavia spesso si rendeva necessaria un'indagine endoscopica/bioptica nei casi di difficile diagnosi differenziale o sospette cause concomitanti.

3.4 ANALISI STATISTICA

Nell'analisi descrittiva, abbiamo utilizzato la media (deviazione standard) per le variabili continue a distribuzione parametrica e la mediana (valore minimo-massimo) per quelle a distribuzione non parametrica. Le variabili categoriche sono state espresse come frequenza (%) dei casi. Le differenze sono state calcolate usando il test "*T di Student*" per le variabili continue parametriche, il test di "*Mann-Whitney*" per quelle continue non parametriche; invece è stato computato il test del "*K-square*" per il confronto tra le variabili categoriali.

Per ricercare tutte le possibili associazioni tra le variabili di studio (variabili di outcome o dipendenti) con le altre, abbiamo eseguito una analisi bivariata mediante matrice di correlazione, utilizzando il test "*Rho di Spearman*". Quindi le correlazioni risultate statisticamente significative, sono state computate con una multivariata mediante *regressione logistica binaria*. Le covariate inserite in analisi sono state sottoposte ad un processo di selezione diretta anteriore "*step-up o forward selection process*". Al termine dell'analisi sono state considerate come significative le associazioni tra variabili con $p < 0.05$.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante pacchetto Excel Microsoft[®], SPSS versione 25[®] (SPSS. Inc. Chicago, IL) e GraphPad-Prism ver.8[®].

3.5 ETICA

Lo studio è stato gestito in accordo con i principi di buona pratica clinica secondo la dichiarazione di Helsinki.

Risultati

4.1 CARATTERISTICHE DELLA COORTE

Le caratteristiche globali della coorte sono riassunte nella tabella 1. In particolare, l'età mediana era di 58 anni con prevalenza di maschi (57,3%). Le principali emopatie che necessitavano il trapianto erano: la leucemia acuta mieloide (LAM) in 63 pazienti (51.6%), i linfomi in 17 pazienti (13.9%), le sindromi mieloproliferative (SMP) in 16 (13.1%), la leucemia acuta linfoide in 12 (9.8%), sindromi mielodisplastiche (SMD) in 6 (4.9), il mieloma multiplo (MM) in 4 (3.3), infine l'anemia aplastica (AA) e la leucemia linfatica cronica in 4 pazienti in toto. La stima del rischio di mortalità non associato a recidiva della malattia di base ed in funzione delle preesistenti comorbidità, calcolato sec. *Sorror risk score*, risultava significativo (>3) in 44 pazienti (36%). Un donatore *sibling* era assicurato a 34 pazienti (28%) ed analogamente un graft aploidentico era disponibile per altri 34 soggetti; di contro un graft parzialmente compatibile (donatori HLA-*unrelated*) era disponibile per i restanti 54 pazienti (44.3%). Una incompatibilità AB0 era registrata in 21 pazienti (17%). Relativamente alla fonte di provenienza delle cellule staminali, queste derivavano prevalentemente dal sangue periferico (56,5%) e dal midollo osseo (39%), quindi miste nel 4%. Un regime di condizionamento mieloablativo completo (MAC) era applicato ad 85 pazienti (70%), un regime ridotto a 28 (23%) e l'irradiazione total body in 10 pazienti (8,2%) che peraltro avevano già ricevuto un MAC. Gli schemi di profilassi della GVHD adottati sono mostrati nel dettaglio in tabella 1.

4.2 COMPLICANZE GASTRO-INTESTINALI ED EPATICHE

Problematiche gastro-intestinali ed epatiche, entro 100 giorni dal trapianto di CSE, si verificavano in 94 pazienti (77% del totale dei trapiantati). Tali problematiche, spesso, insistevano sullo stesso paziente in tempi diversi nel corso del monitoraggio peri-post trapiantologico, oppure si verificavano contemporaneamente (co-eziologie). La mucosite rappresentava la complicanza più frequentemente riportata, in particolare a livello delle alte vie digestive (79 pazienti, 84%). Le alterazioni della funzione epatica venivano registrate anche in un significativo numero di pazienti (84, 89%), la SOS/VOD in 14 casi (15%). Una diagnosi di diarrea infettiva era diagnosticata in 8 pazienti, di cui 3 casi dovuti a C.Difficile e 2 da CMV. La diagnosi di GVHD gastro-intestinale veniva formulata, in 35 pazienti. In

particolare, una GVHD acuta “upper” si diagnosticava in 3 pazienti (3.2%), una forma “intestinale” in 21 (22.3%) mentre una malattia “diffusa” in 11 pazienti (11.7%). I pazienti con manifestazioni più gravi (grado ≥ 2), erano 19 (20.2%).

La mortalità indicata nella tabella 2, in associazione alle varie complicanze gastro-intestinali sviluppate dai pazienti, è da considerare come esito causato direttamente o come processo contributivo operato dalla problematica gastro-intestinale precedente. I casi di pazienti con mucosite esitavano in exitus fino al 20% circa del totale. Risultava bassa la mortalità registrata per i pazienti con alterazione della funzionalità epatica (6%). Di contro, i pazienti con GVHD in particolare nella forma intestinale e/o diffusa, morivano fino ad oltre il 60% dei casi. Analogamente accadeva per i pazienti con diarrea infettiva (63% di exitus). I più alti tassi di mortalità, infine si verificavano tra i pazienti che sviluppavano emorragia digestiva e SOS/VOD (>70% dei casi). (tabella 2).

4.3 LA GVHD: ANALISI DELLE VARIABILI ASSOCIATE ALLA DIAGNOSI E ALLA SEVERITÀ

Nella tabella n.3, i dati anagrafici, clinici-anamnestici e terapeutici dei pazienti sono distinti nei sottogruppi relativi alla presenza ed ai vari gradi di manifestazione di GVHD in accordo a EBMT score. Quindi sono state analizzate le differenze confrontando le variabili dei pazienti con e senza GVHD gastro-intestinale. Come riportato, non emergevano differenze significative tra le variabili indagate ad eccezione del grado di chimerismo (<95%) e della sopravvivenza a 12 mesi, risultate condizioni meno frequenti ($P < 0.05$) nei pazienti affetti da GI-GVHD.

4.4 LA GVHD ACUTA GASTROINTESTINALE

aGVHD gastro-duodenale: risultati dell’analisi multivariata

Nel tentativo di realizzare un’analisi più accurata dei possibili fattori di rischio per lo sviluppo di aGVHD gastro-duodenale, è stata condotta un’analisi uni e multivariata, integrando anche altre variabili più tecniche. In questo contesto, emergeva che l’utilizzo di antibiotici (penicilline e carbapenemici), il più basso livello di immunosoppressione post trapianto e lo sviluppo di micro-angiopatia trombotica (TMA), risultavano associate ad un

maggior rischio di sviluppo di aGVHD “*upper*” con un odds ratio (OR) di 4.9 per i pazienti trattati con penicilline nel periodo post trapianto, quindi OR di 4.3 e di 3.4 rispettivamente, per pazienti con TMA e con bassi livelli di immunosoppressore. (Tabella 4)

aGVHD intestinale: risultati dell’analisi multivariata

Relativamente al rischio di sviluppo di aGVHD ad estrinsecazione “*intestinale*”, la colonizzazione rettale con germi multiresistenti (OR= 7.5), il basso livello di immunosoppressore (OR=13) ed ancora la TMA (OR=6.7), emergevano come variabili indipendentemente correlate allo sviluppo di GVHD.

4.5 FATTORI DI RISCHIO DI MORTALITÀ A 12 MESI DAL TRAPIANTO

Indagando i fattori di rischio di mortalità nella nostra coorte di pazienti, dall’analisi di regressione logistica binaria, emergeva che: l’intensità del condizionamento mieloablativo, la fonte di CSE (da midollo osseo), lo stadio elevato di GVHD e lo sviluppo di GVHD cronica, erano tutte condizioni associate indipendentemente alla maggiore probabilità di morte a 12 mesi dal trapianto. Tra queste la GVHD acuta di alto grado emergeva come la variabile più impattante sulla prognosi infausta, con un OR di 63.5. (Tabella 6)

4.6 ATTENDIBILITÀ DIAGNOSTICA DELLE PROCEDURE ENDOSCOPICHE

Infine, abbiamo calcolato le misure di operatività e/o di attendibilità delle procedure diagnostiche ed istologiche relativamente alla diagnosi “*a posteriori*” di aGVHD gastro-intestinale. Ebbene, l’EGDS presentava una sensibilità e VPN assoluti, ma una scarsa specificità e quindi un basso VPP; la concordanza risultava modesta con lo standard diagnostico utilizzato. La valutazione istologica di biopsie “*upper*” migliorava la specificità mantenendo tuttavia una concordanza moderata con lo standard diagnostico. Lo studio endoscopico “*intestinale*” presentava una buona sensibilità ed una specificità e VPP assoluti, pur tuttavia presentava una concordanza ancora moderata. Solo l’istologia intestinale, in conclusione, raggiungeva un livello di concordanza “buona” con la diagnosi “*a posteriori*” di aGVHD-GI (Tabella 7).

Tabella 1. Caratteristiche della coorte di 122 pazienti sottoposti al trapianto di CSE.

	Totale (n=122)
Età al trapianto, mediana (range)	58 (20-71)
Maschi, n (%)	70 (57.3)
Emopatia di base	
• Leucemia Acuta Mieloide	63 (51.6)
• Leucemia Acuta Linfoide	12 (9.8)
• Linfomi	17 (13.9)
• Sindromi Mielodisplastiche	6 (4.9)
• Sindromi Mieloproliferative	16 (13.1)
• Mieloma Multiplo	4 (3.3)
• Anemia Aplastica	2 (1.6)
• Leucemia Linfatica Cronica	2 (1.6)
Sorrow Risk score, n. (%) ≥ 3	44 (36.1)
Compatibilità del donatore, n (%)	
Donatore <i>sibling</i>	34 (27.9)
Donatore aploidentico	34 (27.9)
• Unrelated Donor $\geq 8/8$	40 (32.7)
• Unrelated Donor $< 8/8$	14 (11.5)
Fonte delle CSE, n (%)	
• PBSC	69 (56.5)
• BM	48 (39.4)
• PBMC+BM	5 (4)
Incompatibilità maggiore AB0, n (%)	21 (17.2)
Intensità del regime di condizionamento	
• MAC	85 (69.6)
• RIC	28 (23)
• TBI	10 (8.2)
GVHD profilassi, n (%)	
• CsA/FK506+MTX	76 (62.3)
• CsA/FK506 + ptCy	45 (36.7)
• CsA + MMF	1 (0.8)

Abbreviazioni: CSE, cellule staminali emopoietiche; PBSC, peripheral blood stem cells; BM, bone marrow; MAC, condizionamento mielo-ablativo completo; RIC, condizionamento di intensità ridotta; TBI, total body irradiation; CsA, Cyclosporine A; FK506, tacrolimus; MTX, methotrexate; ptCy: post-transplant cyclophosphamide; MMF, micophenolate mofetyl.

Tabella 2. Complicanze gastro-intestinali ed epatiche insorte entro 100 gg dal trapianto di CSE

	n=94 (77%)	Mortalità n=57(60.6%)
Mucosite delle alte vie digestive, n (%)	79 (84.0)	11 (13.9)
Mucosite delle basse vie, n (%)	45 (47.8)	10 (22.2)
Emorragia digestiva	7 (7.4)	5 (71.4)
Diarrea infettiva, n (%)	8 (8.5)	5 (62.5)
• Clostridium Difficile	3	2
• CMV	2	1
• Non definita	3	2
Coinvolgimento epatico	84 (89.4)	5 (5.9)
SOS/VOD, n (%)	14 (14.9)	12 (85.7)
aGVHD GI, n (%)	35 (37.2)	17 (48.6)
• Upper isolata	3 (3.2)	0
• Intestinale isolata	21 (22.3)	10 (47.6)
• diffusa	11 (11.7)	7 (63.6)
aGVHD-GI >2	19 (20.2)	11 (57.9)

Abbreviazioni: SOS, Sinusoidal Obstruction Syndrome; VOD, Veno-Occlusive Disease.

Tabella 3. Caratteristiche dei pazienti con diversi gradi di aGVHD-GI.

Caratteristiche dei pazienti	No GVHD (n=49)	Grado 2 (n=29)		Grado 3- 4 (n=14)	GI- GVHD >2 (n=19)	P (no GI- GVHD vs GI- GVHD)
		2A (n=13)	2B (n=16)			
Età al trapianto, mediana (range)	56 (30-69)	51 (26-71)	54 (26-70)	58 (47-66)	59 (20-71)	n.s.
Maschi, n (%)	28 (23)	6 (4.9)	12 (9.8)	7 (5.7)	11 (8)	n.s.
Emopatia di base						n.s.
• Leucemia acuta	29 (23.8)	9 (7.4)	11 (9)	7 (5.7)	10	
• Linfoma	7 (5.7)	2 (1.6)	1 (0.8)	5 (4.1)	5	
• Sindrome Mielodisplastica	1 (0.8)	1 (0.8)	1 (0.8)	6 (4.8)	2	
• Sindromi mieloproliferative	8 (6.6)	1 (0.8)	3 (2.4)	0	2	
• Mieloma Multiplo	3 (2.4)	0	0	0	0	
• Anemia Aplastica	1 (0.8)	0	0	1 (0.8)	0	
Sorrow Risk score, n. (%) ≥ 3	24 (19.8)	4 (3.3)	3 (2.4)	3 (2.4)	4	n.s.
Intensità del regime di condizionamento						n.s.
• MAC	33 (27)	10 (8.2)	10 (8.2)	10 (8.2)	0	
• RIC	14 (11.5)	3 (2.4)	4 (3.3)	2 (1.6)	13	
• TBI	4 (3.3.)	1 (0.8)	2 (1.6)	2 (1.6)	2	
Compatibilità del donatore, n (%)						n.s.
• Donatore HLA compatibile	20 (16.4)	4 (3.3)	2 (1.6)	1 (0.8)	6	
• UD >8/8	13 (10.6)	7 (5.7)	4 (3.3)	6 (4.9)	5	
• UD <8/8	4 (3.3)	1 (0.8)	2 (1.6)	3 (2.4)	5	
Donatore aploidentico	12 (9.8)	1 (0.8)	8 (6.5)	4 (3.3)	3	
Fonte delle CSE, n (%)						n.s.
• PBSC	31 (25.4)	9 (7.4)	6 (4.9)	9 (7.4)	10	
• BM	17 (13.9)	3 (2.4)	9 (7.4)	4 (3.2)	9	
• PBMC+BM	1 (0.8)	1 (0.8)	1 (0.8)	1 (0.8)	0	
Chimerismo intero <95%	23				2	0.001
Incompatibilità maggiore AB0, n (%)	7 (5.7)	3 (2.4)	3 (2.4)	2 (1.6)	5	
GVHD profilassi, n (%)						n.s.

• CsA/FK506+MTX	34 (27.9)	11 (9)	6 (4.9)	8 (6.5)	12	
• CsA/FK506 + ptCy	14 (11.5)	2 (1.6)	10 (8.2)	6 (4.8)	7	
• CsA + MMF	1 (0.8)	0	0	0	0	
Terapia antibiotica ongoing	4 (3.3)	7 (5.7)	4 (3.3)	3 (2.4)	5 (4.1)	n.s.
Sopravvivenza 12 mesi (n=89)	32	13	10	7	10	0.03

Abbreviazioni: MAC, condizionamento mielo-ablativo completo; RIC, condizionamento di intensità ridotta; TBI, total body irradiation; PBSC, peripheral blood stem cells; BM, bone marrow; CsA, CyclosporineA; FK506, tacrolimus; MTX, methotrexate; ptCy: post-transplant cyclophosphamide; MMF, micophenolate mofetyl; GVHD, graft-versus-host disease

Tabella 4. Analisi univariata e multivariata per aGVHD-GI “upper-diffusa”.

Variabile	P	OR [CI 95%]	P	OR [CI 95%]
Penicilline post-trapianto	0.019	4,67 [1.29-16.91]	0.02	4.91 [1.27-18.94]
Penicilline post-trapianto > 14 giorni	0.018	2.95 [1.21-7.21]	0.954	0.96 [0.28-3.36]
Meropenem post-trapianto	0.043	3.03 [1.04-8.87]	0.12	0.18 [0.05-0.68]
Valore basso di immunosoppressore	0.011	3.53 [1.33-9.33]	0.02	3.40 [1.17-9.86]
TMA	0.018	3.41 [1.23-9.45]	0.03	4,26 [1,11-16,39]

Abbreviazioni: TMA, microangiopatia trombotica post-trapianto

Tabella 5. Analisi univariata e multivariata per aGVHD-GI “*intestinale*”.

Variabile	P	OR [CI 95%]	P	OR [CI 95%]
Tamponi di sorveglianza post-trapianto positivi per germi MDR	0.04	3.52 [1.01-12.30]	0.01	7.52 [1.52-37.29]
Voriconazolo-Isavuconazolo post-trapianto	0.04	4.10 [1.01-16.54]	0.26	2.52 [0.50-12.74]
Valore basso di immunosoppressore	0.004	20.21 [2.56-159.31]	0.02	13.12 [1.56-109.97]
TMA	0.002	6.06 [1.93-19.01]	0.008	6.76 [7.63-28.02]

Abbreviazioni: MDR, multi-drug-resistant; TMA, microangiopatia trombotica post-trapianto

Tabella 6. Analisi di regressione logistica binaria (stepwise in avanti) per l’associazione con la variabile: *mortalità a 12 mesi dal trapianto*

variabile	B	S.E.	P	Exp (B)	95% IC per Exp (B)
Intensità del condizionamento MAC	2.21	0.88	0.01	9.16	1.64-51.22
Sorgente di CS da BM	-2.18	0.88	0.01	0.11	0.02-0.64
Stadio GVHD 4	4.15	1.64	0.01	63.5	2.57-1569.62
Chronic-GVHD	-2.37	1.06	0.02	0.09	0.01-7.81

Analisi corretta per le seguenti variabili risultate correlate all’univariata, con la variabile dipendente: età al trapianto, immunità per CMV, sovraccarico marziale, Sorrow risk, TBI, piattaforma Haplo, profilassi per GVHD, ATG, GVHD multiorgano, coinvolgimento epatico, terapia ATB.

Tabella 7. Misure di attendibilità della valutazione endoluminale endoscopica ed istologica per la diagnosi “*a posteriori*” di aGVHD-GI.

	Sensibilità	Specificità	VPP	VPN	K	Concordanza
EGDS	1.0 (0.8-1.0)	0.3 (0.1-0.5)	0.4 (0.2-0.6)	1.0 (0.8-1.0)	0.24	scarsa
Istologia “upper”	0.6 (0.4-0.8)	0.7 (0.6-0.9)	0.6 (0.4-0.7)	0.8 (0.6-0.9)	0.42	moderata
Retto/colonscopia	0.8 (0.5-0.9)	1.0 (0.7-1.0)	1.0 (0.8-1.0)	0.5 (0.3-0.7)	0.56	moderata
Istologia “intestinale”	0.8 (0.6-0.9)	1.0 (0.8-1.0)	1.0 (0.8-1.0)	0.6 (0.3-0.8)	0.68	buona

Abbreviazioni e legenda: (IC 95%); K di Cohen: <0.01 = nulla; 0.01-0.20 = scarsa; 0.21-0.40 = modesta; 0.41-0.60 = moderata; 0.61-0.80 = buona; 0.81-1.00 = eccellente

Discussione

Le complicanze a carico dell'apparato digerente sono frequenti e fortemente impattanti sulla prognosi dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di CSE. Questo dato, già noto dalle casistiche riportate in letteratura, è chiaramente confermato dalla nostra esperienza. Questa esperienza locale rappresenta il risultato di un percorso di condivisione "virtuoso" tra le unità di ematologia e gastroenterologia con la creazione di un percorso diagnostico-terapeutico, appunto definito "*emato-gastro*". Questa realtà operativa garantisce con solerzia, la presa in carico e la gestione del paziente trapiantato che sviluppa problematiche gastro-intestinali ed epatiche.

In dettaglio, le mucositi rappresentano la complicanza in assoluto più frequente, a livello delle alte vie digestive, specialmente se si considerano le manifestazioni orali che nei pazienti trapiantati sono presenti fino al 75% dei casi con un grado severo (grado III-IV). Questo dato è simile a quello riportato nella nostra casistica che considera anche le forme moderate. Le mucositi intestinali sono, in genere, meno indagate data la necessità di dover ricorrere a strumenti invasivi per diagnosticarle, e l'utilizzo di marcatori surrogati (diarrea post condizionamento) genera facilmente errori interpretativi. La mortalità tra i pazienti con mucosite moderata-severa, raggiungeva tassi del 22% circa, prevalentemente per la localizzazione intestinale. Le cause di mortalità, piuttosto precoci, in questi pazienti erano rappresentate da complicanze infettive generalizzate che portavano allo shock settico e/o MOF. Questo dato conferma l'acquisizione nota, che la mucosite severa può contribuire allo sviluppo di infezioni generalizzate e fatali in pazienti "fragili".

La seconda problematica in termini di frequenza, registrata nella nostra casistica è l'alterazione della funzionalità epatica. Con questa definizione, abbiamo considerato genericamente tutti i casi che manifestavano un danno epatico acuto significativo (>5 volte il limite superiore ULN di transaminasi) ma in assenza di una reale compromissione della funzione d'organo. La frequenza di epatotossicità di grado lieve-moderato, come accennato prima, è frequente in questo ambito clinico e generalmente reversibile dopo aggiustamento terapeutico. Infatti, tra questi pazienti solo 5 di 84 (6%) aveva una progressione clinica verso l'exitus. Ciò si verificava in pazienti nei quali l'alterazione della funzione epatica si inseriva in un contesto clinico di insufficienza pluriorgano dove la problematica cardio-respiratoria o renale erano preponderanti sulla prognosi. Diversamente si verificava quando si sviluppava la SOS/VOD; infatti tra i 14 pazienti con questa problematica 12 morivano (86%). Dai dati pubblicati, si evince una grande variabilità di incidenza di SOS/VOD nelle varie casistiche; è certamente influenzata dal regime di condizionamento in termini di composizione e di

intensità (ciclofosfamide, busulfano, TBI), ma anche da fattori meno controllabili o prevedibili come la suscettibilità genetica del paziente verso reazioni di epatotossicità. In ogni caso, questa condizione è uno degli eventi post trapianto più temibili.

In letteratura è più spesso riportata un'incidenza dal 13% al 40% di diarrea su base infettiva ed in particolare da *Clostridium Difficile* (CD), infezione che insiste nel 15-30% dei casi. Nella nostra casistica, l'incidenza di diarrea su base infettiva si registrava solo in 8 pazienti (8,5%) e l'agente patogeno veniva rilevato in 5 casi (CD in 3 e CMV in 2 pazienti). L'infezione intestinale, si associava ad un'alta mortalità; infatti 5 pazienti morivano per ulteriori complicazioni settiche da eventi infettivi "a cascata". Un risultato analogo è comunque riportato da MGJ Van Kraaij e collaboratori⁴⁵ che attribuiscono una causa infettiva al 6% dei casi di diarrea acuta nel post trapianto. Inoltre, questi autori, sottolineavano come la presenza di virus al tampone rettale era trovata prevalentemente in pazienti asintomatici; rare risultavano, infine le infezioni da *Campylobacter* e quelle di origine parassitarie.

La GVHD con coinvolgimento gastro-intestinale, esordita entro i primi 100 gg dall'infusione di CSE, si registrava in 35 pazienti (37,2%) con una mortalità associata di circa il 50%. La forma "upper" isolata, piuttosto rara, aveva un andamento benigno; di contro la maggior parte dei pazienti sviluppava una forma intestinale o diffusa di GVHD con interessamento generalizzato del tubo digerente. Queste avevano un decorso clinico più severo con un elevato tasso di mortalità (64% per la forma diffusa). Tali dati confermano quelli riportati in letteratura⁵³.

Dall'analisi multivariata, formulata per ricercare possibili fattori di rischio per lo sviluppo di GVHD gastro-intestinale, l'uso di antibiotici, un basso livello di immunosoppressione e la microangiopatia trombotica (TMA) risultavano indipendentemente associati. In particolare, l'uso di penicilline ad ampio spettro è un dato che si dimostra in linea con quanto emerso da numerosi studi che vedono nelle modificazioni del microbiota intestinale uno dei principali fattori predisponenti lo sviluppo della GVHD. Staffas² e Malard¹⁰ hanno notato come gli antibiotici ad ampio spettro (ad esempio la piperacillina-tazobactam) modifichino il microbiota intestinale con la perdita di *Clostridiales*, specie produttrici di SCFAs. Questi esplicano un effetto protettivo (trofico ed energetico) sull'epitelio intestinale; la maggiore fragilità della barriera muco-epiteliale, il danno alla mucosa con conseguente patologica permeabilità, favorisce la traslocazione batterica con passaggio di PAMPs. Da ciò deriva l'attivazione del sistema immune locale e dei sistemi di risposta immune che autoalimenta la condizione prodromica per lo sviluppo della GVHD². La TMA, come dimostrato da ricerche precedenti spesso coesiste con la GVHD. Infatti, Yamada

e collaboratori⁵⁴ nel loro studio condotto su 19 pazienti identificavano questa co-eziologia in sei soggetti con GVHD intestinale refrattaria alla terapia e con andamento severo. È ipotizzabile che le due condizioni condividano un substrato fisiopatologico comune e precisamente la tossicità da condizionamento. Infatti, più profondo e pesante è il regime di condizionamento mielo-ablativo utilizzato (ad esempio MAC-TBI) e più sarà necessaria un'immunosoppressione capace di ridurre la probabilità di GVHD. Pertanto, da un lato si avrebbe l'alterazione dell'integrità della barriera muco-epiteliale da tossicità, dall'altro il danno endoteliale indotto, ad esempio, da tacrolimus/ciclosporina adeguatamente dosati per la profilassi della GVHD. Infatti, la presenza di uno stato iper-infiammatorio nella TMA giustificerebbe tale ipotesi così come il dato che gli inibitori della calcineurina sono coinvolti nella patogenesi della TMA, attraverso una riduzione dei livelli di prostaciclina e di ossido nitrico e un aumento dei livelli di trombossano A2 e di endotelina. La riduzione del dosaggio di questi farmaci o la sostituzione con altre molecole, rappresenta il primo step per la gestione standard della TMA e spesso, comporta un miglioramento dei sintomi nei pazienti con localizzazione intestinale di tale quadro clinico⁵⁵.

Dalla nostra analisi sui fattori di rischio per lo sviluppo di GVHD a localizzazione esclusivamente intestinale, ancora la TMA e l'immunosoppressione a basso titolo emergono come associati indipendentemente, a conferma della bontà della precedente analisi. Altresì, emerge come significativa, la positività per germi MDR (multi-drug resistant) al tampone rettale di sorveglianza. I nostri pazienti con un tampone positivo per MDR erano precisamente 50 e tra questi 25 morivano entro 2 anni dal trapianto, 10 di loro per shock settico. La colonizzazione rettale aumenta il rischio di aGVHD intestinale di 7,5 volte. In letteratura sono presenti diversi lavori che supportano l'associazione tra MDR e rischio di aGVHD. Patriarca e collaboratori⁵⁶ evidenziavano un aumento della mortalità in pazienti colonizzati da batteri MDR ma non una significativa differenza di incidenza e severità di aGVHD rispetto ai pazienti non colonizzati. Al contrario Bilinski e collaboratori⁵⁷ riportavano l'associazione tra *microbiota disruption* e colonizzazione da MDR, condizione indagata mediante sequenziamento genico (16s RNA pyrosequencing). Pertanto, gli autori ipotizzavano un aumento del rischio di mortalità, sia non-correlata che correlata al trapianto (aGVHD di grado moderato-severo) in pazienti con alterazione del microbiota e conseguente colonizzazione da MDR. Infatti, nella loro casistica, la aGVHD intestinale si verificava 2 volte più frequentemente tra i pazienti colonizzati e la sopravvivenza globale risultava significativamente ridotta in pazienti colonizzati anche in assenza di GVHD, per un maggiore sviluppo di sepsi. Pertanto, gli autori proponevano delle strategie di decolonizzazione attraverso il trapianto fecale. Malard¹⁰, Battipaglia e collaboratori⁵⁸ analizzavano i benefici

apportati dal trapianto fecale, in questa categoria di pazienti. Riuscivano a contrastare la disbiosi ed a recuperare la ricchezza della flora batterica. In diversi pazienti colonizzati da MDR, il trapianto fecale riusciva ad ottenere una decolonizzazione duratura; tra i pazienti anche affetti da GVHD, una riduzione della severità del quadro intestinale. Diversi trial sono attualmente in corso per esplorare l'efficacia terapeutica del trapianto fecale in vari setting clinici compresa la GVHD refrattaria. Quindi, le future prospettive terapeutiche, probabilmente considereranno tale strategia.

Abbiamo anche analizzato le variabili associate all'outcome più rilevante, cioè la mortalità ad 1 anno. La GVHD persistente con tendenza alla cronicizzazione, la fonte midollare di CSE, la GVHD acuta in stadio 4 e l'intensità del regime di condizionamento mieloablativo risultano come indipendentemente associati all'outcome. In particolare la GVHD severa, e l'intensità del condizionamento MAC emergono come le condizioni più impattanti sulla mortalità nel post-trapianto. Aoudjhane e collaboratori⁵⁹ confrontavano l'outcome tra pazienti trattati con regime a ridotta intensità rispetto a quelli trattati con regime mieloablativo; confermavano una più bassa mortalità tra i pazienti sottoposti a RIC, sebbene questi soffrivano di una più alta probabilità di recidiva della malattia di base. La mortalità era strettamente correlata all'incidenza di aGVHD di grado moderato-severo in pazienti sottoposti a MAC. Nakasone e collaboratori¹⁹ si concentravano sull'effetto della TBI sull'outcome: dai risultati emergeva che la TBI si associava ad un rischio significativo di sviluppo della aGVHD gastro-intestinale di grado moderato-severo. Nella nostra coorte di pazienti è stata impiegata la TBI su 10 di loro che avevano precedentemente ricevuto un condizionamento di tipo MAC: 5 di questi morivano entro 20 mesi, tuttavia solo 1 paziente aveva sviluppato una GI-GVHD. L'impatto che la TBI produce realmente sul determinismo della GVHD e, di conseguenza sulla prognosi, deve essere ancora meglio investigato dato che vi sono risultati contrastanti e molteplici variabili confondenti (caratteristiche immunofenotipiche del donatore). Relativamente al dato di correlazione tra la sorgente di CSE (midollare) e la mortalità, è noto che l'utilizzo di PBSC ha un effetto positivo sulla sopravvivenza rispetto al trapianto di midollo tradizionale, soprattutto se i donatori sono fenoidentici, con un rapido attecchimento e un'incidenza accettabile di GVHD: ne deriva crescente utilizzo preferenziale, quanto possibile. Tuttavia, studi recenti che utilizzano il G-CSF (filgrastim) associato ad utilizzo di CS da midollo, riportano un più rapido engraftment, una ridotta incidenza di GVHD acuta e cronica con tassi di sopravvivenza globale del tutto simili a quelli del trapianto di PBSC⁶⁰⁻⁶¹. La cGVHD, dalle varie casistiche pubblicate, incide principalmente sulla mortalità tardiva con una sopravvivenza dopo 5 anni dalla diagnosi pari al 52%, come riportato da Muñoz e collaboratori¹⁶. In particolare, la prolungata

immunosoppressione necessaria per la gestione della cGVHD implica un aumento di infezioni secondarie (virali e fungine) e di neoplasie ematologiche o solide che si accompagnano ad una maggiore mortalità. Mentre le neoplasie ematologiche insorgono in una fase più precoce della storia clinica della cGVHD, le neoplasie solide hanno un esordio più tardivo e la loro incidenza si accresce nel tempo: perciò potrebbe essere necessario un follow-up più prolungato per valutare meglio questa tipologia di pazienti. Nel nostro caso, abbiamo indagato la mortalità a 12 mesi, pertanto tale condizione era più precisamente riferibile ad una GVHD persistente o ricorrente nel tempo; quindi forme definibili come late-onset/overlap acute → chronic GVHD.

Infine, abbiamo voluto indagare l'accuratezza diagnostica per aGVHD-GI, delle procedure endoscopiche/istologiche, considerando, come standard di riferimento l'accertamento della diagnosi, derivante dalla consapevolezza "a posteriori" di questa; tale approccio lo si potrebbe considerare quasi una prerogativa dell'esperienza di studio retrospettivo. È ovvio che tale diagnosi derivi anche ed in maniera integrante, dall'accertamento endoscopico ed istologico, eseguiti in itinere ai pazienti con sintomatologia suggestiva, tuttavia è stato validato da molte altre acquisizioni cliniche e laboratoristiche che emergevano successivamente. Tra queste: l'andamento clinico, la risposta alla terapia, l'esclusione di altre eziologie, la ripetizione degli esami endoscopici stessi ed in alcuni casi, anche dall'accertamento autoptico.

Da questa analisi, come già accennato, emerge che l'unico test che garantisce una buona concordanza con lo standard diagnostico è rappresentato dall'istologia intestinale. Le sole valutazioni endoscopiche hanno quindi una bassa accuratezza diagnostica, questo è evidente in misura più accentuata nel caso dell'EGDS ($K = 0,24$) che risulta del tutto aspecifica. Da ciò deriva il concetto che le procedure endoscopiche e istologiche sono metodiche complementari e dovrebbero essere sempre integrate quando l'esame venga eseguito per la ricerca di GVHD. Questo aspetto è confermato dai dati presenti in letteratura. Nello studio retrospettivo di Guardado⁶², condotto su pazienti sintomatici sottoposti ad EGDS, i soli esami endoscopici hanno una scarsa validità diagnostica e si accompagnano ad una percentuale alta di falsi positivi e falsi negativi: emblematica di questa casistica è la positività dell'istologia gastro-duodenale nel 45% dei pazienti privi di lesioni macroscopiche all'EGDS. Similmente, Nomura e collaboratori²⁷ diagnosticavano istologicamente la GVHD intestinale nel 75% dei campioni colici e nel 79% dei campioni ileali in pazienti con precedente retto-sigmoidoscopia negativa. Inoltre, in tale studio l'istologia intestinale si confermava l'unico test capace di identificare la GVHD intestinale in più del 90% dei casi

(92% di 186 pazienti con sintomi sospetti). Sebbene, dalla nostra esperienza sia emersa una concordanza scarsa-moderata, rispettivamente dell'EGDS/istologia gastro-duodenale, questi esami dovrebbero essere sempre considerati in pazienti che presentano sintomi "alti" persistenti e refrattari a trattamenti empirici. Tuttavia, tenendo conto dei limiti di questi test, un risultato negativo imporrebbe ulteriori accertamenti con la colonscopia ed il campionamento biotico. Come riportato da Thompson e collaboratori⁶³ l'intestino può essere coinvolto in pazienti con sintomi esclusivamente "alti" (dispepsia, inappetenza senza diarrea), che appunto presentavano un'istologia ileo-colica compatibile con GVHD intestinale.

In conclusione, le manifestazioni gastro-intestinali ed in particolare la aGVHD, sono tra le complicanze più frequenti e temibili in pazienti sottoposti ad allotrapianto di CSE. L'accertamento diagnostico rappresenta un nodo cruciale per il corretto inquadramento in considerazione della complessa diagnostica differenziale.

Pertanto, l'endoscopia e l'esame istologico hanno un ruolo chiave nel work-up diagnostico dei pazienti trapiantati. Occorre, tuttavia ricordare che questa tipologia di pazienti è spesso fragile, quindi è opportuno valutare l'impatto che il risultato diagnostico può produrre sulle scelte terapeutiche e sulla prognosi.

Ringraziamenti

In primis alla Dott.ssa Monica Poiani ed al Prof Attilio Olivieri della Clinica di Ematologia e Trapianti di midollo, i quali hanno condiviso con noi la casistica e le argomentazioni inerenti alle problematiche ematologiche. Altresì, buona parte dell'analisi dei dati, già formulata e presentata dalla Dott.ssa Poiani in occasione della sua tesi di specializzazione, ha rappresentato la base per la nuova analisi includente i casi più recenti.

Al Prof. Antonio Benedetti per la generosa e pronta accettazione della mia proposta di tesi presso la SOD di Clinica di Gastroenterologia e Epatologia da Lui diretta, lavoro ricco di contenuti che mi ha dato la possibilità di costruire un interessante network di dati e risultati che mi auguro possa essere presto pubblicato.

Bibliografia

- 1- JR Passweg, H. Baldomero, GW. Basak et al. European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) - The EBMT activity survey report 2017: a focus on allogeneic HCT for nonmalignant indications and on the use of non-HCT cell therapies. Bone Marrow Transplant. 2019 Feb 6
- 2- Anna Staffas, Marina Burgos da Silva, Marcel RM van den Brink. The intestinal microbiota in allogeneic hematopoietic cell trasplant and graft-versus-host-disease. Blood 23 Feb 2017
- 3-Eric Spierings and Katharina Fleischhauer. Histocompatibility. The EBMT Handbook 2019
- 4-CG Kanakry, Ephraim J.Fuchs, Leo Luznik. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow trasplantation. Nat Rev Clin Oncol. 2016 January; 13(1): 10-24
- 5- L.Gragert, Eapen M, Williams E, et al. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell in the U.S registry. N Engl Med 2014; 371: 339-48
- 6- C.Sauter and J.N Barker. Unrelated donor umbelical cord blood transplantation for the treatment of hematologic malignancies. Curr Opin Hematol 2008; 15 (6): 568-75
- 7- T. Ruutu, A. Gratwohl, T. de Witte et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. Bone Marrow Transplantation (2014) 168-173
- 8- Mohamad Mothy, A. Bacigalupo, F.Saliba et al. New direction for rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin ®) in solid organ transplant, stem cell transplants and autoimmunity. Drugs (2014) 74: 1605-34
- 9- A.M Raiola, A.Dominietto, A.Ghiso et al. Unmanipulated Japloidentical Bone Marrow trasplantation and posttrasplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. Biol Blood Marrow Transplant. 2013 Jan; 19 (1); 117-22
- 10- F.Malard, C.Gasc, E. Plantamura et al- High gastrointestinal microbial diversity and clinical outcome in graft-versus-host disease patients. Bone Marrow Transplantation (2018) 53: 1493-97
- 11-C. Mackall, T Fry, R Gross et al. Background to hematopoietic cell transplantation, including post trasplant immune recovery. Bone Marrow Transplantation (2009) 44, 457-62
- 12-Rohtesh S. Metha, K. Rezvani. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. Virulence (2016) 8, 901-16
- 13- Grzegorz W.Basak. Gastrointestinal complications. The EBMT handbook 2019
- 14-E. Atilla, P.A Atilla, G.C Seval et al. Current approach to early gastrointestinal and liver complications of hematopoietic stem cell transplantation. Turk J Gastroenterol 2019; 30(2): 122-31
- 15- CC Baker, RA Anderson, RS Sauve and JD Butzner. GI complications in pediatric patients post-BMT. Bone Marrow Transplantation (2005) 36, 51-58

- 16- MM-Muñoz, JV. Bagán, Y.Jiménez et al. Graft versus-host disease affecting oral cavity. A review. *J Clin Exp Dent*. 2015 7(1): e1 38-45
- 17- J.Magenau, Lyndsey Runaas, Pavan Reddy. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology* 2016, 173, 190-205
- 18- A. Bacigalupo, K. Ballen, D.Rizzo et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* (2009); 15(12): 1628-33
- 19- H.Nakasone, T Fukuda, J Kanda et al. Impact of conditioning intensity and TBI on acute GVHD after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (2015) 50, 559-65
- 20- Fiona L.Dignan, A. Clark, Peris Amrolia et al. Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology* 2012
- 21-H.M Schoemans, S.J. Lee, J.L Ferrara et al. EBMT-NIH-CIBMTR Task force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-host disease assessment. *Bone Marrow Transplantation* (2018) 53: 1401-15
- 22- George B. Mc Donald. How I treat acute graft versus host disease of the gastrointestinal tract and the liver. *Blood* 2016; 127 (12): 1544-50
- 23-P. Rodriguez-Otero, R.Porcher, R.P de Latour et al. Fecal calprotectin and alpha-1 antitrypsin predict severity and response to corticosteroids in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 2012; 119 (24): 5909-17
- 24-A.H. Filipovich, D. Weisdorf, S. Pavletic 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. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2005) 11: 945-55
- 25- K.Endo, F. Fujishima, M. Kuroha et al. Effective and less invasive diagnostic strategy for gastrointestinal GVHD. *Endoscopy International Open* 2018, 06: E281-291
- 26- L.R Borges, E. E. Vilela, M. de Lourdes A Ferrari et al. Diagnosis of acute graft-versus-host disease in the gastrointestinal tract of patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. A descriptive and critical study of diagnostic tests. *Hematol Transfus Cell Ther* 2019, 07-002
- 27- K.Nomura, T. Iizuka, D. Kaji et al. Utility of Endoscopic Examination in the diagnosis of acute Graft-versus-Host Disease in the lower gastrointestinal tract. *Gastroenterology Research and Practice* 2017, 2145986
- 28- S. Ohwanda, Tomoya. Iida, G.Sudo et al. Clinicopathological comparison between acute gastrointestinal graft-versus-host disease and infectious colitis in patients after hematopoietic stem cell transplantation. *PLOS ONE* 2018 13(7): e0200627
- 29- D.E Peterson, R.J.Bensadoun, F.Roila. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology* (2011): vi78-vi84
- 30- R.V. Lalla, S.T. Sonis, B.D.S et al- Management of Oral mucositis in patients with cancer. *Dent Clin North Am*. 2008 January; 52(1): 61- VIII

- 31- Douglas E. Peterson, DMD, R.V.Lalla et al. Oral mucositis: the new paradigms. *Curr Opin Oncol.* 2010 July; 22(4): 318-22
- 32- J.Bowen, N.Al-Dasooqi, P.Bossi et al. The pathogenesis of mucositis: updated perspective and emergine targets. *Supportive Care in Cancer* (2019) 27: 4023-33
- 33- J.Wiström, S.Ragnar Norrby, E.B Myhre. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospettive study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2001) 47, 43-50
- 34- C.Högenauer, H.F. Hammer, G.J Krejs. Mechanicism and Management of antibiotic-associated diarrhea. *Clinical Infectious Disease* (1998); 27: 702-10
- 35- Mayer .A David, Dmitrewski,Jan et al. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European tacrolimus multicenter renal study group. 1997; 64: 436-43
- 36- The U.S multicenter FK506 live study group. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression in live transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 1110-15
- 37- Neal M.Davies, J. Grinyò, R. Heading et a.- Gastrointestinal side effects of mycophenolic acid in renal transplant patients: a reappraisal. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2400-48
- 38- M.Mothy, F.Malard, M. Abecassis et al. Revised diagnosis and severity criteria for sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease in adult patients: a new classification from the European society for blood and marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (2016) 51, 906-12
- 39- George B. McDonald, M.D. Hepatobiliary complications of hematopoietic cell transplant, 40 years on. *Hepatology* 2010 April; 51(4): 1450-60.
- 40- Fiona L.Dignan, Robert F. Wynn, N. Hadzic et al. BCSH/ BSBMT guideline: diagnosis and management of veno-occlusive disease (sinusoidal obstruction syndrome) following haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology* 2013, 163, 444-57
- 41- T.Ruutu and Enric Carreras- Hepatic Complications. *The EBMT handbook* 2019
- 42- J.Labrador, L.Lopez Anglada et al. Analysis of incidence, risk factor and clinical outcome of thromboembolic and bleeding events in 431 allogenic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Hematologica* 2013; 98: 437-43
- 43- L.Prochaska, James Vacek, R. Madan et al. Intestinal ischemia following allogenic stem cell transplantation: a report of four cases. *Transplant Proc.* 204 June; 46(5): 1536-39
- 44- J.Labrador, L.Lopez-Corral, L. Vazquez et al. Incidence and risk factors for life-threatening bleeding after allogenic stem cell transplant. *British Journal of Haematology* (2015), 169, 719-25
- 45- MGJ van Kraaij, AW Dekker, LF Verdonck et al. Infectious gastro-enteritis: an uncommon cause of diarrhoea in adult allogenic and autologous stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation* (2000) 26, 299-303

- 46- Melissa A. Kinnebrew, Yeon Joo Lee, R.R Jenq et al. Early *Clostridium difficile* infection during allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS ONE* 2014, 9(3): e90158
- 47- E. Liakopoulou, K. Mutton, D. Carrington et al. Rotavirus as a significant cause of prolonged diarrhoeal illness and morbidity following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (2005) 36, 691-94
- 48- Ren Lin and Qifa Liu. Diagnosis and treatment of viral disease in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Hematology & Oncology* 2013, 6:94
- 49- Masao Ogata, Department of Hematology, Oita University Hospital. Human herpes virus-6 in hematopoietic cell transplantation recipients. *Journal of Hematopoietic Cell Transplantation* (2012), 76-92
- 50- M.Hubmann, S.Fritsch, A.K Zoellner. Occurrence, risk factors and outcome of adenovirus infection in adult recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Clinical Virology* 82 (2016) 33-40
- 51- P Ljungman, P Ribaud, M Eyrich et al. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Disease Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (2003) 31, 481-86
- 52- Wojciech Wolyniec- Malgorzata Sulima, Marcin Renke et al. Parasitic infections associated with unfavourable outcomes in transplant recipients. *Medicina* 2018, 54, 27
- 53- A. P. Scott, Siok-Keen Tey, J. Butler. Diagnostic utility of endoscopy and biopsy in suspected acute gastrointestinal Graft-versus-Host-Disease after Hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 24 (2018) 1294-98
- 54- M.Yamada-Fujiwara, K.Miyamura, T.Fujiwara et al. Diagnosis of intestinal Graft-versus-Host disease and thrombotic microangiopathy after allogeneic stem cell transplantation. *Tohoku J.Exp.Med* (2012), 227, 31-37
- 55- J Khosia, AC Yeh, TR Spitzer et al- Haematopoietic stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy: current paradigm and novel therapies. *Bone Marrow Transplantation* (2018), 53, 129-137
- 56 -F.Patriarca, C.Cigana, D.Massimo et al. Risk factors and outcome of infections by Multidrug-Resistant Gram Negative bacteria in patients undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood Marrow Transplant* 23 (2017) 333-39
- 57-J. Bilinski, K.Robak, Z. Peric et al. Impact of gut colonization by antibiotic-Resistant bacteria on the outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective, single-center study. *Biol Blood Marrow Transplant* 22 (2016) 1087-93
- 58-G. Battipaglia, F Malard, M.T Rubio et al. Fecal microbiota transplantation before or after allogeneic hematopoietic transplantation in patients with hematopoietic malignancies carrying multidrug-resistance bacteria. *Haematologica* 2019; 104(8): 1682-88
- 59- M. Aoudjhane, M Labopin, NC Gorin et al. Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic

leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* (2005) 19, 2304-12

60- S.R Panch, J. Szymanski, B.N Savani et al. Source of Hematopoietic stem and progenitor cells and methods to optimize yields for clinical cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* (2017) 1241-49

61- Q. Fan, H.Liu, X. Liang et al. Superior GVHD-free, relapse-free survival for G-BM to G-PBSC grafts is associated with higher MDSCs content in allografting for patients with acute leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* (2017) 10: 135

62- A. Velasco-Guardado, L. Lopez-Corral, A. Álvarez-Delgado et al. Endoscopic evaluation and histological findings in graft-versus-host disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2012; 104: 310-14

63- B. Thompson, D Salzman, J Steinhauer et al. Prospective endoscopic evaluation for gastrointestinal graft-versus-host disease: determination of the best diagnostic approach. *Bone Marrow Transplantation* (2006) 38, 371-76