

6.11 Immunologia dei trapianti e trapianto di cellule staminali ematopoietiche

Franco Locatelli, Valentina Trevisan, Carmelo Gurnari

Dipartimento di Oncoematologia, IRCCS Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma

Il trapianto

Trapiantare, dal latino *transplantare*, fa riferimento all'atto di trasferire cellule, tessuti o organi da un sito a un altro. Il desiderio di realizzare un trapianto origina dalla consapevolezza che molte malattie possano essere curate dall'impianto di un organo sano, di un nuovo tessuto o di cellule da un individuo, donatore, a un altro, ricevente in necessità di trapianto. Il concetto del "trasferimento dei tessuti" è ben noto già prima dello sviluppo della scienza moderna. Di ciò ne sono modelli esemplificativi dal nono secolo a.c. Omero e la sua descrizione del concetto di chimeria nell'Odissea, il testo del chirurgo cinese Tsin Yue-Jen, il medico filosofo Galeno, e l'iconografia classica, come dimostra la "Guarigione del diacono Giustiniano" raffigurata dal Beato Angelico, che riporta un episodio della vita dei Santi Cosma e Damiano (Fig. 1). Dall'inizio del diciannovesimo secolo, la storia del trapianto ha visto un continuo e inarrestabile sviluppo. I maggiori contributi si devono a Paul Blundell nel 1818, il primo medico ostetrico a effettuare una trasfusione (dal marito alla moglie partorientente), per poi passare ai primi, seppur fallimentari tentativi di trapianto di osso e di cute da cadavere. Una svolta

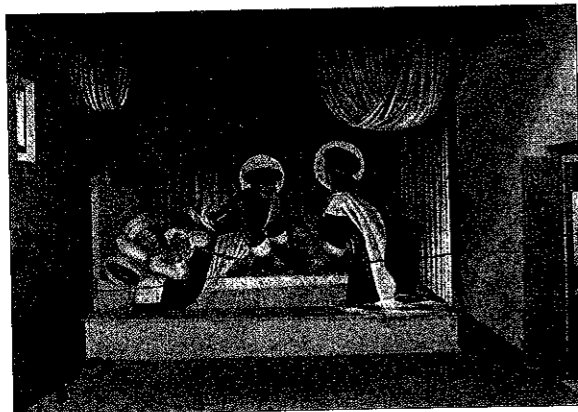


Figura 1. Beato Angelico, Museo Nazionale di San Marco (Firenze) *Guarigione del diacono Giustiniano* che raffigura la sostituzione di una gamba ulcerata con quella di un etiope morto di recente.

significativa è stata data in primo luogo dalla scoperta nel 1902 da parte di Karl Landsteiner del sistema dei gruppi sanguigni O, A, B, AB per la quale ricevette il premio Nobel nel 1930 e lo sviluppo da parte del Dott. Alexis Carrel, premio Nobel del 1912, della tecnica per suturare i vasi, quali arterie e vene che viene usata ancor oggi nelle procedure di trapianto di organo solido e nelle procedure di chirurgia generale. Successivi studi d'importanza fondamentale risalgono al 1944, quando Medawar dimostrò che il rigetto dell'innesto cutaneo è una risposta immunitaria dell'ospite contro il donatore, che, in seguito, Mitchison scoprì essere di tipo cellulo-mediata. Seguirono poi i primi successi: il primo trapianto tra gemelli fu quello di rene eseguito a Boston nel 1954 da Joseph E. Murray, seguito dal primo trapianto di fegato da parte di Thomas E. Starzl nel 1967, il primo trapianto di cuore di Christian Barnard nel 1967, e i primi trapianti di cellule emopoietiche ottenute dal midollo osseo eseguiti nel 1968 su due bambini affetti da un'immunodeficienza grave combinata (SCID, *severe combined immune-deficiency*) e sindrome di Wiskott-Aldrich (WAS).

Da quando nel 1959 Schwartz e Dameshek scoprirono le proprietà immuno-modulanti della 6-mercaptopurina nei topi, si inaugurò lo sviluppo dell'era del trattamento immunosoppressivo. Queste scoperte e queste terapie hanno contribuito allo sviluppo e al miglioramento delle cure e della sopravvivenza degli organi trapiantati o delle cellule infuse.

Per ciò che riguarda il trapianto di cellule nucleate possiamo distinguere le seguenti tipologie:

- trapianto singenico (tra gemelli omozigoti);
- allotrapianto (tra individui della stessa specie, ma che non condividono il medesimo assetto immunogenetico);
- autotrapianto (trasferimento di tessuti dello stesso individuo).

Il grado di risposta immunologica al *graft*, sia esso cute, organo solido o cellule emopoietiche, dipende dalla disparità immunologica esistente tra il ricevente e il donatore. Lo Xenotrapianto, ossia il trapianto tra individui di specie diversa, rappresenta il più alto

grado di disparità, scatena una forte risposta immunitaria, esitando nella quasi totalità dei casi in rigetto. Diversamente accade, invece, nel caso dell'autotrapianto e del trapianto singenico. Nel primo caso, essendo l'autotrapianto per definizione il trasferimento di tessuto endogeno all'interno dello stesso individuo, non induce alcuna reazione immunologica; lo stesso avviene nel caso del trapianto tra gemelli geneticamente identici (trapianto singenico).

La limitata disponibilità d'organo compatibile, sia esso solido o cellule staminali rappresenta tuttora il problema primario o il limite principale di tutti i tipi di trapianto. Da ciò scaturiscono gli studi approfonditi che si stanno svolgendo sulle potenzialità dello xenotrapianto, in particolare da maiale a uomo, per quanto riguarda il trapianto di polmoni, di cuore, di pancreas e delle isole di Langherans. Tuttavia, tra i maggiori limiti dello xenotrapianto ricordiamo: il rigetto immediato del *graft*, dovuto alla presenza di anticorpi preformati e del complemento, la dubbia efficacia del surrogato, la potenziale trasmissione di virus patogeni per l'uomo e, infine, alcuni aspetti che pertengono all'etica della procedura. In virtù di queste significative limitazioni, a oggi, la più comune procedura trapiantologica rimane l'allotrapianto, ossia il trapianto tra individui geneticamente (e immunogeneticamente) diversi, ma della stessa specie. La misura in cui i trapianti allogenici vengono rigettati dipende in larga parte dal grado di istocompatibilità tra il donatore e il ricevente che ha alla base il sistema HLA.

Immunologia dei trapianti: il sistema HLA

La funzione biologica delle molecole HLA è di presentare peptidi presenti nell'ambiente intra- o extracellulare ai linfociti T CD8⁺ citotossici e ai linfociti T-helper CD4⁺ attraverso un processo conosciuto come presentazione antigenica *MHC-restricted*. Gli antigeni HLA di classe I sono glicoproteine ubiquitarie, modulabili quantitativamente nella loro espressione sulla superficie cellulare sotto l'azione di citochine nel corso di eventi stressanti o patologici. Si può affermare che le molecole di HLA di classe I presiedono alla difesa di un *milieu* intracellulare infetto. I peptidi di derivazione endogena (autologhi o di patogeni integrati nella cellula da essi infettati) vengono degradati in frammenti di 8-10 aminoacidi e, quindi, caricati nel solco combinatorio delle molecole di classe I (costituito da una catena α ripiegata in tre domini - due dei quali formanti il solco combinatorio - e la β -2 microglobulina). Questo complesso HLA-peptide viene, poi, trasportato sulla superficie cellulare; qui il legame con il recettore dei linfociti T citotossici

presenti nell'area di reazione immuno-infiammatoria induce la liberazione di citochine quali interleuchina (IL)-2 e IL-12 che provvedono ad attivare i linfociti T citotossici stessi, trasformandoli in cellule effettrici che provocheranno, infine, la lisi cellulare del *target*. Gli antigeni HLA di classe II sono, invece, costitutivamente espressi da determinate cellule del sistema immunitario, quali cellule dendritiche, cellule di Langherans, di Kupffer, timociti e linfociti B e, dopo stimolo induttivo, sulla superficie cellulare dei linfociti T attivati. Le molecole HLA di classe II conferiscono all'individuo la possibilità di reagire contro un *milieu* extracellulare infetto. La processazione dei peptidi esogeni in questo caso è molto complessa e parte dal riconoscimento degli stessi da parte di immunoglobuline di membrana di linfociti B o la loro cattura da parte di cellule dendritiche (note complessivamente col termine APC, *antigen presenting cells*), all'interno delle quali penetrano con processo di endocitosi-fagocitosi. L'antigene viene frammentato in peptidi di 10-25 aminoacidi che verranno montati sulle molecole HLA di classe II ed esposti sulla superficie cellulare. Il *T-cell receptor* (TCR) dei linfociti T helper CD4⁺ presenti nell'area di reazione immunologica/infiammatoria riconosce il complesso e vi si lega innescando la produzione e secrezione di interleuchine, soprattutto IL-2, che provocano l'attivazione e la replicazione dei linfociti T-helper i quali, a loro volta stimoleranno la genesi e l'espansione di linfociti T citotossici o di linfociti B che si differenzieranno in plasmacellule produttrici di anticorpi specifici per il determinante antigenico responsabile dell'innescamento della risposta immune.

Le molecole HLA sono perciò coinvolte in modo diretto, ovvero sia con il legame al peptide, e in modo indiretto attraverso il legame al TCR, nel riconoscimento dell'antigene.

Come sopra menzionato, tuttavia, il TCR dovrebbe riconoscere l'antigene solo in presenza di una molecola HLA-*self*, ma nella realtà il riconoscimento avviene anche quando il peptide è presentato da molecole HLA-*non-self* (si pensi al fenomeno del "rigetto").

Varie sono le ipotesi a riguardo:

- riconoscimento "peptide dominant binding";
- riconoscimento "MHC dominant binding";
- riconoscimento degli antigeni minori di istocompatibilità, proteine polimorfiche endogene espresse sulla superficie cellulare con l'MHC di classe prima e importanti nell'ambito delle reazioni di rigetto.

I geni che codificano per le molecole HLA mappano sul braccio corto del cromosoma 6 (regione 6p21), vengono trasmessi secondo modalità codominante

e sono fortemente polimorfici. È proprio tale polimorfismo a garantire la risposta antigenica giacché, generando un vasto numero di combinazioni HLA, esso aumenta la probabilità di avere un legame efficiente a degli antigeni esogeni differenti. L'alloreattività è, quindi, genericamente definibile come la mancanza di tolleranza di fronte a una nuova combinazione peptide-molecola HLA.

Il trapianto di organo solido: generalità

Il trapianto di organo solido (SOT) è una realtà ben consolidata per alcuni organi, quali cuore, cornea, fegato, rene, mentre per altri, come polmone, intestino e pancreas, rappresenta una procedura ancora in fase di perfezionamento. Una grande svolta di estrema avanguardia e degna di nota dell'ultimo decennio, invece, è rappresentata dal successo del trapianto di utero.

Il grado e il tipo di risposta immunologica dipende dal tipo d'organo soggetto a trapianto e dal grado di incompatibilità immunologica. Tuttavia, alcune sedi come occhio, cervello, testicoli e il sistema placentare essendo santuari immunologici, possono tollerare anche un grado più elevato di disparità HLA. L'assenza di un drenaggio linfatico convenzionale da questi siti specifici previene il riconoscimento di antigeni da parte del sistema immunitario e di conseguenza l'insorgenza di una risposta infiammatoria cellulo-mediata. Questi siti immuno-privilegiati o punti ciechi del nostro sistema immunitario, sono strutturati in modo da:

- in primo luogo, deviare la natura della risposta immunitaria al di fuori di queste sedi: si noti, infatti, che gli organi in questione possiedono una limitata capacità rigenerativa intrinseca;
- in secondo luogo, per la loro struttura fisiologica, tale da bloccare una potenziale risposta infiammatoria distruttiva.

Essi, dunque, nel contesto trapiantologico, piuttosto che la regola rappresentano l'eccezione, un compromesso immunologico del nostro sistema immunitario, un meccanismo di adattamento che limita i processi infiammatori immunomediati in sedi con limitata capacità rigenerativa.

Quindi nel SOT di cornea, in quanto priva di vascolarizzazione, la tipizzazione HLA e la compatibilità ABO assumono un ruolo marginale.

In tutti gli altri casi di trapianto SOT allogenico invece, assumono una certa importanza le dimensioni fisiche dell'organo, condizioni precipue per cuore e polmoni, e i criteri immunologici quali: la compatibilità HLA, la compatibilità di gruppo sanguigno e i *cross-match*

test che rilevano l'esistenza di anticorpi preformati nel ricevente. Tali criteri assumono differente rilevanza a seconda dell'organo da trapiantare. Nel caso del fegato è molto rilevante la compatibilità ABO; al contrario, nel caso del trapianto di rene il *cross-match* è imprescindibile, data la frequente esistenza di anticorpi preformati.

Trapianto di cellule staminali emopoietiche

Introduzione

Dubbio non vi è che poche altre terapie abbiano così profondamente inciso sulla storia naturale di molte patologie come il trapianto di cellule staminali emopoietiche (TCSE). Il TCSE, infatti, ha apportato nel corso della sua evoluzione due sostanziali cambiamenti: ha radicalmente modificato le prospettive di sopravvivenza di pazienti affetti da malattie altrimenti destinate a un esito infausto (si pensi, paradigmaticamente, alle leucemie acute, alle SCID o alle aplasie midollari, siano esse acquisite o congenite) e ha sostanzialmente migliorato la qualità di vita associata ad alcune patologie (ad es. l'anemia a cellule falciformi o la *thalassemia major*) che comportano gravi morbidità per il paziente, pur non essendo gravate da prognosi sfavorevole nel breve termine.

I primi trapianti di cellule emopoietiche coronati da successo si registrano, come già ricordato, negli anni sessanta quando Gatti et al. e Bach et al. eseguono tale procedura rispettivamente in un lattante di cinque mesi affetto da SCID e in un bimbo di due anni affetto da WAS. Questa procedura, nel corso dei cinquant'anni che sono trascorsi dai primi TCSE, si è progressivamente raffinata grazie a tutta una serie di innovative scoperte nel campo dell'immunologia, dell'istocompatibilità, dell'infettivologia ecc., assumendo i connotati di una vera rivoluzione terapeutica che deve ancora portare a termine tutto il suo percorso. Giova, inoltre, ricordare che, ancora oggi, a più di trent'anni dalle prime segnalazioni sull'efficacia del trapianto, i maggiori successi e le più ampie indicazioni rimangono campo di elezione per la pediatria.

L'obiettivo del TCSE è quello di sostituire il compartimento alterato del paziente con un patrimonio di cellule staminali ottenuto da un donatore sano capace di ricostituire il sistema emopoietico e immunitario del ricevente. Il raggiungimento di tale obiettivo, che si identifica pertanto con la guarigione, dipende dalla realizzazione di tre componenti principali:

1. utilizzo di una terapia pre-trapianto (detta di "condizionamento") in grado di "creare spazio" alle cellule staminali del donatore in sostituzione di quelle

del ricevente e di contribuire a eliminare cellule leucemiche presenti nel malato al momento della realizzazione della procedura trapiantologica;

2. superamento, ai fini dell'attecchimento, della barriera immunologica rappresentata dalle cellule immunocompetenti del paziente che sono responsabili del rigetto;
3. superamento della seconda barriera immunologica rappresentata dalle cellule immunocompetenti del donatore presenti nella sospensione di cellule staminali, responsabili della malattia del trapianto contro l'ospite (*graf-versus-host-disease*, GVHD).

A differenza, quindi, di qualsiasi altro tipo di trapianto, nel TCSE la barriera immunologica da superare è direzionalmente doppia: dal ricevente verso donatore (rigetto) e dal donatore verso ricevente (GVHD). La sostituzione del compartimento staminale del paziente con le cellule del donatore determina la convivenza nello stesso individuo del patrimonio genetico di due soggetti differenti; il ricevente in tal caso diventa genotipicamente una *chimera* (termine mutuato dalla mitologia classica per definire una creatura con parti anatomiche derivate da individui differenti).

Dalla cellula staminale emopoietica derivano, inoltre, i macrofagi tissutali, quali quelli alveolari del polmone, le cellule del Kupffer epatiche, gli osteoclasti, le cellule del Langherans cutanee, la microglia cerebrale e, come dimostrato di recente, anche i

rabdomiociti. Questa caratteristica rende ragione dell'impiego del TCSE anche in pazienti affetti da osteopetrosi (patologia caratterizzata da un difetto di funzione, o più raramente di numero, degli osteoclasti) o in alcuni errori congeniti del metabolismo (ad es. *tesaurismosi lisosomiale*). Quando, infatti, si esegue un allotrapianto in un ricevente sottoposto a regime mieloablativo, le CSE trapiantate danno origine a tutte le discendenze emopoietiche, inclusa la linea dei monociti come precursori dei macrofagi tissutali che si trovano a livello polmonare, cutaneo o epatico.

Indicazioni

Le indicazioni trapiantologiche sono suscettibili di un continuo, dinamico processo di revisione, in ottemperanza all'obbligo di avere come punto di riferimento la necessità di offrire al paziente, in ogni momento, le migliori terapie associate ai minori effetti collaterali (Tab. I). È necessario, infatti, alla luce dei principi fondamentali della bioetica, effettuare sempre, prima di porre un'indicazione trapiantologica, un'attenta e programmatica verifica del bilancio costi/benefici in termini di guadagno di salute. Essa consiste nel comparare il rischio associato alla malattia con quello legato alla procedura trapiantologica, il quale dipende da diverse variabili, tra le quali: lo stadio di malattia, l'età del paziente, l'intervallo di tempo trascorso tra la diagnosi e il trapianto, il tipo

Tabella I. Indicazioni al trapianto di cellule staminali emopoietiche in età pediatrica (da Burgio e Locatelli, 2005, mod.).

Leucemia linfoblastica acuta (ALL) in I remissione*	Immunodeficienze combinate gravi (SCID)
in II remissione	
in III o successiva remissione	
Leucemia mieloide acuta (AML) in I o successiva remissione	Immunodeficienza con Iper IgM
Leucemia mieloide cronica Ph ⁺	Sindrome di Omenn
Sindromi mielodisplastiche	Sindrome di Wiskott-Aldrich
Linfoma (Hodgkin e non Hodgkin) recidivato o resistente	Sindrome di Chediak-Higashi
Selezionati tipi di tumore solido**	Sindrome di Kostmann (agranulocitosi maligna infantile)
Anemia aplastica grave	X-linked lymphoproliferative disease (sindrome dei Duncan)
Anemia di Fanconi	Linfoistocitosi emofagocitica
Discheratosi congenita	Gravissime forme di piastrinopenia costituzionale (ad es. trombastenia di Glanzmann e sindrome di Bernard Soulier)
Anemia di Diamond-Blackfan	Tipi selezionati di mucopolisaccaridosi e di altre malattie liposomiali e lisosomiali/perissosomiali
Thalassemia Major	Osteopetrosi maligna infantile
Anemia a cellule falciformi	Selezionati tipi di malattie autoimmuni refrattarie ai trattamenti e associate a prognosi grave

* Pazienti ad alto rischio di recidiva (i.e con traslocazione t(9;22) o t(4;11); non responder alla fase pre-fase corticosteroidica e con immunofenotipo T o più di 100x10⁹ WBC/L alla diagnosi; pazienti con alti livelli di malattia residua minima ai punti di valutazione).
 ** Neuroblastoma metastatico o refrattario alle terapie convenzionali o recidivato dopo trapianto autologo, rabdomiosarcoma refrattario alle terapie convenzionali o recidivato dopo trapianto autologo, sarcoma di Ewing ad altissimo rischio.

di donatore (germano o soggetto non imparentato), il sesso del donatore e le caratteristiche individuali. Le attuali linee guida promosse dalle società scientifiche di trapianto emopoietico suggeriscono una progressiva integrazione nel processo decisionale dei profili di rischio individuali dei pazienti.

Tutto questo premesso, come si può facilmente evincere dalla Tabella I, dubbio non vi è che l'ambito pediatrico offra variegati ambiti applicativi del trapianto di cellule emopoietiche, principalmente in virtù dello spettro eterogeneo di malattie geneticamente determinate per le quali il trapianto rappresenta un trattamento salva-vita (ad es. le forme più gravi d'immunodeficienze primitive o le aplasie midollari sia congenite, sia acquisite) o largamente migliorativo della qualità della medesima (si considerino nel merito le differenti emoglobinopatie o alcune forme di gravi piastrinopatie costituzionali). Proprio nelle immunodeficienze primitive, sono di ormai largo riscontro risultati trapiantologici con probabilità di guarigione largamente nell'ambito del 90%, soprattutto qualora si possa impiegare, al meglio in tempi rapidi soprattutto per i bambini con SCID, un donatore HLA-compatibile.

Fonti di CSE

La prima sorgente di CSE storicamente impiegata è stata il midollo osseo, ottenuto attraverso aspirazioni ripetute a livello della cresta iliaca posteriore del donatore, in anestesia generale o locale. La morbilità correlata al prelievo midollare per il donatore è molto bassa e si limita generalmente a un temporaneo fastidio a livello della sede di prelievo (rari sono i casi di difficoltà alla deambulazione, che possono sussistere da qualche giorno fino ad alcuni mesi). La quantità di midollo da prelevare è solitamente rispetto al numero di cellule nucleate per kg di peso corporeo del ricevente e, ai fini dell'attecchimento, è consigliabile ottenere un numero di cellule nucleate $\geq 3 \times 10^8$ /kg di peso corporeo del ricevente.

Sulla base dell'osservazione per cui le cellule staminali emopoietiche si distaccano continuamente dal comparto midollare, entrano nella circolazione sanguigna e ritornano al midollo, si è dimostrato che il sangue periferico può rappresentare un'utile sorgente alternativa e, nel corso degli ultimi 2 decenni, la raccolta di cellule staminali emopoietiche mobilitate nel sangue periferico dall'impiego del G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) ha sostituito il prelievo di midollo osseo nel trapianto autologo e, soprattutto per i pazienti adulti, nella maggior parte degli allotrapianti. I vantaggi di tale procedura vanno da quelli offerti al donatore, ossia una minore morbilità associata alla raccolta delle cellule staminali (vengono evitate l'anestesia, l'osped-

alizzazione e la potenziale esposizione a emoderivati allogenic), a quelli più propriamente clinici per i pazienti, esemplificati da un più rapido attecchimento (con precoce risalita dei neutrofilii e delle piastrine) e dall'infusione di un numero maggiore di linfociti T e di cellule NK presenti nell'inoculo, che potrebbe incrementare l'effetto anti-tumorale del trapianto (*graft-versus-leukemia effect*, GvL). D'altro canto, mentre non esistono evidenze conclusive sul fatto che l'incidenza della GvHD acuta sia maggiore dopo PBSC (*peripheral blood stem cell transplantation*) che dopo BMT (*bone marrow transplantation*), la letteratura ha ormai stabilito che l'eccesso di cellule T nel sangue periferico rispetto al midollo osseo (da 7 a 10 volte maggiore) aumenta considerevolmente l'incidenza della GvHD cronica, anche nelle sue forme più gravi, rendendo necessario un trattamento immunosoppressivo prolungato.

Le PBSC sono raccolte mediante sedute singole o multiple di leucaferesi effettuate mediante separatori cellulari a flusso continuo; per ottenere un adeguato attecchimento, l'obiettivo è raggiungere un numero totale di cellule staminali emopoietiche (intese come cellule CD34⁺) $\geq 3-4 \times 10^6$ /kg di peso corporeo del ricevente. È consigliabile, in caso di trapianti non manipolati anche da donatore germano HLA-identico, non superare la soglia di 8×10^6 cellule CD34⁺/kg di peso corporeo del ricevente.

L'infusione delle cellule del donatore, in qualsiasi modo raccolte, avviene nel ricevente solitamente attraverso un catetere venoso centrale posizionato chirurgicamente in modo da collocare la sua estremità distale a livello della giunzione tra vena cava superiore e atrio destro. Una volta infuse, le cellule staminali emopoietiche vanno a colonizzare il microambiente midollare grazie al fenomeno dell'*homing* e sotto l'azione regolatoria delle cellule stromali e dei fattori di crescita da esse prodotti, conducono alla completa ricostituzione emopoietica.

Negli ultimi due decenni, numerosi sono stati gli studi che hanno investigato l'idoneità del sangue cordonale come sorgente alternativa di cellule staminali emopoietiche. Il primo trapianto di sangue cordonale risale al 1988 quando Gluckman et al. trapiantarono, con successo, con le cellule di una sorellina HLA-identica un paziente di 5 anni affetto da Anemia di Fanconi. Da quel momento in poi, l'efficacia del cordone come fonte alternativa di CSE sia nel contesto di patologie maligne che benigne è stata ampiamente dimostrata in diverse pubblicazioni. A oggi, nel mondo, sono conservate, dopo opportuna caratterizzazione e crioconservazione, più di 600.000 unità di sangue cordonale e con le cellule emopoietiche

in esse contenute sono stati eseguiti più di 30.000 trapianti allogenic.

Studi effettuati nella popolazione pediatrica hanno dimostrato una sopravvivenza globale e una sopravvivenza libera da malattia sovrapponibili al trapianto da un donatore non correlato (*matched unrelated donor*, MUD), con lo svantaggio di essere caratterizzati da un attecchimento più lento, soprattutto per quanto riguarda la risalita delle piastrine, ma con il vantaggio di una minor incidenza e gravità di GvHD acuta e cronica.

I due principali vantaggi che determinano il successo di questo tipo di trapianto sono la dose cellulare infusa (normalmente espressa in termini di cellule nucleate totali per kg del ricevente, TNC/kg) e il *matching* HLA (espresso in termini di *matching* HLA per i loci A,B e DR (x/6) o per i loci A, B, C e DR (x/8)). Tenendo in considerazione che i due fattori fra loro interagiscono, in caso di una disparità immunogenetica maggiore nella coppia donatore/ricevente è necessario disporre di una maggiore dose cellulare per raggiungere il desiderato outcome.

Pochi dubbi, comunque, che specialmente nei pazienti adulti, ma anche nei pazienti pediatrici con un peso elevato, l'importanza della dose cellulare spesso rappresenta un fattore limitante per il successo del trapianto. Alla luce di questa osservazione, diversi gruppi di ricerca hanno investigato strategie atte a migliorare l'attecchimento dell'unità cordonale.

Il primo approccio preso in considerazione è stato quello del trapianto contemporaneo di 2 unità cordonali diverse. Se questo approccio ha trovato larga applicazione nei pazienti adulti, tuttavia, nel contesto pediatrico, l'analisi preliminare di uno studio prospettico randomizzato ha evidenziato come il co-trapianto di 2 unità non manipolate di sangue cordonale non solo non porti a un vantaggio in termini di sopravvivenza, ma comporti anche un rischio di GvHD acuta maggiore.

La seconda strategia adottata è rappresentata dall'espansione *ex-vivo* di un'unità di sangue cordonale su un *layer* di cellule stromali mesenchimali (MSCs), giacché tali cellule concorrono a costituire la nicchia ematopoietica. È stato dimostrato da de Lima et al. come questo approccio permetta un'espansione delle cellule nucleate di 12 volte e delle cellule CD34⁺ di circa 30 volte. Inoltre, l'infusione del prodotto, insieme a una seconda unità di sangue cordonale non manipolata, determina un attecchimento più rapido. Sebbene non siano ancora definiti univocamente i meccanismi patofisiologici sottostanti, è interessante notare che, come osservato in altri studi di co-trapianto di 2 unità di sangue cordonale di cui una

era stata manipolata, lo studio del chimerismo ha evidenziato che l'unità espansa attraverso la co-cultura con MSCs era responsabile dell'attecchimento precoce, mentre quella non manipolata sosteneva l'attecchimento a lungo termine. Non è stato ancora ben definito se ciò sia dovuto a un esaurimento della capacità di autorinnovamento delle cellule staminali o a una minor presenza di cellule favorevoli all'attecchimento (dato che la maggior parte delle piattaforme di espansione comportano la deplezione dei linfociti T e delle cellule *natural killer*, NK).

Un approccio simile dal punto di vista concettuale è costituito dalla coinfusione di un'unità di sangue cordonale con MSCs: tale strategia non ha però mostrato un vantaggio in termini di attecchimento, pur dimostrando una minor incidenza di GvHD di grado III-IV. Con l'intento di bypassare l'intrappolamento di una percentuale significativa di cellule staminali emopoietiche a livello del filtro polmonare, Frassoni et al. hanno esplorato la sicurezza e l'efficacia dell'infusione direttamente a livello delle creste iliache, ossia nel midollo osseo. È stato dimostrato come tale approccio possa permettere il superamento dell'effetto-dose, anche in presenza di una elevata disparità immunogenetica fra donatore e ricevente.

Sono allo studio approcci ulteriori attualmente volti al miglioramento dell'attecchimento e dell'immunoricostruzione, quali:

- il co-trapianto di sangue cordonale e cellule staminali periferiche dopo deplezione dei linfociti T da donatore aploidentico o MUD;
- il miglioramento dell'*homing* delle cellule staminali e dei progenitori cordonali infusi, attraverso la fucosilazione delle cellule, l'inibizione dell'enzima dipeptididipeptidasi 4 (DPP4) e il pretrattamento con prostaglandina E modificata.

Tipi di TCSE

Trapianto da germano HLA-identico (*sibling*)

I geni del complesso HLA sono strettamente associati tra loro, segregano assieme e si trasmettono come un blocco unico di informazione genetica secondo la legge di Mendel (conosciuta anche come la legge dell'uniformità degli ibridi della prima generazione) in modo codominante; tale "unità genetica" sullo stesso cromosoma è detta "aplotipo" e il genotipo consta di due aplotipi parentali (paterno e materno, Fig. 2). Dunque, due fratelli sono HLA-identici fra loro qualora abbiano ereditato gli stessi aplotipi materno e paterno, eventualità che si verifica nel 25% dei casi. Il trapianto da donatore familiare HLA-identico è ancora oggi considerato il *golden standard*, essendo

caratterizzato solitamente da un rapido *engraftment*, da un rischio relativamente basso di GvHD fatale, da un soddisfacente sviluppo di immunotolleranza e da una ricostituzione immunologica completa del ricevente nel giro di pochi mesi dal trapianto.

Il trapianto da donatore non consanguineo HLA-identico (MUD)

Considerando la modalità co-dominante della ereditarietà del sistema HLA, la probabilità di reperire per un paziente un germano compatibile è, come appena ricordato, del 25% e anche meno alla luce della contrazione demografica osservata nelle ultime decadi nei Paesi occidentali. È, quindi, evidente che solo una minoranza dei pazienti che potrebbero beneficiare di un trapianto possiede un donatore HLA-identico all'interno della fratria. La probabilità di reperire un donatore HLA-identico tramite i Registri Internazionali dei donatori di cellule staminali o le banche di raccolta e conservazione del sangue cordonale è stimabile oggi nell'ordine del 60-70%, dipendendo, tuttavia, in larga parte dalle caratteristiche immunogenetiche e dall'etnia del ricevente. Pazienti di origine caucasica hanno, infatti, una probabilità di identificare un donatore compatibile maggiore rispetto a pazienti di origine africana o ispanica, in quanto i gruppi etnici da cui originano questi pazienti sono assai meno rappresentati nei registri rispetto al gruppo caucasico.

Il trapianto da donatore aploidentico

Per donatore aploidentico, s'intende un donatore che condivide con il ricevente la metà dei geni HLA: questi donatori sono solitamente rappresentati dai genitori, da fratelli o dalla prole del ricevente (Fig. 2). Il trapianto da donatore aploidentico (o donatore familiare HLA-parzialmente compatibile) presenta, ri-

spetto ad altri tipi di trapianto, indubbi vantaggi, tra i quali: l'immediata disponibilità, almeno virtualmente, per tutti i pazienti (con conseguente ottimizzazione del *timing* del trapianto stesso); la possibilità di scelta del miglior donatore tra tutti i familiari disponibili secondo determinate connotazioni immunogenetiche; e la possibilità di far ricorso al donatore in caso di necessità di terapie cellulari.

Come è intuitivamente immaginabile, tuttavia, questo tipo di trapianto presenta diverse problematiche principalmente concernenti il superamento della barriera HLA nella coppia donatore/ricevente. Da essa, sono derivate, per anni, un'aumentata incidenza di rigetto del trapianto e di sviluppo di quadri straordinariamente gravi di GvHD. La messa a punto di tecniche in grado di ottenere una deplezione estensiva dei T linfociti del donatore, responsabili dello sviluppo della GvHD acuta o cronica, dall'inoculo trapiantato e la possibilità di ottenere numeri assai elevati di progenitori emopoietici dal sangue periferico dei donatori hanno consentito di superare in larga parte questi ostacoli. In particolare, l'ottenimento di 4 logaritmi di T-deplezione del *graft* (eseguita nella maggior parte dei casi con un metodo "indiretto", cioè attraverso la selezione positiva delle cellule staminali emopoietiche CD34⁺) e l'infusione di una mega-dose di progenitori emopoietici (definita come l'infusione di un numero di cellule CD34⁺ superiore a 10^8 - 12×10^8 /kg di peso corporeo del ricevente) si sono dimostrate cruciali per garantire un'elevata probabilità di attecchimento dell'emopoiesi del donatore, senza concomitante sviluppo di GvHD. Nonostante la rimozione quasi completa dei linfociti T, l'effetto immunologico del trapianto contro eventuali cellule maligne residue (effetto GvL) può essere mantenuto dalle cellule NK alloreattive^a.

^a L'alloreattività NK fu descritta per la prima volta più di 20 anni fa da Moretta et al., i quali osservarono la lisi *in vitro* di blasti leucemici allogeneici da parte di particolari subset di cellule NK caratterizzate dall'espressione/assenza di alcune molecole di superficie, identificate successivamente come recettori specifici per molecole HLA di classe I. Nello studio citato gli Autori hanno descritto per la prima volta il fenomeno dell'alloreattività NK. Le cellule *Natural Killer* possiedono specifici recettori, distribuiti clonalmente, denominati *Killer cell Immunoglobulin-like Receptors* (KIRs) che riconoscono specifici determinanti antigenici (KIR ligands), condivisi da alcuni gruppi allelici di molecole HLA di classe I (HLA-C: alleli di gruppo 1 e 2; HLA-B alleli che condividono la specificità Bw4). Durante il loro sviluppo, dopo l'interazione tra KIR e ligandi self, le cellule NK diventano "educate/licenziate" a esercitare l'alloreattività contro bersagli allogeneici che non esprimano KIR ligandi self. Nel setting del trapianto aploidentico, dunque, l'alloreattività NK (*donor-versus-recipient*) viene esercitata da cellule NK del donatore "licenziate" (maturando a livello del midollo osseo dopo il trapianto, esse vengono esposte prevalentemente a molecole HLA del donatore, presenti sulle cellule ematopoietiche), cioè cellule NK che esprimono il proprio repertorio KIR, i cui ligandi sono, almeno in parte, non espressi sui bersagli allogeneici. L'alloreattività mediata dalle cellule NK si esplica su tre tipi cellulari (Fig. 3), con altrettanti effetti benefici in termini clinici: in primo luogo l'eliminazione dei linfociti T del ricevente residui è in grado di prevenire il rigetto delle cellule del donatore, migliorando, quindi, la probabilità di attecchimento; in secondo luogo, l'eliminazione delle cellule dendritiche del ricevente (con conseguente priming inefficace dei linfociti T alloreattivi del donatore) diminuisce l'incidenza di GvHD; infine, l'effetto più importante per l'outcome clinico, si esplica attraverso l'azione litica sulle cellule leucemiche residue con conseguente riduzione del rischio di recidiva della leucemia. Nel lavoro di Overmann et al. viene discusso come l'effetto GvL è mantenuto anche nel trapianto aploidentico grazie all'azione delle cellule NK alloreattive.

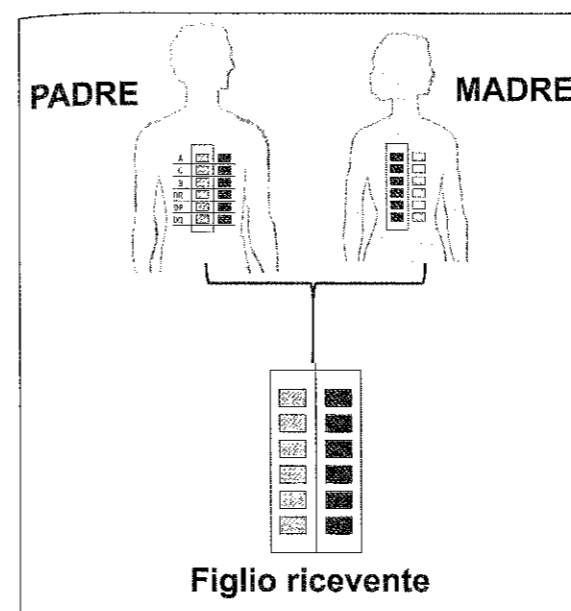


Figura 2. Meccanismo di trasmissione co-dominante degli aplotipi HLA.

Allo stato attuale, dunque, dal punto di vista immunologico, il problema maggiore da cui è gravato il trapianto aploidentico è costituito dalla ritardata ricostituzione immunologica, dovuta al ridotto numero di linfociti T trasferiti con il *graft*, che si traduce poi sul piano clinico in una marcata incidenza di patologia infettiva e, in assenza di alloreattività delle cellule NK, in un maggior rischio di recidiva della malattia di base.

Per ottimizzare i risultati ottenibili con il trapianto HLA-aploidentico, sono, tuttora, in fase di sperimentazione diverse strategie per superare il problema di un ritardo del processo di ricostituzione dell'immunità adattiva; tra tutte queste, si possono riconoscere due importanti filoni di ricerca che ineriscono all'ambito del trapianto aploidentico cosiddetto "T-repleto" (in cui cioè il *graft* non viene T-depletato) e strategie nell'ambito del trapianto aploidentico cosiddetto T-depleto.

Il trapianto aploidentico T-repleto

In accordo a Huang et al., l'uso di CSE ottenute da donatore mobilitato con G-CSF con successiva robusta profilassi della GvHD post-trapianto è associato a ridotto rischio di mortalità trapianto correlata (TRM) e miglior sopravvivenza a lungo termine. Il meccanismo di modulazione della GvHD, che gli autori suggeriscono essere mediato dal *priming* del G-CSF sulle cellule T nel midollo osseo, è ancora poco chiaro. Chiaro è che l'ATG (*anti-thymocyte globulin*, siero anti-linfocitario) utilizzato nel regime di condizionamento e l'energica profilassi post-trapianto della

GvHD probabilmente hanno un ruolo maggiore nel controllo dell'alloreattività.

Data, poi, l'esperienza *in vitro* secondo cui la rapamicina non ha effetto negativo su un subset particolare di linfociti, fisiologicamente deputato a mediare una tolleranza periferica, i linfociti T regolatori (Treg), Peccatori et al. hanno sviluppato un protocollo con rapamicina (appartenente alla classe degli inibitori del *pathway* di mTOR) e MMF (micofenolato mofetile) per la profilassi della GvHD.

L'osservazione, poi, che la ciclofosfamida non è tossica per le CSE, grazie al loro alto tasso di espressione dell'enzima detossificante aldeide deidrogenasi, e la dimostrazione da parte del gruppo di Prigozhina che la somministrazione di alte dosi di questo alcalante può ridurre la GvHD e il rigetto del *graft* nei topi, senza alcun effetto collaterale sull'*engraftment*, ha portato a un rinnovato interesse per l'uso di un approccio post-trapiantologico basato sull'impiego di questo farmaco. Studi clinici della *Johns Hopkins University* di Baltimora (USA) e del *Fred Hutchinson Cancer Research Center* di Seattle (USA) hanno valutato un protocollo non mieloablativo con ciclofosfamida, fludarabina e 2 Gy di TBI seguiti da profilassi della GvHD con ciclofosfamida (50 mg/kg ai giorni +3 e +4 post-trapianto), MMF (ai giorni +5-35) e tacrolimus (giorni 5-180). A fronte di un'assai limitata incidenza e gravità della GvHD acuta o cronica, la percentuale di recidiva neoplastica, tuttavia, è stata rilevante, facendo così scemare il risultato di una relativamente bassa TRM.

Considerati nell'insieme, i diversi approcci di trapianto aploidentico offrono un'alternativa trapiantologica di facile applicazione molti centri per pazienti affetti da diverse neoplasie. Tuttavia, l'applicazione di queste strategie in ambito pediatrico è ancora limitata, soprattutto per quanto inerisce alle malattie non neoplastiche, suscettibili di cura con il trapianto, e risultati a lungo termine sono ancora materia d'investigazione da parte della comunità scientifica trapiantologica.

Trapianto aploidentico T-depleto

I primi studi clinici che hanno convincentemente dimostrato l'efficacia del trapianto emopoietico da donatore familiare HLA-aploidentico dopo T-deplezione, realizzata attraverso l'impiego di eritrociti di montone e agglutinazione con lectine di soia, si sono fondati sull'infusione di una "megadose" di CSE ottenute da midollo osseo o da sangue periferico dopo mobilitazione con G-CSF, senza alcuna addizionale profilassi della GvHD post-trapianto. Successivamente, al fine di ottimizzare i risultati ot-

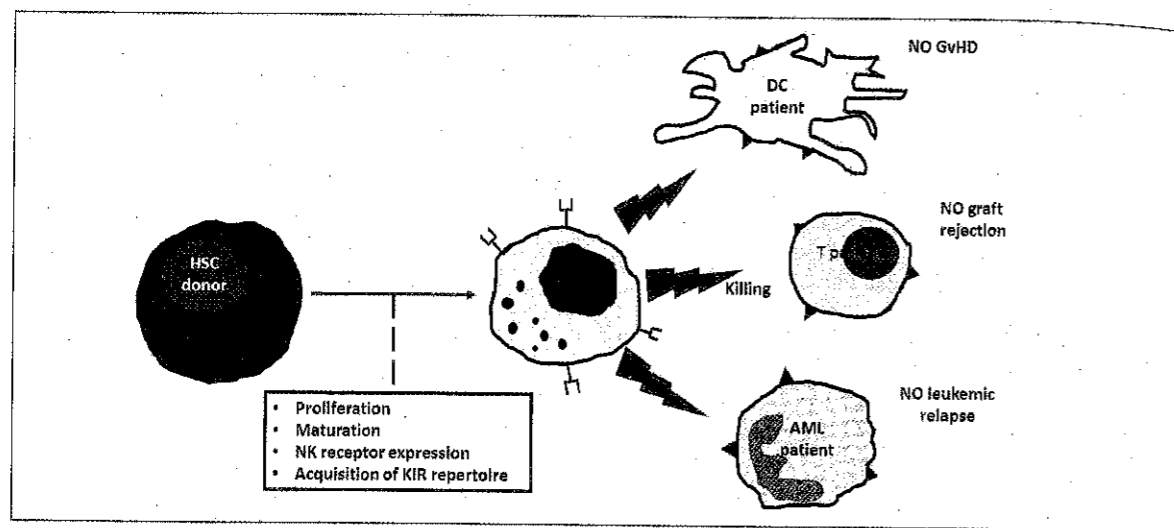


Figura 3. Generazione di cellule NK alloreattive e loro ruolo terapeutico nel trapianto aploidentico.

tenibili con il trapianto, sono stati ottimizzati i regimi di condizionamento ai fini di ridurre la tossicità extraematologica, così come la processazione del *graft* è stata migliorata con l'utilizzo della immunoselezione positiva delle cellule CD34⁺ e la somministrazione di G-CSF post-trapianto è stata sospesa quando si è capito che impattava sulla produzione di IL-12 da parte delle cellule dendritiche, la qual cosa portava ad abnorme attività di presentazione antigenica e iperattivazione T-cellulare.

I risultati ottenuti con l'impiego di cellule CD34⁺ positivamente selezionate hanno evidenziato numerosi aspetti che meritano particolare attenzione; in particolare:

1. l'infusione di un alto numero di cellule CD34⁺ del donatore può superare la barriera HLA^b;
2. un limite di 2-5 × 10⁴ di cellule T CD3⁺ del donatore/kg di peso corporeo del ricevente previene quasi completamente la GvHD anche in assenza di qualsiasi immunosoppressione post-trapianto;
3. in presenza di alloreattività delle cellule NK del donatore si osserva una bassa incidenza di recidive leucemiche post-trapianto cui può contribu-

ire anche l'impiego di terapia di condizionamento al trapianto ad alta intensità;

4. questo tipo di trapianto si associa a una TRM relativamente alta dovuta alla ritardata immunoricostruzione post-trapianto con alta incidenza soprattutto di infezioni opportunistiche da HCMV (citomegalovirus umano) e aspergillo nel primo anno post-trapianto.

Quindi, l'infusione di una "megadose" di CSE da donatore aploidentico T-depleta previene il rigetto del *graft*, la GvHD acuta e cronica e, in presenza di alloreattività NK del donatore, si associa a tassi di sopravvivenza simili a un trapianto MUD. La mortalità relativamente alta rispetto ai MUD è dovuta principalmente a infezioni opportunistiche e in assenza di immunosoppressione post-trapiantologica si apre una finestra terapeutica per l'immunoterapia adottiva con T-linfociti per migliorare l'immunoricostruzione e l'*outcome* clinico. A tal proposito il trapianto aploidentico di cellule staminali da sangue periferico selettivamente depletate di linfociti Tαβ⁺ offre potenziali vantaggi rispetto all'uso della selezione positiva di sole CD34⁺ perché con questo approccio il paziente beneficia della presenza

nel *graft* anche di altre cellule ancillari dell'immunità innata, in particolare le NK e i T-linfociti TCRγδ, i quali, oltre a esercitare un'azione anti-tumorale contribuiscono a conferire al ricevente un trapianto aploidentico T-depletato una miglior protezione rispetto a rischi infettivi (si veda oltre).

Per supplire all'elevata TRM, altre strategie volte al miglioramento dell'immunoricostruzione nel trapianto aploidentico T-depleto sono costituite da:

1. infusione di linfociti T patogeno-specifici;
2. infusione di linfociti T "ingegnerizzati" con geni suicidi;
3. Infusione di linfociti T regolatori (Treg).

Infusione di linfociti T patogeno-specifici

Diversi gruppi hanno messo a punto, partendo da cellule mononucleate del donatore, protocolli per la generazione di linee cellulari o cloni T specifici per i principali agenti patogeni responsabili di complicanze gravi o addirittura fatali dopo il trapianto. Peruccio et al. hanno generato cloni di T linfociti diretti contro antigeni di aspergillo e di citomegalovirus. Con un approccio simile, sono state generate linee dirette verso antigeni di adenovirus ed EBV. L'elevato impegno richiesto, tuttavia, in termini di tempo per la preparazione, costi e la necessità di una qualificazione ed esperienza tecnica nell'ambito specifico, per la generazione di queste linee o cloni, ne limita l'impiego su larga scala.

Infusione di linfociti T "ingegnerizzati" con geni suicidi

Un altro recente approccio al miglioramento della ricostituzione immunologica consiste nell'infusione di linfociti T policlonali ingegnerizzati per esprimere geni suicidi, attivabili da farmaci o sostanze inerti nel caso, dopo l'infusione, si sviluppi GvHD non controllabile con le terapie convenzionali. Ciceri et al. hanno infuso linfociti policlonali del donatore transfettati con il gene suicida *HSV thymidine kinase* (HSV-TK), attivabile grazie all'infusione di ganciclovir, farmaco routinariamente impiegato nelle infezioni/riattivazioni d'infezione da citomegalovirus.

Il gruppo del *Baylor College of Medicine di Houston* ha, più recentemente, sviluppato un'altra strategia sfruttando il *pathway* dell'apoptosi indotta dalle caspasi: le cellule T del donatore sono, infatti, state transfettate con un transgene codificante per una caspasi 9 la cui attivazione è inducibile mediante una molecola inerte (AP1903). L'infusione di questa molecola determina l'apoptosi del 90% dei linfociti T modificati entro 30 minuti dall'infusione con controllo della GVHD e senza alcuna ricorrenza della stessa. Rispetto a HSV-TK, il gene suicida della caspasi-9 inducibile, oltre a non essere immunogenico, possiede un più rapido meccanismo d'azione e permette di poter impiegare ganciclovir, qualora se ne ponga l'opportunità/necessità.

Infusione di linfociti T regolatori (Treg)

Un'ulteriore strategia per migliorare l'immunoricostruzione consiste nell'infusione sequenziale di Treg seguita da quella di linfociti T convenzionali (Tcon). In modelli murini, infatti, l'infusione di Treg determina una soppressione della GvHD senza inibire l'effetto GVL e una più rapida ricostituzione di linfociti Tcon. Recentemente, sono stati riportati risultati clinici molto incoraggianti di questo approccio.

Deplezione TCRαβ/CD19

A cavallo tra il trapianto T-repleto e quello T-depleto è stata recentemente sviluppata una terza strategia: la deplezione dei linfociti TcRαβ/CD19.

Quest'approccio si basa sulla sola eliminazione, dal *graft*, delle cellule effettrici della GvHD, ovvero i linfociti Tαβ e dei linfociti B CD19⁺ (implicati nello sviluppo post-trapianto di malattie linfoproliferative-EBV correlate), mantenendo al contempo nell'inoculo altre popolazioni cellulari utili ai fini dell'*outcome* trapiantologico (principalmente cellule NK, linfociti Tγδ^o e, in misura minore, cellule dendritiche). Dato che tali cellule sono funzionalmente mature, esse possono esplicare il loro effetto benefico immediatamente dopo il trapianto (cosa che non succede nel

^b "Megadose" e superamento della barriera HLA: la *veto activity*. L'attività "veto" è stata definita nel 1980 da Miller come la capacità di sopprimere specificamente i precursori T-citotossici diretti contro antigeni presentati dalle "veto cells". Tale termine "veto" rappresenta una definizione operativa e non una specifica sottopopolazione cellulare tanto che nel corso degli anni sono state identificate diverse cellule con tale capacità. In particolare, dopo il trapianto di CSE CD34⁺ purificate, la probabilità di attivazione di CTLp (linfociti T citotossici precursori) anti-donatore è proporzionale al livello delle cellule T residue del ricevente e inversamente proporzionale al numero di cellule veto e altre cellule regolatorie. La "attività veto" potrebbe essere inizialmente esercitata dall'infusione di CD34⁺ e i loro precursori CD33⁺, così come dalle cellule dendritiche immature CD11c⁺. Inoltre il trapianto con particolari genotipi HLA (ad es. NK alloreattivi) che generano rapidamente cellule NK alloreattive può eradicare i CTLs maturi che sfuggono alle veto cells. Quindi l'inoculo di CD34⁺ aploidentico è responsabile dell'attività veto sui CTLp anti-donatore e rapidamente genera anche altre cellule (NK, ecc.) richieste per l'eradicazione delle T-cells anti-donatore del paziente. Studi successivi hanno poi messo in luce come la megadose possa arrivare anche a 20 × 10⁶/kg.

^o I linfociti Tγδ (denominati anche linfociti T innate-like o transazionali) sono una sottopopolazione linfocitaria che possiede determinate caratteristiche proprie del compartimento innato del sistema: infatti, in modo simile ad altri linfociti T non convenzionali, essi riconoscono antigeni non-peptidici conservati che sono iperespressi da cellule sottoposte a stress, la cui distribuzione e modalità di espressione assomigliano a quelle dei PAMPs (associazione *Molecular Patterns*) e DAMPs (*Danger - Associated Molecular Patterns*), riconosciuti dai PRR (*Pattern Recognition Receptors*). Inoltre i linfociti Tγδ acquisiscono, in una fase molto precoce del loro sviluppo, un fenotipo pre-attivato, caratterizzato dall'espressione di marker di memoria: questo stato pre-attivato permette una rapida induzione delle funzioni effettrici dopo il riconoscimento dello stress cellulare. Numerosi studi, in vitro e in vivo, hanno suggerito come i linfociti Tγδ possano essere effettori potenzialmente efficaci nel contesto del trapianto di cellule staminali. In particolare Godder et al. hanno analizzato prospetticamente l'immunoricostruzione dei linfociti Tγδ in una coorte di pazienti sottoposti a trapianto aploidentico: è stato evidenziato un netto incremento della sopravvivenza in pazienti che presentavano un alto numero di linfociti Tγδ nel sangue periferico rispetto ai pazienti con un numero normale/basso.

trapianto di cellule CD34⁺ positivamente selezionate, perché la generazione da progenitori emopoietici e la maturazione delle cellule NK richiede dalle 6 alle 8 settimane di tempo.

Questa manipolazione più selettivamente mirata è stata resa possibile dallo sviluppo di una metodica per la deplezione dei linfociti TcR $\alpha\beta$ ⁺ e CD19⁺ da cellule mononucleate (PBMCs) mobilizzate, utilizzabile a livello clinico.

A oggi sono disponibili dati di *outcome* in pazienti pediatrici affetti da emopatie maligne, o da patologia non neoplastica sottoposti a trapianto aploidentico TcR $\alpha\beta$ /CD19 depleto. In questo ultimo gruppo di pazienti, con differenti tipi di immunodeficienza primitiva o con altre patologie non neoplastiche, per i quali non era disponibile un altro tipo di donatore, si è osservata una probabilità di sopravvivenza libera da malattia nell'ordine del 90%. Lo studio della ricostituzione immunitaria ha mostrato un rapido incremento dei linfociti T $\gamma\delta$ ⁺ nel periodo precoce post-trapianto con più tardiva risalita della controparte $\alpha\beta$ ⁺.

Peculiarità immunologiche del TCSE

Il rigetto del trapianto

Il fenomeno del rigetto si instaura allorché le cellule midollari del donatore, riconosciute come non proprie (*non self*), vengono aggredite e distrutte dalle cellule immunocompetenti del ricevente (principalmente T linfociti citotossici), sopravvissute alla terapia di preparazione al trapianto. La profonda immunosoppressione indotta dalle alte dosi di chemioterapia pre-trapianto riduce, tuttavia, l'incidenza del rigetto nei pazienti leucemici sottoposti a trapianto allogenico non T-depleto da donatore HLA compatibile all'1-2% dei casi. La frequenza del rigetto incrementa considerevolmente in pazienti affetti da patologie non-neoplastiche (incluse quelle forme di immunodeficienza con residua apprezzabile funzione T linfocitaria), in particolare se sottoposti a trapianto T-depletato e, soprattutto in presenza di disparità HLA nella coppia donatore/ricevente. In ambito di SCID, giova ricordare che, soprattutto quando il paziente non viene sottoposto ad alcun regime di condizionamento al trapianto o viene trattato con regimi a blanda intensità, si può osservare un attecchimento selettivo dei soli T linfociti del donatore, la restante emopoiesi, così come il compartimento B linfocitario, restando di origine del ricevente. Questo attecchimento selettivo dei T linfociti può esitare in una difettiva cooperazione T-B linfocitaria, con subottimale produzione immunoglobulinica.

La Graft versus Host Disease (GvHD), ovvero la malattia da trapianto contro l'ospite

La reattività delle cellule immunocompetenti allo-ge-niche contro i tessuti dell'ospite determina, invece, come più volte ricordato la reazione GvHD. Questa rappresenta a tutt'oggi una delle più rilevanti complicanze del TCSE, particolarmente nei casi di trapianto incompatibile, e con un impatto negativo soprattutto nelle patologie non neoplastiche. Dalle diverse casistiche, nel contesto del trapianto da donatore HLA-identico, l'incidenza della GvHD è quantificabile in circa il 30-50% dei casi; questa incidenza aumenta al 50-80% dei casi di trapianti da donatore non correlato (MUD, *matched unrelated donor*) o da familiari HLA parzialmente compatibili, in assenza di efficaci misure di T-deplezione in vitro o di modulazione dell'alloreattività. Inoltre, non solo il tipo di trapianto (il trapianto di sangue da cordone ombelicale correla con una più bassa probabilità di incidenza della GvHD) e il grado di compatibilità donatore-ricevente influenzano l'incidenza della GvHD, ma anche il regime di profilassi impiegato, così come altri fattori quali l'età del ricevente e del donatore, la disparità di sesso, la positività sierologica per CMV. Esistono evidenze che sia i linfociti T CD4⁺ sia i linfociti CD8⁺ possono giocare un ruolo rilevante nella fisiopatologia della GvHD insieme a citochine infiammatorie, quali l'interferone- γ (IFN- γ), il *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) e l'interleuchina-6. In particolare, nell'immediato post-trapianto gli alti livelli di citochine e l'induzione di espressione sulle cellule tissutali del ricevente di molecole di adesione possono rendere maggiormente reattivi i linfociti T infusi verso gli antigeni HLA del ricevente e in tal modo contribuire al danno tissutale della GvHD. Copelan e colleghi e in seguito altri ricercatori hanno postulato un meccanismo fisiopatologico della GvHD suddivisibile in tre fasi:

- 1) l'attivazione delle cellule presentanti l'antigene (*antigen-presenting cells*, APC), principalmente del ricevente;
- 2) l'attivazione, la differenziazione e la migrazione dei linfociti T alloreattivi del donatore;
- 3) l'attivazione degli effettori del donatore che mediano poi il danno tissutale.

Dosi elevate di agenti citostatici o di terapia radiante impiegate nel contesto dei regimi di condizionamento al trapianto danneggiano i tessuti, in particolare l'intestino, consentendo ai lipopolisaccaridi prodotti dai batteri di raggiungere i tessuti adiacenti e la circolazione sanguigna. Questo meccanismo determina l'attivazione di cellule diverse (APC, fase 1) con il rilascio di citochine infiammatorie TNF- α , interleuchina-1, interleuchina-6 e interleuchina-12. Come

elementi costitutivi dell'immunità innata neutrofilii, macrofagi ed eosinofili migrano nella sede di danno cellulare causando un'ulteriore lesione. Le cellule dendritiche, presentanti gli antigeni provenienti dalle cellule mucosali alterate, vengono attivate e migrano a livello degli organi linfoidi (in particolare nelle placche del Peyer) dove maturano. La cellula dendritica matura, a questo punto, è in grado di presentare gli antigeni alle cellule T del donatore e di indurre una risposta immunitaria con proliferazione delle cellule T allo-ge-niche e produzione di ulteriori citochine (interleuchina 12 e IFN- γ); la secrezione citochinica, a sua volta, promuove l'attivazione di cellule T citotossiche e di effettori principali del danno tissutale. Infine, con la soppressione dei meccanismi di regolazione, le cellule T attivate migrano nella circolazione ematica e vanno a danneggiare altri organi, in particolare fegato e cute. Quest'ultima fase di distruzione dei tessuti bersaglio è dunque mediata da un'azione sinergica di due classi di mediatori: cellulari (propri delle cellule T e, in parte, delle cellule NK) e solubili (interleuchina 12, interleuchina 1, IFN- γ e ossido nitrico).

Sono distinguibili due differenti "sindromi" distinte di GvHD, denominate GvHD acuta e GvHD cronica in relazione al tempo di insorgenza: la prima compare entro i primi 100 giorni mentre la seconda si sviluppa successivamente. La GvHD acuta si manifesta mediamente intorno al 15° giorno dopo l'infusione del midollo allogenico e rispecchia il complesso meccanismo patogenetico appena enunciato. Le sue caratteristiche cliniche ruotano intorno alla triade sintomatologica costituita da: rash cutaneo (Fig. 4), diarrea, disfunzione epatica (ittero colestatico). Non necessariamente tutti e tre gli organi vengono interessati, ma in relazione al livello di compromissione d'organo e alle manifestazioni cliniche, alla GvHD acuta viene dato un grado complessivo di gravità che va dal I al IV. La sopravvivenza a lungo termine nei pazienti con GvHD di grado superiore al II, non prontamente responsiva alla terapia di prima linea costituita da steroidi, risulta inferiore al 50%.

La GvHD cronica ha un tempo di comparsa successivo ai primi 100 giorni dal TMO allogenico e può far seguito a una GvHD acuta o insorgere *de novo*. Può interessare le stesse sedi della controparte acuta, ma solitamente la sua estensione è più sistemica con impegno di quasi tutti gli organi e apparati (cute, occhi, mucosa orale o esofagea, fegato, polmone, apparato neuromuscolare, intestino; può assumere le caratteristiche della sclerodermia, della cirrosi biliare o della bronchiolite obliterante). Il meccanismo fisiopatologico che connota la GvHD cronica è più complesso di quello della GvHD acuta e in parte an-

cora oscuro: se da un lato la forma cronica è assimilabile a quella acuta in termini di coinvolgimento patogenetico delle cellule T del donatore che sostengono una risposta alloimmune nei confronti di antigeni del ricevente, dall'altro la GvHD cronica è, per alcuni aspetti, simile alle malattie autoimmuni sia dal punto di vista clinico [lesioni cutanee o mucose lichenoidi e sclerodermiche (Fig. 5), rash malare, sindrome sicca Sjögren-like, artrite, contratture articolari, bronchiolite obliterativa, degenerazione dei dotti biliari e colestasi], sia per la presenza di autoanticorpi e aumentata produzione di collagene e fibrosi. In relazione alla compromissione d'organo che questa complicanza immunologica può determinare, la GvHD cronica può essere classificata come limitata o estesa.

La migliore comprensione dei fenomeni immunobiologici alla base della patogenesi della GvHD ha aperto la strada allo sviluppo di trattamenti immunosoppressivi diversificati e più raffinati rispetto all'impiego della terapia steroidea, che pur rimane il trattamento di prima linea nei pazienti che sviluppano questa complicanza. Sono largamente impiegati, infatti, come trattamenti di seconda linea anticorpi monoclonali specificatamente diretti verso i linfociti T attivati o verso citochine coinvolte nella risposta infiammatoria alloreattiva e strategie di immunomodulazione, quali quelle basate sull'impiego di MSCs o sulla fotochemioterapia extracorporea. È largamente da sottolineare che entrambe le forme di GvHD, acuta e cronica, incrementano la probabilità di sviluppo di complicanze infettive, sia per la loro natura deregolante un ordinato e armonico processo di ricostituzione immunologica post-trapianto, sia per l'effetto immunosoppressore delle terapie impiegate per il loro trattamento. Da quest'osservazione deriva evidentemente la crucialità di un attento monitoraggio delle complicanze infettive e una loro efficace profilassi o tempestivo trattamento pre-sintomatico.

GvL

La terza rilevante implicazione immunologica connessa al TCSE è il già più volte citato effetto *graft-versus-leukemia* (GvL), sinteticamente riassumibile nell'azione immunologica di cellule del donatore su antigeni (inclusi quelli minori di istocompatibilità) presenti sulla superficie delle cellule leucemiche e in grado di evocare una risposta immune. Infatti, oltre alla già menzionata alloreattività NK, le cellule T del donatore sono in grado di distruggere cellule leucemiche e possono, inoltre, reagire contro proteine aberranti espresse dal clone neoplastico (ad es. la proteinasi 3 nelle cellule mieloidi) inibendo la sua

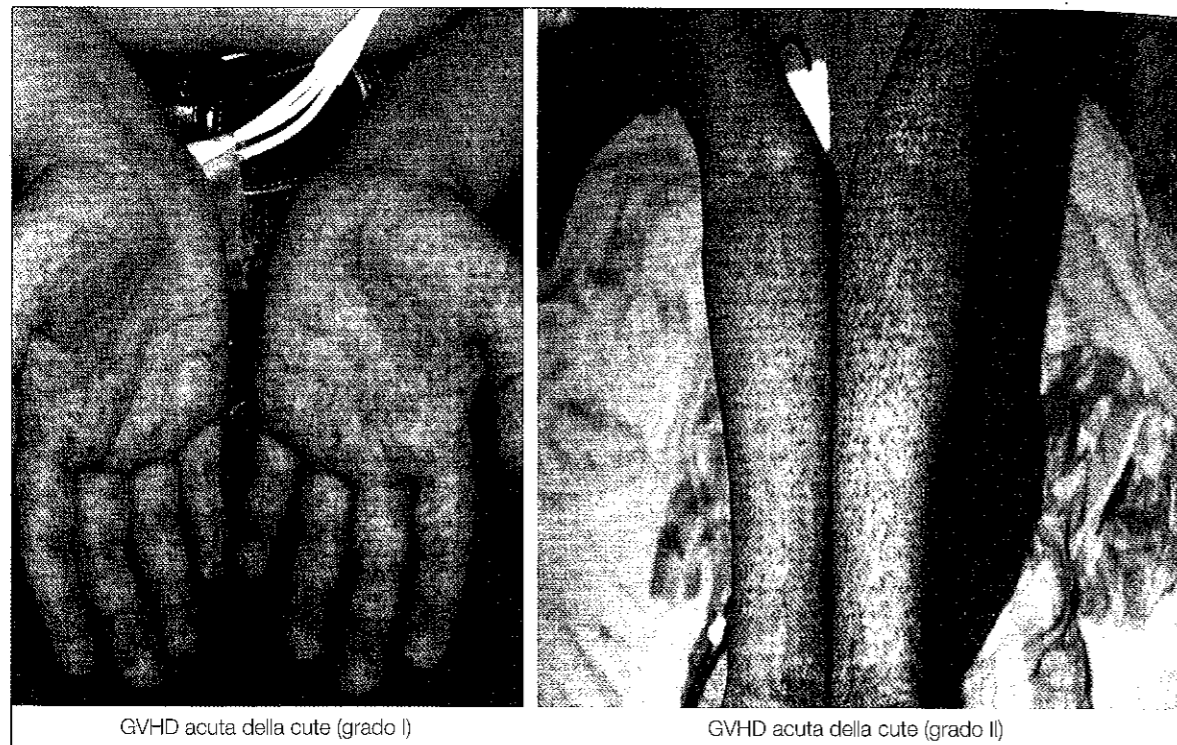


Figura 4. GVHD acuta cutanea.

crescita e preservando quella delle cellule normali. L'effetto GvL è responsabile di un'incidenza ridotta di recidiva neoplastica dopo trapianto allogenico (se confrontato con trapianto da gemello omozigote) e in pazienti che sviluppano la GvHD (se confrontati con pazienti nei quali questa evenienza non accade). Questi risultati rappresentano, inoltre, il razionale che sottende all'infusione di linfociti del donatore nel trattamento della recidiva leucemica, meglio se solo molecolare, dopo trapianto.

Uno sguardo al futuro: l'infusione di cellule geneticamente modificate con attività anti-tumorale

Gli ultimi anni sono stati caratterizzati da approcci di immunoterapia adottiva, basati sull'infusione di cellule dell'immunità innata o adottiva, opportunamente selezionate e attivate *ex vivo*. Come ben noto, l'avvento di tecniche d'ingegneria genetica ha permesso anche di sviluppare approcci terapeutici basati sull'introduzione di geni in cellule somatiche. Esempi di applicazione clinica coronata da successo in questo ambito sono rappresentati dal trattamento di bambini affetti da forme gravi di immunodeficienza primitiva SCID o sindrome di Wiskott-Aldrich. Più recentemente, importanti sforzi di ricerca

si sono concentrati sull'introduzione in T linfociti di sequenze geniche che codificano per recettori specifici diretti contro molecole espresse sulla superficie di elementi tumorali (*chimeric antigen receptors*, CAR). In ambito pediatrico, è di recentissima pubblicazione il trattamento di pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta (alcuni dei quali sottoposto ad allo-TCSE e infusi con cellule di derivazione del donatore) trattati con successo attraverso l'impiego di T linfociti trasdotti con un CAR specifico per la molecola CD19, espressa sulla superficie di cellule leucemiche a differenziazione B linfocitaria. L'associazione di questi CAR con sequenze in grado di mediare un segnale co-stimolatorio che ottimizza l'attivazione T linfocitaria ne aumenta in maniera considerevole l'attività, promuovendone sia la capacità di espansione-persistenza *in vivo*, sia la capacità litica sui bersagli tumorali. Limiti legati a questa straordinaria strategia terapeutica ineriscono alla possibile emergenza di cellule tumorali con espressioni di isoforme dell'antigene non riconosciute dal CAR e all'eccesso di attivazione e proliferazione di cellule coinvolte in una risposta infiammatoria. Per quest'ultimo aspetto, l'introduzione nel costruito genico che si viene a trasdurre di una sequenza che codifica per un gene suicida, come ad esempio quello della caspasi-9 inducibile prece-

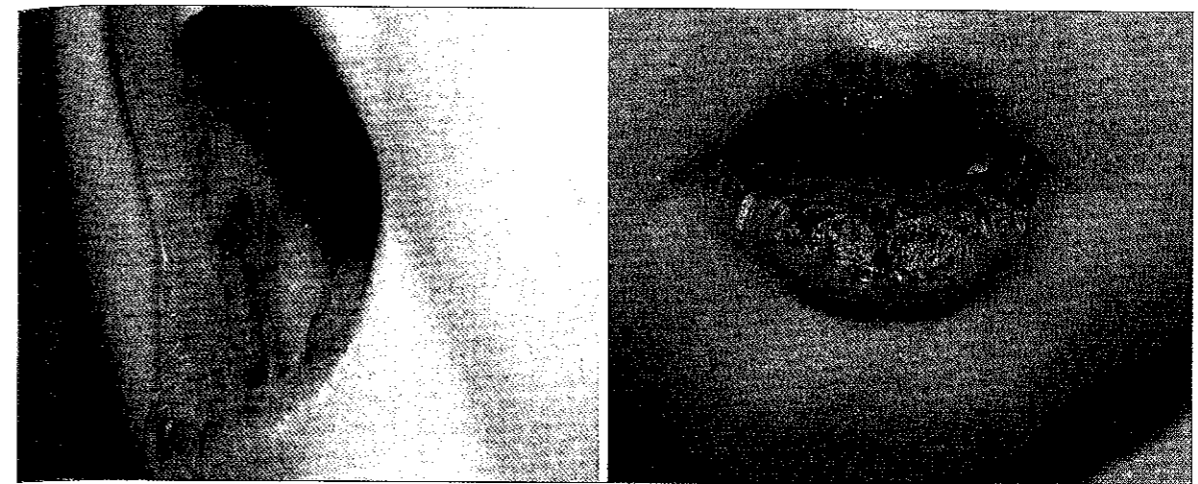


Figura 5. GVHD cronica: lesioni al cavo orale.

dentemente menzionato, può rappresentare un'utile strategia in grado di migliorare la sicurezza dell'approccio. Negli anni a venire, questi sofisticati approcci di bioingegneria cellulare troveranno vasta arena clinico-applicativa e certamente contribuiranno a rendere sempre più vicino il sogno di tutti gli oncologi pediatri: rendere il cancro una malattia guaribile in tutti i bambini che ne ammalano.

Bibliografia di riferimento

- Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. *Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome*. *Science* 2013;341:1233-151.
- Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. *Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency*. *N Engl J Med* 2009;360:447-58.
- Aversa F, Tabillo A, Terenzi A, et al. *Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum*. *Blood* 1994;84:3948-55.
- Aversa F, Tabillo A, Velardi A, et al. *Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype*. *N Engl J Med* 1998;339:1186-93.
- Aversa F, Terenzi A, Tabillo A, et al. *Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse*. *J Clin Oncol* 2005;23:3447-54.
- Bachar-Lustig E, Rachamim N, Li HW, et al. *Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice*. *Nat Med* 1995;1:1268-73.
- Baker JN, Davies SM, DeFor T, et al. *Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor marrow: results of a matched-pair analysis*. *Blood* 2001;97:2957-61.
- Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. *Umbilical cord-blood transplantation: the first 25 years and beyond*. *Blood* 2013;122:491-8.
- Ball LM, Egeler RM. *Acute GvHD: pathogenesis and classification*. *Bone Marrow Transplant* 2008;041(Suppl 2):S58-64.
- Barker JN, Scaradavou A, Stevens CE. *Combined effects of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies*. *Blood* 2010; 115:1843-9.
- Bautista G, Cabrera JR, Regidor C, et al. *Cord blood transplants supported by co-infusion of mobilized hematopoietic stem cells from a third-party donor*. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:365-73.
- Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, et al. *Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation*. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:200-7.
- Bernardo ME, Zecca M, Georgiani, et al. *Donor NK alloreactivity improves the outcome of children with hematological malignancies given transplantation of T-cell depleted peripheral blood haematopoietic stem cells from an HLA-disparate family donor*. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:S1655.
- Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, et al. *Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation*. *Blood* 2005;106:4397-406.
- Bertina A, Merli P, Rutella S, et al. *HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta^+$ T and B cells in children with nonmalignant disorders*. *Blood* 2014;124:822-6.
- Bertina A, Messina C, Masetti R, et al. *HLA haploidentical stem cell transplantation after removal of alpha/beta plus T-lymphocytes and B-lymphocytes: a new transplant option for children with life-threatening, non-malignant disorders lacking a HLA-identical donor*. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:S50.
- Bleakley M, Riddell SR. *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukemia effect*. *Nat Rev Cancer* 2004;4:371-80.

- Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. *Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity*. *Nat Rev Immunol* 2010;10:467-78.
- Burgio GR, Locatelli F. *Le risorse cellulari della vita*. Torino: UTET 2005.
- Burgio GR, Locatelli F. *Transplant of bone marrow and cord hematopoietic stem cells in children, revisited according to the fundamental principles of bioethics*. *Bone Marrow Transplant* 1997;19:1.163-8.
- Chaleff S, Otto M, Barfield RC, et al. *A large-scale method for the selective depletion of alphabeta T lymphocytes from PBSC for allogeneic transplantation*. *Cytotherapy* 2007;9:746-54.
- Christopherson KW 2nd, Hangoc G, Mantel CR, et al. *Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26*. *Science* 2004;305:1000-3.
- Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, et al. *Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study*. *Lancet Oncol* 2009;10:489-500.
- Comoli P, Basso S, Zecca M, et al. *Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation*. *Am J Transplant* 2007;7:1648-55.
- Copelan EA. *Hematopoietic stem cell transplantation*. *N Engl J Med* 2006;354:1813-26.
- Cutler C, Multani P, Robbins D, et al. *Prostaglandin-modulated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood* 2013;122:3074-81.
- De Lima M, McNiece I, Robinson SN, et al. *Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture*. *N Engl J Med* 2012;367:2305-15.
- Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. *Adoptive immunotherapy with tregs and icons ensures low TRM and a low incidence of post transplant leukaemia relapse after HLA haploidentical transplants for acute leukemia*. *Blood* 2011;118:76.
- Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. *Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy*. *N Engl J Med* 2011;365:1673-83.
- Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, et al. *Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study*. *Lancet* 2007;369:1947-54.
- Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. *CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation*. *Nat Med* 2003;9:1144-50.
- Frasson F, Gualandi F, Podesta M, et al. *Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study*. *Lancet Oncol* 2008;9:831-9.
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA identical sibling*. *N Engl J Med* 1989;321:1174-8.
- Gluckman E, Rocha V. *Cord blood transplantation for children with acute leukemia: a Eurocord registry analysis*. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:271-3.
- Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, et al. *Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation*. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:751-7.
- Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. *Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia*. *N Engl J Med* 2013;368:1509-18.
- Handgretinger R, Lang P, Feuchtinger TF, et al. *Transplantation of TcR alpha beta/CD19 depleted stem cells from haploidentical donors: robust engraftment and rapid immune reconstitution in children with high risk leukemia*. *Blood* 2011;118:460-60.
- Holowiecki J. *Indications for hematopoietic stem cells transplantation*. *Pol Arch Med Wewn* 2008;118:658-63.
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. *Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation*. *Blood* 1990;75:555-62.
- Hoyos V, Savoldo B, Dotti G. *Genetic modification of human T lymphocytes for the treatment of hematologic malignancies*. *Haematologica* 2012;97:1622-31.
- Huang XJ, Han W, Xu LP, et al. *A novel approach to human leukocyte antigen-mismatched transplantation in patients with malignant hematological disease*. *Chin Med J* 2004;117:1778-85.
- Johannesson L, Jaryholm S. *Uterus transplantation: current progress and future prospects*. *Int J Women Health* 2016;8:43-51.
- Jones RJ, Barber JP, Vala MS, et al. *Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells*. *Blood* 1995;85:2742-6.
- Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al. *Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome*. *Blood* 2014;124:188-95.
- Liu H, Rich ES, Godley L, et al. *Reduced-intensity conditioning with combined haploidentical and cord blood transplantation results in rapid engraftment, low GVHD, and durable remissions*. *Blood* 2011;118:6438-45.
- Locatelli F, Burgio GR. *Transplant of hematopoietic stem cells in childhood: where we are and where we are going*. *Hematologica* 1998;83:550-63.
- Locatelli F, Kabbara N, Ruggieri A, et al. *Outcome of patients with hemoglobinopathies given either cord blood or bone marrow transplantation from an HLA identical sibling*. *Blood* 2013;122:1072-8.
- Locatelli F, Pende D, Mingari MC, et al. *Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells*. *Front Immunol* 2013;4:15.
- Locatelli F, Rocha V, Chastang C, et al. *Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia*. *Eurocord-Cord Blood Transplant Group*. *Blood* 1999;93:3662-71.
- Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. *HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide*. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:641-50.
- Mandelli F, Avisati G, Arcese W, et al. *Ematologia*. Forum Service Editore 1998.
- Matsumoto S, Tomiva M, Sawamoto O. *Current status and future of clinical islet xenotransplantation*. *J Diabetes* 2016;8:483-93.
- Maus MV, Grupp SA, Porter DL, et al. *Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies*. *Blood* 2014;123:2625-35.
- McCullough J, Hansen J, Perkins H, et al. *The National Marrow Donor Program: how it works, accomplishments to date*. *Oncology (Williston Park)* 1989;3:63-8.
- Medawar PB. *Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain to subcutaneous tissue and to the anterior chamber of the eye*. *Br J Exp Pathol* 1948;29:58-69.
- Messina C, Locatelli F, Lanino E, et al. *Extracorporeal photochemotherapy for pediatric patients with graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation*. *Br J Haematol* 2003;122:118-27.
- Miller RG. *An immunological suppressor cell inactivating cytotoxic T-lymphocyte precursor cells recognizing it*. *Nature* 190;287(5782):544-546.
- Moldrem JJ, Clave R, Jiang YZ, et al. *Cytotoxic T lymphocytes specific for a non polymorphic proteinase 3 peptide preferentially inhibit chronic myeloid leukaemia colony-forming units*. *Blood* 1997;90:2529-34.
- Moretta A, Bottino C, Pende D, et al. *Identification of four subsets of human CD3-CD16⁺ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition*. *J Exp Med* 1990;172:1589-98.
- Moretta A, Locatelli F, Moretta L. *Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias*. *Immunol Rev* 2008;224:58-69.
- Munchel A, Kesserwan C, Symons HJ, et al. *Nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation with high dose, post-transplantation cyclophosphamide*. *Pediatric Rep* 2011;3(Suppl 2):e15.
- Niederkerk JY. *See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege*. *Nat Immunol* 2006;7:354-59.
- Oevermann L, Lang P, Feuchtinger T, et al. *Immune reconstitution and strategies for rebuilding the immune system after haploidentical stem cell transplantation*. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1266:161-70.
- Peccatori et al. *In-vivo T-regs generation by rapamycin-myophenolate-ATG as a new platform for GVHD prophylaxis in T-cells repleted unmanipulated haploidentical peripheral stem cell transplantation: result in 59 patients*. *Bone Marrow Transplant* 2010;45(Suppl 2):O88.
- Peggs KS, Thomson K, Hart DP, et al. *Dose-escalated donor lymphocyte infusions following reduced intensity transplantation: toxicity, chimerism and disease responses*. *Blood* 2004;103:1548-56.
- Pession A, Masetti R, Rizzari C, et al. *Results of the AIEOP AML 2002/01 multicenter prospective trial for the treatment of children with acute myeloid leukemia*. *Blood* 2013;122:170-8.
- Prigozhina TB, Gurevitch O, Zhu J, et al. *Permanent and specific transplantation tolerance induced by a nonmyeloablative treatment to a wide variety of allogeneic tissues: I. Induction of tolerance by a short course of total lymphoid irradiation and selective elimination of the donor-specific host lymphocytes*. *Transplantation* 1997;63:1394-9.
- Reddy P, Arora M, Guimond M, et al. *GvHD: a continuing barrier to the safety of allogeneic transplantation*. *Blood* 200;95:2754-9.
- Reisner Y, Hagin D, Martelli MF. *Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives*. *Blood* 2011;118:6006-17.
- Robinson SN, Ng J, Niu T, et al. *Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. *Bone Marrow Transplant* 2006;37:359-66.
- Robinson SN, Thomas MW, Simmons PJ, et al. *Fucosylation with fucosyltransferase VI or fucosyltransferase VII improves cord blood engraftment*. *Cytotherapy* 2013.
- Rocha V, Cornish J, Sivers EL, et al. *Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia*. *Blood* 2001;97:2962-71.
- Rocha V, Locatelli F. *Searching for alternative hematopoietic stem cell donor for pediatric patients*. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:207-14.
- Rocha V, Wagner JE, Sobocinski KA, et al. *Graft versus host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling*. *Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources*. *N Engl J Med* 2000;342:1846-54.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. *Science* 2002;295:2097-100.
- Seggewiss R, Einsele H. *Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update*. *Blood* 2010;115:3861-8.
- Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, et al. *Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer Discov* 2016;6:664-79.
- Volpi et al. *Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic transplants*. *Blood* 2001;97:2514-21.
- Wagner JE, Eapen M, Carter SL, et al. *One-unit versus two-unit cord-blood transplantation for hematologic cancers*. *N Engl J Med* 2014;371:1685-94.
- Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, et al. *Allogeneic sibling umbilical cord-blood transplantation in children with malignant and non malignant disease*. *Lancet* 1995;346:214-9.
- Zecca M, Locatelli F. *Management of graft-versus-host disease in pediatric bone marrow transplant recipients*. *Pediatr Drugs* 2000;2:29-55.
- Zecca M, Prete A, Rondelli R, et al. *Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors and impact on outcome*. *Blood* 2002;100:1192-200.