

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO



Dipartimento di Oncologia

Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche ed Oncologia

XXX ciclo

Incidenza di effetti tardivi dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche in pazienti pediatriche affette da leucemia acuta e trattate con Irradiazione Corporea Totale o con Busulfano: risultati di uno studio retrospettivo AIEOP (Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica).

Candidato

Dott. Francesco Saglio

Tutor

Prof. Massimo Aglietta

Coordinatore del Dottorato

Prof. Emilio Hirsch

Settore Scientifico Disciplinare: MED 06 (Oncologia Medica)

Anni Accademici: 2014- 2018

INDICE

INDICE	2
1. INTRODUZIONE	4
1.1 Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche	4
1.1.1 Definizione	4
1.1.2 Cenni storici.....	4
1.1.3 Principali attuali indicazioni all'alloHSCT in ambito oncologico pediatrico.....	7
1.2 Effetti tardivi del trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.....	10
1.2.1 Considerazioni generali.....	10
1.2.2 Effetti tardivi oculari	11
1.2.3 Effetti tardivi sulla cute.....	12
1.2.4 Alterazioni della funzionalità tiroidea	13
1.2.5 Alterazioni della funzionalità gonadica	13
1.2.6 Alterazioni della crescita.....	15
1.2.7 Alterazioni della funzionalità polmonare.....	15
1.2.8 Alterazioni della funzionalità cardio-circolatoria	16
1.2.9 Alterazioni della funzionalità renale	16
1.2.10 Alterazioni della funzionalità epatica.....	17
1.2.11 Seconde neoplasie maligne	18
1.3 Il regime di condizionamento	19
1.3.1 Considerazioni generali	19
1.3.2 L' irradiazione coroporea totale (TBI)	19
1.3.3 Il Busulfano.....	20
1.3.4 Esperienze cliniche di confronto fra Busulfano e TBI.....	21
2. RAZIONALE DELLO STUDIO.....	23
3. MATERIALI E METODI.....	23
3.1 Pazienti e procedura trapiantologica.	23
3.2 Definizioni e principali end-points indagati.....	24
3.3 Analisi statistica	25
4. RISULTATI.....	26

4.1	Pazienti.....	26
4.2	Alterazioni della Crescita	26
4.3	Alterazioni della funzionalità gonadica	26
4.4	Alterazioni della funzionalità tiroidea.....	27
4.5	Cataratta.....	27
4.6	Neoplasie Maligne Secondarie	27
4.7	Alterazioni della funzionalità polmonare	28
5.	DISCUSSIONE E SVILUPPI FUTURI	28
6.	TABELLE E FIGURE	32
7.	BIBLIOGRAFIA	46

1. INTRODUZIONE

1.1 IL TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

1.1.1 Definizione

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche è una procedura terapeutica complessa che consiste nella soppressione parziale o totale della funzione emopoietica e immunologica esercitata dal midollo osseo e nella sua stabile sostituzione con cellule staminali emopoietiche derivanti da un altro soggetto, al fine di ridurre la probabilità di recidiva nel caso di patologie neoplastiche maligne o di correggere eventuali difetti intrinseci alla stessa nel caso delle patologie congenite.

1.1.2 Cenni storici

I fondamenti scientifici del trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (alloHSCT) risalgono al 1949 quando Jacobson et al dimostrarono la possibilità di re-instaurare la funzione emopoietica infondendo per via intraperitoneale cellule spleniche in topi sottoposti ad irradiazione letale (1). Qualche anno più tardi Lorenz et al arrivarono a conclusioni analoghe infondendo cellule derivanti dal midollo osseo (2). Inizialmente questo effetto protettivo fu attribuito a fattori umorali ma, grazie agli studi funzionali di Main e di Trentin attorno alla metà degli anni Cinquanta, fu evidenziato come la ricostituzione della funzionalità immunologica fosse determinata dal trasferimento dei progenitori cellulari che esercitano questa funzione (3, 4). Tale dato fu in seguito anche confermato da Ford et al a livello molecolare (5). Alla luce di questi dati incoraggianti furono tentate alcune procedure in pazienti terminali a scopo compassionevole (6, 7) ma presto si presentò la necessità di tornare a svolgere studi sul modello animale al fine di fare luce sui numerosi aspetti della procedura che risultavano ancora oscuri. A tale scopo fu scelto il modello canino attraverso il quale fu evidenziato come le problematiche principali riguardanti l'alloHSCT fossero costituite dal mancato attecchimento dei progenitori emopoietici trapiantati, dal rigetto degli stessi, da quella che inizialmente venne identificata come "severe secondary disease", oggi definita malattia da trapianto contro l'ospite (GvHD), e dalle infezioni opportunistiche.

Allo stesso tempo da questi studi pre-clinici emerse la possibilità per una quota di animali di non sviluppare queste complicanze e di diventare, grazie all'infusione dei progenitori emopoietici trasferiti con il trapianto, chimere lungo sopravviventi (8). Il motivo di queste differenze in termini di outcome fu svelato nei primi anni Sessanta grazie alla scoperta del sistema dell'istocompatibilità (9), che consentì di elucidare i motivi per cui alcuni animali sopportavano la procedura diventando di fatto chimere lungo sopravviventi mentre altri soccombevano poco dopo il trapianto. La scoperta dei principi dell'istocompatibilità e la loro applicazione nel contesto clinico nella selezione del donatore determinò un importante miglioramento nella prognosi dei pazienti sottoposti ad alloHSCT, che dagli anni Settanta iniziò a essere considerato una procedura di pratica clinica consolidata fra soggetti familiari con lo stesso assetto HLA (10). Inizialmente la possibilità di accedere all'alloHSCT era riservata ai pazienti che disponevano di un donatore familiare istocompatibile, ma nel 1979 fu riportata per la prima volta la possibilità di praticare l'alloHSCT fra individui non consanguinei ma istocompatibili (11): questa osservazione e gli studi successivi che ne scaturirono fornirono le basi scientifiche per la nascita dei Registri di Donatori Volontari e l'alloHSCT iniziò ad essere praticato anche fra soggetti non familiari. Negli anni a venire si è assistito a un progressivo e graduale miglioramento della prognosi dei pazienti sottoposti ad alloHSCT correlato all'affinamento delle tecniche di tipizzazione del sistema d'istocompatibilità (HLA), all'introduzione di regimi di condizionamento efficaci e con profili di tossicità gestibili, allo sviluppo di farmaci immunosoppressori innovativi e al miglioramento della terapia di supporto. In questo panorama in continua evoluzione occorre citare due importanti eventi che hanno consentito di aumentare ulteriormente i potenziali beneficiari di questo tipo di terapia: ossia la possibilità di impiegare come fonti di cellule staminali il sangue periferico e il sangue da cordone ombelicale. La possibilità di incrementare la piccola percentuale di cellule staminali ematopoietiche presenti fisiologicamente a livello del sangue periferico era stata già ampiamente dimostrata da parecchi anni ma la necessità di somministrare un trattamento citostatico per ottenere un numero di cellule sufficiente per ri-costituire la funzionalità emopoietica dopo terapia mielo-ablativa ne aveva limitato l'impiego al contesto del trapianto autologo (12) in soggetti affetti da patologie oncologiche maligne. Grazie alla scoperta del G-

CSF (13) e all'elucidazione del suo profilo di tossicità limitato si è iniziato a sottoporre i donatori sani a mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche (PBSC) al fine di eseguire alloHSCT (14): attualmente si stima che circa il 60% di tutti gli alloHSCT in Europa siano eseguiti utilizzando questa fonte. Tuttavia, la dimostrazione da parte di studi randomizzati e controllati di un rischio incrementato di sviluppare GvHD sia acuta che cronica (15, 16) impiegando PBSC come fonte cellulare ha fatto sì che in ambito pediatrico venga tuttora comunque preferito l'impiego del sangue midollare. L'identificazione a livello del sangue cordonale (CB) di una percentuale non trascurabile di cellule staminali ematopoietiche (17) e la scoperta della loro capacità di restaurare la funzionalità ematopoietica dopo somministrazione di terapia mieloblastica nel modello animale murino (18) hanno fornito le basi per l'impiego del CB come fonte cellulare nell'ambito dell'alloHSCT. Il primo alloHSCT CB fu eseguito con successo nel 1988 dal gruppo di Gluckman a Parigi (19) e in virtù delle successive esperienze maturate su ampie serie di pazienti sia adulti sia pediatrici, oggi costituisce un'importante opzione terapeutica per quei pazienti che necessitano di un alloHSCT ma che non dispongono di un donatore familiare compatibile o che non sono in grado di reperire un donatore nei registri dei donatori volontari. La problematica del reperimento di un donatore compatibile e la possibilità di ridurre l'incidenza di GvHD mediante la rimozione dei linfociti T hanno determinato in seguito anche lo sviluppo di un'ulteriore tipologia di approccio trapiantologico basata sull'impiego di un donatore familiare convivente con il ricevente solo uno dei due aplotipi che contribuiscono alla definizione dell'assetto HLA: il trapianto aploidentico, che insieme all'alloHSCT CB rappresenta una delle evoluzioni più recenti di questo tipo di approccio (20). Un'ulteriore evoluzione nel concetto di alloHSCT è rappresentata dal trapianto non mieloablativo (RIC: Reduced Intensity Conditioning). Questa tipologia di trapianto, nata con la finalità di ridurre l'incidenza di eventi tossici correlati con la somministrazione di un regime di condizionamento mieloablativo tradizionale, al fine di poter sottoporre ad alloHSCT anche i pazienti più anziani o con comorbidità multiple, identifica nell'effetto immunologico esercitato dalle cellule del donatore l'elemento chiave della procedura, ridefinendo il ruolo del regime di condizionamento, che risulta semplicemente finalizzato a consentire l'attecchimento delle cellule del donatore (21). L'alloHSCT RIC è ormai

un'opzione terapeutica consolidata nell'ambito delle strategie trapiantologiche del paziente adulto anziano, ma che in relazione al profilo di tossicità ridotta è in fase di valutazione anche in alcuni contesti pediatrici.

1.1.3 Principali attuali indicazioni all'alloHSCT in ambito oncologico pediatrico.

La patologia oncologica più frequente in ambito pediatrico è la leucemia linfoblastica acuta (ALL), tuttavia la buona prognosi di questa patologia spesso ottenuta grazie ad un approccio chemioterapico multimodale (22) riserva un ruolo all'alloHSCT solamente nel trattamento delle forme ad alto rischio o refrattarie/recidivanti. La continua ri-definizione dei parametri di attribuzione del rischio (23) nella ALL rende difficile confrontare i risultati dei diversi trials clinici onde estrapolarne informazioni certe e precise circa i casi che necessitano di un consolidamento mediante alloHSCT in prima remissione di malattia, tuttavia esistono evidenze che l'alloHSCT sia in grado di offrire dei benefici rispetto alla sola chemioterapia nel trattamento delle forme associate a presenza di t(9;22) (24), delle forme con ri-arrangiamenti a carico del gene MLL (25), delle forme che originano da progenitori T estremamente immaturi e delle forme che rispondono più lentamente alla terapia di induzione (26). I pazienti affetti da ALL che presentano una recidiva midollare di malattia, nonostante molto spesso raggiungano una seconda remissione di malattia con la sola chemioterapia, in relazione all'elevato rischio di una ulteriore recidiva presentano indicazione assoluta ad eseguire consolidamento con alloHSCT (27). Riguardo alla Leucemia Mieloide Acuta (AML) in ambito pediatrico esiste un consenso ormai assodato e unanime nel considerare l'alloHSCT la migliore terapia di consolidamento nella disponibilità di un donatore familiare HLA identico (28). Nel caso di mancanza di un donatore compatibile la procedura trapiantologica ha dimostrato essere in grado di ridurre notevolmente il rischio di recidiva per i pazienti considerati ad alto rischio dopo la fase d'induzione senza un significativo incremento della mortalità legata agli effetti tossici (29) mentre nel caso dei pazienti a basso rischio la riduzione delle probabilità di recidiva non è risultata in grado di giustificare la mortalità correlata alla tossicità della procedura (30). Anche nell'ambito della AML sta assumendo importanza crescente il concetto di stratificazione di rischio di recidiva in base alle caratteristiche biologiche delle

cellule neoplastiche alla diagnosi e alle modalità di risposta ai trattamenti di induzione iniziali e in futuro questa stratificazione verrà applicata anche la selezione dei pazienti candidati ad alloHSCT (31).

Le mielodisplasie (MDS) sono una patologia rara in età pediatrica che rappresenta circa il 5% di tutte le forme neoplastiche maligne in questa fascia di età (32). Queste comprendono alcune forme analoghe a quelle descritte nell'adulto come la citopenia refrattaria (RC) l'anemia refrattaria con eccesso di blasti (RAEB), l'anemia refrattaria in trasformazione (RAEB-t) e le forme secondarie a precedenti trattamenti chemio e radioterapici (sMDS) e forme più tipiche dell'età pediatrica come la Juvenile Myelomonocytic Leukemia (JMML). L'alloHSCT rappresenta l'unica possibilità terapeutica efficace con fini curativi per i pazienti affetti da JMML (33) mentre per le restanti forme di MDS normalmente l'alloHSCT è indicato nel caso di elevato rischio di trasformazione leucemica [RAEB, RAEB-t, sMDS, RC con anomalie citogenetiche associate (monosomia cromosoma 7, cariotipi complessi)] o nei casi in cui la patologia stessa esponga il paziente ad un rischio importante di presentare complicanze gravi (RC associata a neutropenia severa o trasfusione-dipendenza) (34). Fra le patologie mieloproliferative, in ambito pediatrico la leucemia mieloide cronica (CML) rappresenta l'unica entità nosologica con un'incidenza rilevante (1 caso ogni 10000 abitanti) (35). I dati disponibili indicano che l'alloHSCT risulta curativo nella maggior parte dei pazienti pediatrici affetti da CML ma che la procedura è gravata da una mortalità non trascurabile soprattutto per i pazienti sottoposti a trapianto da donatore non correlato non identico (36). Lo scenario è mutato con la scoperta e l'introduzione nella pratica clinica degli inibitori delle tirosino-chinasi (TKI). E' possibile che in futuro la scelta di sottoporre ad alloHSCT i pazienti pediatrici dovrà essere bilanciata con i risultati promettenti che si stanno iniziando ad osservare con l'impiego dei TKI, tuttavia la lunga aspettativa di vita di questi pazienti associata alla carenza di evidenze che questi ultimi siano in grado di eradicare o per lo meno controllare la malattia sul lungo termine fanno sì che l'alloHSCT resti il trattamento di scelta per la CML in ambito pediatrico, a patto che sia disponibile un donatore con un buon grado di compatibilità HLA. L'alloHSCT nel contesto del Linfoma di Hodgkin (HL) riveste un ruolo nel trattamento delle forme che recidivano dopo trapianto autologo o delle forme con plurime recidive. Quello che sembra emergere dalle esperienze maturate fino ad

ora è una tendenza ad una migliore sopravvivenza libera da malattia e ad una ridotta mortalità trapianto correlata con l'impiego di strategie RIC (37, 38), tuttavia sono ancora numerosi i quesiti che necessitano di essere chiariti e al momento l'eleggibilità dei pazienti affetti da HL ad alloHSCT risulta condizionata alla partecipazione a trials sperimentali. Nel caso dei linfomi non Hodgkin (NHL) l'alloHSCT rappresenta una possibile strategia terapeutica che deve essere considerata specialmente per i pazienti con malattia refrattaria o recidivante (39). L'ultima categoria di patologie neoplastiche maligne con una potenziale indicazione ad alloHSCT in età pediatrica è rappresentata da alcune forme di tumori solidi, tuttavia tale approccio in questo contesto non essendo ancora supportato da evidenze scientifiche che ne dimostrino l'efficacia resta da contestualizzare all'interno di protocolli sperimentali.

1.2 EFFETTI TARDIVI DEL TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

1.2.1 Considerazioni generali.

In relazione all'incremento del numero totale di alloHSCT eseguiti ogni anno e al concomitante miglioramento della prognosi dei pazienti sottoposti a questa procedura il numero complessivo di pazienti lungo-sopravvissuti è destinato ad incrementare nel corso degli anni (40). L'obiettivo principale del trapianto continua ad essere la guarigione dalla patologia per cui questo viene eseguito, tuttavia, soprattutto in ambito pediatrico, particolare attenzione deve essere posta nel tentativo di fare recuperare ai pazienti uno stato di salute normale caratterizzato da benessere fisico e psicologico e da un adeguato grado di re-integrazione nel contesto della vita di ogni giorno (lavoro, famiglia, relazioni sociali). Purtroppo, nonostante il miglioramento dei risultati di sopravvivenza ottenuti grazie all'alloHSCT, i pazienti che sopravvivono più di due anni dopo il trapianto presentano comunque una aspettativa di vita ridotta, sia rispetto alla popolazione generale, sia rispetto ai pazienti affetti da forme neoplastiche maligne trattati con la sola chemioterapia, e, dopo l'alloHSCT il tasso di mortalità si mantiene incrementato per più di 20 anni in relazione ad un'incrementata morbilità (41). La probabilità di lungo-sopravvivenza post alloHSCT dipende da diversi fattori che sono rappresentati da alcune caratteristiche del paziente (età, sesso, comorbidità pre-trapianto), dalla patologia di base, dallo stato di remissione di malattia al trapianto (nel caso delle patologie maligne), dalla tipologia di regime di condizionamento, dalla fonte cellulare, dalla tipologia del donatore e dall'eventuale sviluppo di complicanze post trapianto.

Gli eventi tardivi post trapianto possono essere definiti come tutte quelle complicanze secondarie alla procedura trapiantologica che si verificano dopo tre mesi dalla stessa e che determinano un'alterazione dello stato di salute durante la lungo-sopravvivenza. Si tratta per lo più di problematiche croniche la cui insorgenza può essere o una conseguenza diretta della procedura (es: infertilità secondaria alla somministrazione di farmaci gonodatossici nel regime di condizionamento) o una conseguenza del trattamento di una complicanza (es: osteoporosi secondaria al trattamento steroideo protratto per il trattamento di GVHD). In pratica ogni organo può essere bersaglio di tossicità a lungo a termine

e secondo quanto recentemente riportato in letteratura una corretta gestione di questa problematica risulta incentrata su due cardini che sono rappresentati dalla prevenzione e dalla precoce identificazione di eventuali problematiche finalizzata ad un tempestivo trattamento con conseguente miglioramento dei risultati terapeutici. In relazione all'importanza della qualità di vita post trapianto dei pazienti sottoposti a questa procedura in età pediatrica, sono state redatte apposite linee guida di monitoraggio basate sull' identificazione di specifici fattori di rischio per lo sviluppo di ogni singolo effetto tardivo (42).

1.2.2 Effetti tardivi oculari

Gli effetti tardivi oculari possono essere ricondotti essenzialmente a due quadri clinici che sono rappresentati dalla cataratta e dalla cherato-congiuntiviti (43).

La cataratta è rappresentata da un'opacizzazione del cristallino che solitamente si sviluppa in modo graduale con un calo del visus in particolari circostanze (esempio in situazioni di luminosità particolarmente intensa) associato a visione offuscata e ad alterazione della percezione dei colori. La diagnosi viene posta solitamente a seguito dell'esame specialistico mediante lampada a fessura del segmento anteriore dell'occhio. La terapia è essenzialmente chirurgica e consiste nella rimozione del cristallino e nella sua sostituzione con una lente artificiale finalizzata al ripristino della trasparenza dei mezzi diottrici dell'occhio. I principali fattori di rischio trapianto correlati per lo sviluppo di questa complicanza sono rappresentati dall'impiego protratto di steroidi e dall'impiego nell'ambito del regime di condizionamento della TBI (44). I quadri di cherato-congiuntivite si inseriscono solitamente nel contesto più ampio di una sindrome secca, caratterizzata anche da alterazioni della produzione salivare e di secrezioni a livello anale e genitale, secondaria per lo più ad un interessamento da parte di GvHD cronica della componente ghiandolare esocrina rispettivamente delle ghiandole lacrimali, salivari e del distretto ano-genitale. Le manifestazioni cliniche della cherato-congiuntivite includono ridotta produzione lacrimale, secchezza ed irritazione dell'occhio, congiuntivite sterile, e abrasioni e/o ulcere corneali. La diagnosi anche in questo caso viene posta sulla base dell'esame specialistico del segmento anteriore dell'occhio e può essere confermata dal test di Schirmer. La terapia è basata sulla gestione della terapia

della GvHD che a livello locale può anche avvalersi di farmaci topici finalizzati alla re-integrazione e/o alla sostituzione del film lacrimale (45).

1.2.3 Effetti tardivi sulla cute

La presenza di alterazioni cutanee e/o a carico degli annessi cutanei (unghie, capelli e sistema pilifero) che si sviluppano a distanza dall' alloHSCT è abbastanza frequente dopo il trapianto e solitamente risulta riconducibile a GvHD. La GvHD cronica cutanea può svilupparsi spontaneamente o può essere secondaria all' esposizione ai raggi UV, a traumi meccanici o infezioni.

La manifestazione più comune di GvHD cutanea è rappresentata dalla xerosi cutanea. Le manifestazioni più serie di GvHD cutanea sono meno frequenti e risultano riconducibili a quadri di lesioni lichenoidi e di sclerodermia. Nella prima solitamente la cute è solitamente intatta e si presenta xerosica, con alterazioni della pigmentazione e con lesioni maculo-papulari tipo lichen planus spesso pruriginose. Le forme sclerodermiche sono caratterizzate da ulcerazioni che spesso vanno incontro a sovra-infezione e a alterazioni sclerotiche dei tessuti sottocutanei. Nei casi più gravi l'interessamento del tessuto sottocutaneo può arrivare a provocare retrazioni articolari associate ad impotenza funzionale. La distrofia, la fragilità o la perdita delle unghie sono segni distintivi di GvHD. L'alopecia, la perdita dei peli a livello cutaneo e la precoce depigmentazione sono segni caratteristici di GvHD cutanea cronica che non risultano diagnostici ma che hanno un impatto importante sulla qualità di vita dei pazienti (46) . La diagnosi è essenzialmente clinica e può essere integrata e/o confermata su base istopatologica. La gestione di questo tipo di complicanza è basata essenzialmente su un'attività di prevenzione finalizzata all'educazione dei pazienti sui potenziali rischi connessi con l'esposizione UV, sulla precoce individuazione della GvHD cutanea e sulla terapia sia topica che sistemica. Inoltre, nelle forme sclerodermiche, al fine di mantenere un adeguato range di movimento articolare è consigliabile il consulto con specialisti di terapia fisica e riabilitazione finalizzato alla pianificazione di interventi finalizzati al mantenimento di una motilità adeguata (47). Un'altra categoria importante di late-effects cutanei è rappresentata dalle neoplasie maligne secondarie, pertanto risulta consigliabili valutazioni specialistiche annuali o su indicazione

specialistica finalizzate alla precoce identificazione di forme maligne sia di tipo melanoma sia di tipo non melanoma (48).

1.2.4 Alterazioni della funzionalità tiroidea

Le alterazioni della funzionalità tiroidea sono un effetto tardivo frequente spesso associato alla somministrazione di TBI nel regime di condizionamento (49).

Forme asintomatiche di ipotiroidismo caratterizzate da ormone tireostimolante (TSH) elevato e livelli normali di fT4 sono le alterazioni più frequenti della funzionalità tiroidea post alloHSCT (50). Nella maggior parte dei casi si tratta di forme transitorie a risoluzione spontanea. L'insorgenza di un quadro di ipotiroidismo conclamato clinicamente è variabile e dipende dai fattori di rischio (es irradiazione della regione del collo e/o TBI) a cui il paziente è stato esposto. Forme autoimmuni come la tiroidite di Hashimoto o la malattia di Graves secondarie a GvHD sono stati riportati (51). Lo screening annuale della funzionalità tiroidea mediante esame clinico e dosaggio plasmatico di TSH e fT4 è raccomandato nei pazienti a rischio di tossicità tiroidea (pregressa irradiazione del collo e/o TBI) o all'insorgenza di sintomatologia specifica. Il dosaggio degli anticorpi specifici (anticorpi antitireoglobulina e anticorpi antitireoperossidasi) viene solitamente eseguito a seguito del riscontro di un'alterazione del profilo ormonale tiroideo. La terapia sostitutiva è raccomandata per i pazienti con ipotiroidismo sintomatico e dovrebbe essere gestita dallo specialista endocrinologo sulla base di aggiustamenti guidati dal dosaggio del TSH sierico; per i pazienti con forme di ipotiroidismo clinicamente silente il ruolo della terapia sostitutiva resta controverso, tuttavia in ambito pediatrico anche in relazione all'importanza del corretto funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide nello sviluppo del soggetto in evoluzione questa tende ad essere prontamente instaurata. Una valutazione ecografica della tiroide viene per lo più svolta periodicamente anche per valutare l'eventuale insorgenza di neoplasie maligne secondarie (52).

1.2.5 Alterazioni della funzionalità gonadica

Gli effetti tardivi a carico delle gonadi dopo l'alloHSCT dipendono essenzialmente dall'età del paziente e dalla tipologia di regime di condizionamento impiegato. In linea generale il tessuto ovarico risulta

maggiormente vulnerabile rispetto ai testicoli. Nelle pazienti di sesso femminile, l'infertilità e l'ipogonadismo ipergonadotropo sono estremamente comuni e per lo più associate alla somministrazione di TBI senza frazionamento e all'impiego di busulfano nel regime di condizionamento. Benché l'impiego di altri farmaci come la Ciclofosfamida in passato fosse stato associato ad un'incrementata probabilità di recupero della funzionalità ovarica, recenti studi hanno in parte messo in discussione tale concetto (53). L'età al trapianto al momento resta uno degli indici più predittivi di recupero di funzionalità gonadica nelle pazienti di sesso femminile sottoposte ad alloHSCT: più giovane è l'età, maggiori sono le probabilità di recupero della funzionalità gonadica (54).

Nei pazienti di sesso maschile le alterazioni della funzionalità gonadica sono meno frequenti e per lo più si limitano alla componente spermatogenetica con risparmio della funzionalità endocrina del testicolo in relazione alla maggior resistenza delle cellule di Leyding ai trattamenti sia chemio che radioterapici (55). Nelle giovani donne l'insufficienza ovarica prematura induce uno stato di menopausa precoce con conseguenze secondarie importanti quali la sindrome metabolica e l'osteoporosi. I pazienti di sesso maschile solitamente risultano asintomatici; quando presenti, i sintomi principali di insufficienza gonadica testicolare sono rappresentati da disfunzione erettile, calo della libido e osteoporosi. L'impatto dell'alloHSCT sulla fertilità e la sintomatologia correlata con l'eventuale sviluppo di un'insufficienza gonadica dovrebbero essere discusse con i genitori e con i pazienti stessi con modalità idonee allo stato di sviluppo psico-fisico in ogni singolo caso. In merito alla prevenzione dello sviluppo di questa complicanza l'unica opzione scientificamente dimostrata utile è rappresentata dalla criopreservazione del liquido seminale per i pazienti di sesso maschile post-puberi. Tuttavia, sono in corso di valutazione diversi programmi sperimentali finalizzati alla preservazione della funzionalità gonadica e al trattamento di un'eventuale insufficienza gonadica secondaria a trattamenti chemio e radioterapici anche per altre categorie di pazienti, ma al momento tali strategie non rientrano ancora nella pratica clinica consolidata (56, 57).

Il monitoraggio della funzionalità gonadica e l'eventuale instaurazione di terapia sostitutiva risultano particolarmente importanti nelle pazienti di sesso femminile in relazione agli effetti che in modo secondario la presenza di una precoce insufficienza ovarica può determinare a carico di altri organi e apparati.

1.2.6 Alterazioni della crescita

La riduzione della velocità di crescita o una previsione del mancato raggiungimento dell'altezza determinata dal target genetico è un processo multifattoriale che può essere ricondotto a diverse cause quali GvHD cronica, malnutrizione, terapie steroidee protratte e deficit secondario di ormone della crescita (GH). Il deficit di GH è abbastanza comune dopo l'esposizione ad una dose di TBI maggiore di 10 Gy in singola frazione o di 12 Gy in dosi frazionate, ed è ancora più frequente fra i pazienti trattati prima del trapianto con irradiazione craniale con dosi maggiori di 18 Gy. Fattori di rischio aggiuntivi sono rappresentati da un'età inferiore al momento del trapianto, da un intervallo di tempo ridotto fra l'irradiazione craniale e la TBI e la chirurgia in regione sellare (58). Alcuni pazienti inoltre al di là del deficit primitivo di GH possono presentare una crescita non soddisfacente in relazione ad una resistenza periferica al GH o al concomitante deficit delle funzionalità gonadica e tiroidea. Inoltre, l'insorgenza di una pubertà precoce può mascherare il deficit di GH.

In merito alla terapia del deficit di GH, il ruolo della terapia sostitutiva è molto dibattuto alla luce di alcuni studi che hanno evidenziato una correlazione con lo sviluppo di neoplasie secondarie (59, 60).

1.2.7 Alterazioni della funzionalità polmonare

Le alterazioni della funzionalità polmonare che si possono presentare dopo l'alloHSCT sono essenzialmente riconducibili a quadri ostruttivi, restrittivi, di alterata diffusione o combinati che si possono manifestare da mesi sino ad anni dopo il trapianto (61). Complessivamente i lungo sopravvissuti sottoposti ad alloHSCT in età pediatrica presentano un rischio incrementato di morire per problematiche polmonari di nove volte superiore rispetto alla popolazione generale e tale rischio complessivamente risulta solo inferiore al rischio di mortalità per neoplasie secondarie (62). Fra i principali fattori di rischio per lo sviluppo di complicanze polmonari a lungo termine si annoverano una singola dose di TBI > 6 Gy e dosi frazionate di TBI > 12 Gy pertanto l'impiego di un frazionamento maggiore e la riduzione della quantità complessiva di radiazioni somministrata ha ridotto il rischio di queste complicazioni. Alterazioni dose-dipendenti su base fibrotica sono anche state riportate dopo trattamento con bleomicina, busulfano e nitrosouree in genere e i pazienti condizionati con

carmustina e lomustina risultano quelli a maggior rischio di sviluppo di questi effetti tardivi.

La bronchiolite obliterante rappresenta una complicanza su base ostruttiva irreversibile abbastanza caratteristica dell'alloHSCT che risulta espressione sia di una tossicità diretta dei farmaci somministrati sia di GvHD cronica che ancora oggi rappresenta una delle principali cause di morbidità e di mortalità nella popolazione dei lungo-sopravvivenenti post alloHSCT (63).

1.2.8 Alterazioni della funzionalità cardio-circolatoria

Le complicanze a carico dell'apparato cardiocircolatorio come la cardiomiopatia ischemica precoce, le vasculopatie cerebrali, lo scompenso cardiaco, i disturbi del ritmo cardiaco e le patologie valvolari sono emerse come un'importante causa di morbidità e mortalità nella popolazione dei lungosopravvivenenti di forme maligne esordite in età pediatrica. I principali fattori di rischio risultano essere l'esposizione ai farmaci antraciclinici (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina ed idarubicina) e al mitoxantrone e l'irradiazione toracica. Alcune altre comorbidità come l'ipertensione, il diabete, la dislipidemia e il sovrappeso/obesità possono inoltre ulteriormente incrementare il rischio di sviluppare questa tipologia di complicanze (64). Un recente studio svolto su tre popolazioni (pazienti trattati con sola chemioterapia, pazienti trattati con alloHSCT e controlli sani) ha riportato che i pazienti sottoposti ad alloHSCT presentano un rischio incrementato di 13 volte di sviluppare complicanze cardiocircolatorie severe rispetto ai controlli sani ma aggiustando l'analisi per l'esposizione ai chemioterapici miocardio-tossici e all'irradiazione toracica il rischio dei pazienti sottoposti ad alloHSCT è risultato sovrapponibile a quello dei pazienti trattati con sola chemioterapia (65). Una possibile spiegazione di questa osservazione è che l'incidenza di effetti tardivi a carico dell'apparato cardiocircolatorio risulti per lo più determinata dalle terapie somministrate prima del trapianto, su cui ovviamente la tossicità dell'alloHSCT giocherebbe un ruolo ma tuttosommato marginale.

1.2.9 Alterazioni della funzionalità renale

L'impiego della chemioterapia e della radioterapia nel contesto dei protocolli di trattamento pre-trapianto, il regime di condizionamento e l'esposizione ai farmaci

nefrotossici come gli inibitori delle calcineurine, gli antibiotici, gli antifungini etc associate alle complicanze di carattere infettivo, alla GvHD e all'ipertensione possono complessivamente determinare un deterioramento della funzionalità renale nel periodo post trapianto sia precoce che a lungo termine. Il rischio di alterazioni a carico della funzionalità renale risulta particolarmente incrementato nei pazienti trattati con combinazioni chemioterapiche che includono agenti intercalanti come l'ifosfamide e/o i derivati del platino e alcuni antimetaboliti come il methotrexate (66, 67).

L'irradiazione addominale e/o a livello dei fianchi con dosi > 15 Gy, la TBI frazionata con dosi > 12 Gy o la TBI non frazionata con dosi > 6 Gy incrementano ulteriormente il rischio di sviluppare queste sequele (67).

Al di là degli effetti tossici diretti dei farmaci, la GvHD cronica di per sé può contribuire all'instaurazione di un danno renale a lungo termine. Benché l'esatta fisiopatologia del danno immunomediato della GvHD sul tessuto renale resti ancora completamente da elucidare alcuni autori hanno suggerito che questo sia da ricondurre ad un danno diretto esercitato dai linfociti T sui tubuli renali che determina il rilascio di citochine pro-infiammatorie che provocano un danno a carico di queste strutture che si manifesta con albuminuria negli stadi iniziali e successiva franca proteinuria (66).

1.2.10 Alterazioni della funzionalità epatica

I pazienti sottoposti a HSCT sia autologo che allogenico (anche quelli che non sviluppano GVHD) possono presentare un rischio incrementato di complicanze tardive a carico del fegato. La patologia epatica nei pazienti pediatrici lungosopravvivenenti post alloHSCT può essere il risultato degli esiti di una sindrome da ostruzione sinusoidale (SOS), della GvHD, di infezioni croniche da virus epatototropi e dell'accumulo marziale (68). Un aspetto riportato ma ancora completamente delucidato è rappresentato dal riscontro di noduli di iperplasia focale epatica riscontrati incidentalmente in corso di accertamenti radiologici che si ipotizza possano essere un processo benigno associato con l'esposizione ad alte dosi di farmaci alchilanti e/o ad irradiazione addominale o con una storia di sindrome da ostruzione sinusoidale (69).

1.2.11 Seconde neoplasie maligne

Una complicanza a lungo termine particolarmente temibile dell'alloHSCT è rappresentata dallo sviluppo di una neoplasia maligna secondaria (SMN). Le SNM possono essere classificate in tre gruppi: mielodisplasie e leucemie mieloidi acute secondarie a pregressi trattamenti chemio/radioterapici (T-MDS/AML), patologie linfoproliferative e tumori solidi. Benché le leucemie secondarie normalmente si sviluppano abbastanza precocemente dopo l'alloHSCT, i tumori solidi secondari presentano una latenza maggiore (70).

Le T-MDS/AML rappresentano una delle principali cause di mortalità trapianto correlata nel caso del trapianto autologo e nel caso dell'alloHSCT risultano meno frequenti. I principali fattori di rischio trapianto-specifici includono l'impiego delle cellule staminali emopoietiche da sangue periferico (rispetto al midollo osseo), la mobilizzazione con Etoposide, l'impiego della TBI, l'infusione di una dose cellulare ridotta e i trapianti multipli. L'esposizione pre-trapianto ad agenti alchilanti, agli inibitori della topoisomerasi di tipo II e la somministrazione di radioterapia contribuiscono ad incrementare il rischio di t-MDS/AML. Solitamente la latenza di sviluppo di queste sequele è maggiore dopo l'esposizione agli alchilanti o alla radioterapia rispetto agli inibitori della topoisomerasi II (da 4 a 7 anni rispetto a meno di 5) (71).

La patologia linfoproliferativa post trapianto (PTLD) rappresenta la forma di SNM più frequente nell'immediato periodo post trapianto con una incidenza cumulativa nei 10 anni successivi che varia fra l'1 e il 2%. La maggior parte di questi casi sono correlati con un'infezione da EBV, originano per lo più dalle cellule B, e sono per il resto caratterizzate da un'importante eterogeneità istopatologica e di andamento clinico. I principali fattori di rischio sono rappresentati dall'impiego della T-deplezione farmacologica nella profilassi della GvHD (siero antilinfocitario e/o anticorpi anti-CD3), dall'impiego di donatori unrelated mismatched, dalla TBI e da una diagnosi di pregressa immunodeficienza (72). Altre forme di linfoma, comprese forme di malattia di Hodgkin, sono state riportate con un esordio tuttavia più tardivo, la presenza di una GvHD cronica estesa resta il principale fattore di rischio per lo sviluppo di questi ultimi (73).

L'incidenza cumulativa di tumori solidi post alloHSCT è stata riportata essere di circa 11% a 15 anni dal trapianto, dato che risulta circa il doppio di quanto atteso per la popolazione generale di pari età e pari sesso. Il rischio complessivo nelle casistiche pediatriche parrebbe essere leggermente più basso, benché tenda ad incrementare con il trascorrere del tempo dal trapianto e risulti maggiore dopo alloHSCT rispetto al trapianto autologo (74). Gli istotipi più frequenti sono rappresentati dai tumori della cute (sia melanomi che carcinomi), tumori epiteliali a carico del cavo orale e delle ghiandole salivari, tumori cerebrali, tumori epatici, carcinomi mammari e della cervice uterina e sarcomi. Fattori di rischio principali per lo sviluppo di SNM solidi sono rappresentati dall'esposizione a radiazioni in giovane età, dosi elevate di radiazioni, condizioni genetiche predisponenti, problematiche infettive sottostanti (epatite virale ed infezione HPV) e GvHD cronica (75).

1.3 IL REGIME DI CONDIZIONAMENTO

1.3.1 Considerazioni generali

Il regime di condizionamento rappresenta una componente fondamentale dell'alloHSCT di tipo mieloablativo e consiste nella somministrazione di un trattamento chemio e/o radioterapico al soggetto ricevente finalizzato alla creazione nell'ambito della nicchia ematopoietica dello spazio necessario allo stabile attecchimento dei progenitori emopoietici del donatore, all'instaurazione dello stato di immunosoppressione finalizzata a ridurre le probabilità di rigetto dell'ospite delle cellule trapiantate e, nel caso delle patologie maligne, all'eradicazione della malattia per cui il trapianto viene eseguito.

La tossicità del regime di condizionamento mieloablativo (MAC) è una delle cause principali di mortalità trapianto correlata precoce ma allo stesso tempo riveste un ruolo fondamentale anche nel determinare le sequele tardive e il controllo a lungo termine della patologia di base.

1.3.2 L'irradiazione corporea totale (TBI)

Per decenni l'irradiazione corporea totale (Total Body Irradiation: TBI) è stata considerata un elemento fondamentale della pianificazione terapeutica dei pazienti avviati ad alloHSCT per leucemia acuta, in particolare modo ALL e resta tuttora ampiamente impiegata (76). La maggior parte dei Centri a seguito

dell'identificazione della somministrazione di dosi elevate di energia in ridotto numero di frazioni come uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di tossicità acuta a breve e lungo termine impiegano strategie di iperfrazionamento della dose totale di radiazione e utilizzano schermi polmonari al fine di ridurre l'incidenza di complicanze polmonari severe (77, 78). In Europa inoltre la tendenza è di non sottoporre a TBI soggetti al di sotto dei 2-3 anni di vita in relazione agli effetti particolarmente deleteri che questa procedura può determinare a carico del sistema nervoso centrale nei pazienti nella fascia di età al di sotto dei 3 anni. Tuttavia, anche i soggetti sopra i 3 anni sottoposti a TBI presentano un rischio incrementato di SNM, ritardo di crescita ed alterazioni della funzionalità gonadica. Nonostante gli effetti tossici della TBI siano noti, al momento attuale non esistono evidenze che suggeriscano che questa possa essere omessa in relazione alla sua efficacia in termini di controllo di malattia.

1.3.3 Il Busulfano

Attorno agli anni Ottanta, grazie all'esperienza pionieristica di Santos et al (79) l'impiego del Busulfano (Bu) all'interno del regime di condizionamento iniziò ad essere impiegato in tutti quei Centri che non disponevano della possibilità di sottoporre i pazienti a TBI. Tuttavia, il ricorso alla somministrazione di questo farmaco era associato essenzialmente a tre problemi principali. Innanzitutto, in relazione alla sua scarsa solubilità in soluzione acquosa il Bu necessitava di essere assunto per via orale all'inizio del regime di condizionamento, ovvero prima di tutti gli agenti chemioterapici associati potenzialmente emetogeni. In secondo luogo, la somministrazione per via orale esponeva il paziente ad una concentrazione molto variabile di principio attivo che era stata riportata come una delle cause principali di una dei suoi aspetti di tossicità più temuti ossia la malattia veno-occlusiva epatica (VOD). Terzo i livelli elevati di Bu a livello del liquido cefalo-rachidiano esponevano il paziente ad un rischio abbastanza consistente di sviluppare crisi convulsive. Grazie ad una maggiore coscienza di queste problematiche e ad interventi specifici mirati a ridurre l'impatto come il monitoraggio dei livelli plasmatici del farmaco, la definizione della dose più consona dei farmaci chemioterapici impiegati in associazione e l'instaurazione di un'adeguata profilassi anticomiziale le esperienze cliniche successive hanno evidenziato risultati comparabili, se non addirittura migliori, di quelle storiche

basate sull'impiego della TBI. Il quadro generale è ulteriormente mutato in epoca più recente da quando è risultata disponibile anche la formulazione endovenosa del Bu. Nell'ambito pediatrico sono disponibili attualmente i risultati di numerosi studi (80, 81) che hanno evidenziato la sicurezza e l'efficacia di tale farmaco sia nel contesto delle patologie maligne che di quelle non maligne e benché alcuni autori abbiano suggerito la non necessità di proseguire con il dosaggio plasmatico del farmaco (82) tale atteggiamento non risulta universalmente accettato e risulta probabile che anche la formulazione endovenosa possa essere associata con importanti sequele a lungo termine quali insufficienza gonadica, alterazioni della funzionalità polmonare e altre.

1.3.4 Esperienze cliniche di confronto fra Busulfano e TBI

In ambito pediatrico, in relazione alla consolidata utilità dell'impiego della TBI in termini di controllo di malattia, soprattutto nel caso della ALL, e alla concomitante conoscenza degli effetti tossici ad essa correlati, sono stati svolti alcuni trials randomizzati di confronto con il Bu, volti a valutare quale fosse l'approccio in grado di massimizzare il controllo a lungo termine della malattia di base minimizzandone al tempo stesso la tossicità.

Davies et al (83) hanno comparato l'outcome dei pazienti sottoposti ad alloHSCT da donatore familiare HLA identico per ALL e che hanno ricevuto nel contesto del regime di condizionamento Ciclofosfamide e TBI (TBI/Cy) o Busulfano orale e Ciclofosfamide (Bu/Cy). La probabilità di sopravvivenza a 3 anni dal trapianto è risultata del 55% nel gruppo TBI/Cy mentre del 40% nel gruppo Bu/Cy ($p=.003$). In analisi multivariata il rischio di recidiva è risultato simile nei due gruppi (rischio relativo [RR], 1.30 per Bu/CY versus TBI/Cy; $p=.1$). La TRM (Transplant Related Mortality: mortalità trapianto correlata) è risultata maggiore nel gruppo Bu/CY (RR, 1.68; $P=.012$). Bunin et al (84) hanno svolto un trial randomizzato comparando Bu e TBI nei pazienti affetti da ALL: non è stato possibile evidenziare differenze statisticamente significative in termini di sopravvivenza per i pazienti che avevano ricevuto alloHSCT da donatore familiare HLA-identico (36% vs 58% $p=0.3$) mentre per i pazienti sottoposti ad alloHSCT da donatore non correlato la sopravvivenza libera da eventi è risultata significativamente aumentata per i pazienti sottoposti a TBI rispetto a quelli trattati con Bu (57% versus 20% $p=0.004$).

Considerando la patologia mieloide, in ambito pediatrico i regimi di condizionamento più impiegati risultano essere basati sull'impiego del Bu (85), mentre nel contesto della popolazione adulta la TBI risulterebbe ancora in grado di offrire migliori probabilità di sopravvivenza con un profilo di tossicità equiparabile (86). Tuttavia, sempre nell'ambito della popolazione adulta i principali studi retrospettivi non prendono in considerazione nello specifico l'aspetto della tossicità a lungo termine (87) (88) (89). Gli studi retrospettivi relativi specificatamente agli effetti tardivi nella popolazione pediatrica disponibili sono studi monocentrici, basati su un numero ridotto di pazienti, abbastanza datati e spesso focalizzati su un unico effetto tardivo (90) (91).

Considerando gli studi comparativi della TBI con il Bu il ruolo degli effetti tardivi spesso risulta analizzato marginalmente (83, 84) essendo gli scopi principali degli studi incentrati sull'efficacia e la sicurezza della procedura in termini di tossicità acuta.

In merito al tema specifico della differenza di incidenza di effetti tardivi nella popolazione pediatrica sono al momento disponibili unicamente i dati del gruppo francese LEA (92) che dimostrano una riduzione globale della frequenza di effetti tardivi nei pazienti sottoposti a terapia con Bu e una diversa distribuzione delle diverse problematiche nei due gruppi di studio.

2. RAZIONALE DELLO STUDIO.

Lo scopo principale del presente studio consiste nel valutare l'impatto dell'impiego della TBI o del busulfano (sia nella formulazione orale che quella endovenosa) sull'incidenza di effetti tardivi in una popolazione di pazienti sottoposti ad alloHSCT per leucemia acuta in età pediatrica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PAZIENTI E PROCEDURA TRAPIANTOLOGICA.

Il presente studio ha incluso tutti i pazienti che in modo consecutivo sono stati sottoposti a primo alloHSCT per leucemia acuta (ALL e AML) fra il mese di Gennaio 2000 e il mese di Dicembre 2012 presso i 20 centri di Onco-ematologia Pediatrica affiliati all' AEIOP (Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica). Per identificare meglio l'occorrenza di effetti tardivi tutte le analisi sono state eseguite quando la mediana della durata del follow-up dei pazienti arruolati risultava superiore ai 5 anni dal trapianto.

Tutti i dati sono stati estratti in modo retrospettivo dal Registro AIEOP TCSE dove ogni singolo Centro riporta le informazioni demografiche e cliniche dei pazienti associate ai dettagli del trattamento somministrato e ai dati di outcome secondo regolamenti stabiliti dal proprio Comitato Etico e dopo aver ottenuto l'opportuno consenso dal paziente o dai suoi rappresentanti legali.

I criteri di inclusione dello studio sono stati età compresa fra i 3 e i 18 anni al momento del trapianto, diagnosi di ALL o AML con indicazione ad alloHSCT, primo alloHSCT da donatore familiare HLA-identico o da donatore HLA-matched non correlato o da donatore familiare aploidentico, regime di condizionamento basato o sull'impiego di Busulfano per via orale (dose cumulativa 16 mg/kg) o per via endovenosa (dose cumulativa da 16 a 12,8 mg/kg) o sull'impiego di TBI (dose cumulativa superiore o uguale a 990 cGy) e remissione ematologica completa di malattia alla valutazione pre-trapianto.

Criteri di esclusione dallo studio sono stati un pregresso alloHSCT, diagnosi di ALL o AML nel contesto di sindrome di Down o di altre patologie caratterizzate da cariotipo costituzionale anomalo comprese le patologie da instabilità

cromosomica (es: AML in Anemia di Fanconi) e diagnosi di ALL o AML secondarie a progressivo trattamento chemio e/o radioterapico.

La selezione del donatore e la relativa tipizzazione di istocompatibilità sono state eseguite secondo Standard IBMDR (Italian Bone Marrow Donor Registry) e i pazienti sono stati sottoposti agli accertamenti sia pre- che post- trapianto secondo la pratica clinica del singolo Centro a cui afferivano.

3.2 DEFINIZIONI E PRINCIPALI END-POINTS INDAGATI

Come principali effetti tardivi sono stati considerati le alterazioni della crescita, le alterazioni della funzionalità gonadica, le alterazioni della funzionalità tiroidea, lo sviluppo di cataratta, l'incidenza di secondi tumori e le alterazioni della funzionalità polmonare. Le alterazioni della crescita sono state definite come una riduzione della velocità di crescita in rapporto all'età e/o il mancato raggiungimento di statura e peso adeguati all'età in base al target genetico individuale. Le alterazioni della funzionalità gonadica nei pazienti di sesso maschile sono state definite o come pubertà ritardata o come pubertà precoce o come una riduzione dei livelli ematici di testosterone rispetto ai valori normali per l'età associati ad incrementata concentrazione di ormone follicolo-stimolante (FSH) o ormone lutenizzante (LH) o come alterazioni della forma e/o della motilità degli spermatozoi all' esame del liquido seminale. Le alterazioni della funzionalità gonadica nei pazienti di sesso femminile sono state definite o come pubertà ritardata o come pubertà precoce o come amenorrea secondaria necessitante di terapia sostitutiva specifica o come riduzione dei livelli ematici di estradiolo rispetto ai valori normali per l'età associati ad incrementata concentrazione di ormone follicolo-stimolante (FSH) o ormone lutenizzante (LH). Le alterazioni della funzionalità tiroidea sono state definite come un incremento della concentrazione plasmatica di ormone tireostimolante (TSH) associata o meno a ridotti livelli di tiroxina o di triiodotironina in controlli ripetuti e necessitanti di terapia di terapia specifica o come quadri di ipertiroidismo. I pazienti sono stati valutati per la comparsa di cataratta e di neoplasie secondarie da specialisti con esperienza nella diagnosi e nel trattamento delle complicanze a lungo termine dell'alloH SCT. La tossicità polmonare è stata definite come il riscontro di alterazioni restrittive o ostruttive o di deficit di diffusione alle prove di

funzionalità respiratoria. La GvHD acuta e la GvHD cronica sono state diagnosticate e stadiate secondo quanto precedentemente riportato in letteratura (93, 94).

3.3 ANALISI STATISTICA

Per valutare l'impatto della somministrazione di TBI e Busulfano sull'incidenza generale di effetti tardivi è stato eseguito un test di Fischer a due code. Per valutare la possibile presenza di una correlazione fra l'incidenza di ogni singolo effetto tardivo e la somministrazione di TBI e/o di Busulfano è stata eseguita in un primo momento un'analisi univariata che ha compreso anche le seguenti ulteriori variabili: sesso, età al trapianto, patologia, tipologia di donatore, stato di malattia al trapianto e occorrenza di aGvHD and cGvHD. L'incidenza di ogni singolo effetto tardivo è stata calcolata come incidenza cumulativa al fine di aggiustare l'analisi per rischi competitivi: a tale scopo la recidiva di malattia e la morte per qualsiasi causa sono state considerate eventi competitivi. La significatività concernente le differenze in termini di incidenza cumulativa è stata stabilita mediante test di Gray. Le variabili che in analisi univariata hanno raggiunto la significatività statistica sono state quindi selezionate per svolgere l'analisi multivariata che è stata svolta secondo il modello di regressione logistica. In tutte le analisi un valore di p inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando i programmi NCSS (Hintze, 2001; NCSS PASS, Number Cruncher Statistical System, Kaysville, UT, USA) e R 2.5.0

4. RISULTATI

4.1 PAZIENTI

Lo studio ha incluso 670 pazienti (415 maschi e 255 femmine) con un'età mediana di 9 anni al momento del trapianto (range 3-18) e con una mediana di follow up di 7 anni (range 3-16).

Per le analisi è stato usato il giorno 01 maggio 2017 come data di riferimento.

Le caratteristiche dei pazienti, il regime di condizionamento, la fonte di cellule staminali, le caratteristiche del donatore e la profilassi GvHD sono riassunte in Tabella 1.

Complessivamente il 38% dei pazienti (n=254) ha presentato un singolo effetto tardivo e il 14% dei pazienti (n=93) ha presentato più di un effetto tardivo.

L'incidenza di un singolo effetto tardivo è stata più alta nei pazienti sottoposti a TBI rispetto ai pazienti sottoposti a terapia con Bu (4% vs 28%, p=0.001).

Analogamente l'incidenza di due o più effetti tardivi è stata maggiore nei pazienti sottoposti a TBI (16% vs 7%, p=0.006) (Figura1)

4.2 ALTERAZIONI DELLA CRESCITA

I pazienti sottoposti a TBI hanno riportato un ritardo di crescita nel 29% dei casi (95%CI: 20-43) mentre i pazienti trattati con Bu nel 18% (95%CI: 10-31), ma questa differenza non è risultata statisticamente significativa (p=0.45) (Figura 2)

L'età del paziente al momento del trapianto, la tipologia di donatore e l'incidenza di GvHD invece hanno dimostrato nella nostra popolazione di studio una correlazione statisticamente significative con il ritardo di crescita (Tabella 2).

4.3 ALTERAZIONI DELLA FUNZIONALITÀ GONADICA

I pazienti sottoposti a TBI hanno dimostrato alterazioni della funzionalità gonadica nel 41 % dei casi (95%CI: 28-61), mentre i pazienti trattati con Bu nel 20% (95%CI: 15-30), ma questa differenza non è risultata statisticamente significativa (p=0.14). Fra le altre variabili indagate in analisi univariata il sesso e l'età del paziente hanno dimostrato una correlazione con l'insorgenza di alterazioni della funzionalità gonadica nella popolazione oggetto di studio (Tabella 3).

4.4 ALTERAZIONI DELLA FUNZIONALITÀ TIROIDEA

I pazienti trattati con TBI hanno dimostrato alterazioni della funzionalità tiroidea nel 18% dei casi (95%CI: 13-26), mentre i pazienti trattati con Bu nel 12 % (95%CI: 7-20), ma questa differenza non è risultata statisticamente significativa ($p=0,46$) (Figura 4). Nessuna delle altre variabili indagate in analisi univariata ha dimostrato una correlazione con l'insorgenza di alterazioni della funzionalità tiroidea nella popolazione oggetto di studio (Tabella 4).

4.5 CATARATTA

I pazienti sottoposti a TBI hanno sviluppato cataratta nel 24% dei casi (95%CI: 16-34) mentre i pazienti trattati con Bu la hanno sviluppata nel 4% (95%CI: 2-10) e questa differenza è risultata statisticamente significativa ($p=0,0001$). In analisi univariata anche la patologia di base e l'occorrenza di aGvHD hanno dimostrato un impatto statisticamente significativo sull'incidenza di cataratta (Tabella 5). L'analisi multivariata ha evidenziato che i pazienti trattati con Bu presentano una riduzione del rischio di sviluppare cataratta rispetto ai pazienti trattati con TBI (Rischio Relativo: 0.33 95%CI: 0.14-0.78 $p=0.012$) ma anche i pazienti che hanno sviluppato aGvHD risultano avere un rischio incrementato di sviluppare cataratta (Rischio Relativo aGvHD di grado II 3,5 95%CI: 1,62-7,75 $p=0.0015$; Rischio Relativo aGvHD di grado III 7,29 95% CI: 3,06-17,36 $p < 0,001$; Rischio Relativo aGvHD di grado IV 13,75 95%CI: 3,26-57,9 $p < 0,001$). In analisi multivariata la patologia di base non ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa con lo sviluppo di cataratta (Tabella 8).

4.6 NEOPLASIE MALIGNHE SECONDARIE

L'incidenza di neoplasie maligne secondarie (SMN) è risultata maggiore nei pazienti sottoposti a TBI (18% 95%CI:9-38) rispetto ai pazienti trattati con Bu (0 %) e questa differenza è risultata statisticamente significativa ($p= 0,019$). In analisi univariata anche la patologia di base è risultata correlata con l'incidenza di SMN: i pazienti affetti da ALL hanno sviluppato SMN nel 17% dei casi (95%CI: 7-35) mentre nessun caso di SNM è stato osservato nei pazienti affetti da AML ($p= 0,02$) (Tabella 6) In analisi multivariata sia il regime di condizionamento (TBI o Bu) che la patologia di base sono risultati essere correlati con l'incidenza di

SNM: i pazienti affetti da AML hanno sviluppato meno frequentemente SNM rispetto ai pazienti affetti da ALL (Rischio Relativo $2,13 \times 10^{-6}$ 95%CI: 1×10^{-6} – $4,45 \times 10^{-6}$ $p < 0,001$) e i pazienti trattati con BU hanno sviluppato meno frequentemente SNM rispetto ai pazienti sottoposti a TBI (Rischio Relativo $3,96 \times 10^{-6}$ 95%CI: $1,68 \times 10^{-6}$ – $9,34 \times 10^{-6}$ $p < 0,001$) (Tabella 8).

4.7 ALTERAZIONI DELLA FUNZIONALITÀ POLMONARE

In merito alla tossicità polmonare è stata osservata un'incidenza di effetti tardivi analoga nei pazienti trattati con TBI e i pazienti trattati con Bu, rispettivamente: 6% (95%CI: 4-9) e 8% (95%CI: 4-13) ($p=0,3$). In analisi univariata l'incidenza di aGvHD e di cGvHD sono risultate statisticamente correlate con l'insorgenza di alterazioni della funzionalità polmonare (Tabella 7).

5. DISCUSSIONE E SVILUPPI FUTURI

L'alloHSCT rappresenta una delle migliori opzioni terapeutiche per numerose patologie pediatriche sia di carattere oncologico che non oncologico. Nonostante la prognosi dei pazienti sottoposti ad alloHSCT sia notevolmente migliorata nel corso degli anni esiste ancora una percentuale non trascurabile di pazienti che vanno incontro a complicanze gravi correlate con questa procedura o che, nel caso delle patologie oncologiche, presentano una recidiva di malattia nonostante il trapianto.

Nel contesto della popolazione pediatrica inoltre, particolare attenzione deve essere posta a limitare non solo gli effetti tossici precoci della procedura ma anche le sequele che si possono verificare nel lungo termine, che determinando spesso dei quadri cronici di disabilità possono avere un impatto importante sulla qualità di vita dei pazienti anche a molto tempo di distanza dal trapianto.

Nonostante a partire dagli anni Duemila si sia assistito ad un graduale incremento delle procedure di alloHSCT di tipo non mieloablativo, soprattutto in ambito pediatrico la maggior parte dei trapianti viene ancora eseguita con schemi a intensità non modulata.

Storicamente uno dei cardini dell'alloHSCT mieloblativo è stato l'impiego della TBI in relazione alla sua capacità di rispondere in maniera molto efficace a quelli che fin dalle prime esperienze cliniche erano emerse come le caratteristiche

essenziali degli agenti da impiegarsi nel regime di condizionamento di questo tipo, ossia la capacità di creare all'interno della nicchia ematopoietica lo spazio necessario alla colonizzazione dei progenitori ematopoietici, l'efficienza nell'instaurazione dello stato di immunosoppressione necessario al loro stabile attecchimento e la possibilità di eliminare eventuali cellule neoplastiche residue. Tuttavia, il profilo di tossicità sia acuta che a lungo termine della TBI ha spinto diversi gruppi ad indagare se il ricorso a questa fosse strettamente necessario o se questa non potesse essere sostituita da tipologie di condizionamento basate solo sulla chemioterapia. Nell'ambito della popolazione adulta la TBI riveste tuttora un ruolo importante (86), tuttavia in relazione ad alcune esperienze multicentriche che non hanno evidenziato differenze significative in termini di prognostici con l'impiego della sola chemioterapia (89) spesso questi vengono alla TBI anche in relazione al crescente ruolo che stanno assumendo i trapianti RIC e alla difficoltà di alcuni Centri ad accedere a servizi di radioterapia specializzati in questa tecnica. Nel contesto della popolazione pediatrica sono disponibili i risultati di alcuni studi retrospettivi comparativi fra la TBI e il Bu nel trattamento della ALL da cui si evince una maggior efficacia della prima (83, 84), ma questi non considerano nello specifico gli effetti tardivi. Sono inoltre disponibili alcuni dati ottenuti sempre da studi retrospettivi relativi specificatamente agli effetti tardivi, ma si tratta per lo più di studi monocentrici, basati su un numero ridotto di pazienti, abbastanza datati e spesso focalizzati sulla tossicità a carico di un singolo organo (90, 91)

L'unico studio specificatamente incentrato sui diversi effetti secondari alle diverse tipologie di condizionamento mieloblativo nella popolazione pediatrica è lo studio di Bernard et al che ha evidenziato una riduzione del rischio di deficit di crescita, cataratta ed accumulo marziale associato ad un incremento del rischio di sovrappeso/obesità ed alopecia dopo l'esposizione a Bu rispetto alla TBI (92). Lo scopo principale del presente studio è stato valutare nel contesto di un'ampia casistica multicentrica di soggetti con età compresa fra i 3 e i 18 anni sottoposti ad alloH SCT per leucemia acuta (ALL e AML) se esistesse una differenza in termini di incidenza cumulativa di effetti tardivi fra i pazienti sottoposti a condizionamento con Bu rispetto a quelli sottoposti a TBI.

L'analisi di contingenza ha evidenziato un'associazione statisticamente significativa fra l'esposizione a TBI e la probabilità di sviluppare uno o più effetti

tardivi in linea con le osservazioni precedenti (48% vs 28%, $p=0.001$ per il singolo effetto tardivo e 16% vs 7%, $p=0.006$ per due o più effetti tardivi).

Tuttavia, valutando l'impatto del regime di condizionamento (TBI vs Bu) sull'incidenza cumulativa di ogni singolo effetto tardivo, già secondo un modello a singola variabile non è stato possibile evidenziare un'associazione statisticamente significativa per la maggior parte degli effetti considerati (ritardo di crescita $p=0.45$; tossicità gonadica $p=0.14$; tossicità tiroidea $p=0.46$ e tossicità polmonare $p=0.3$). Tale apparente incongruenza con il dato di incidenza generale potrebbe essere riconducibile ad una maggior precisione dell'incidenza cumulativa nello stimare la probabilità di un evento in relazione alla capacità di aggiustare l'analisi per rischi competitivi quali, nel caso specifico, la recidiva e/o la morte per qualsiasi causa. In modo analogo la scelta della tipologia di analisi potrebbe essere uno dei motivi per cui, a differenza dell'esperienza di Bernard (92), nel presente studio non sia stata evidenziata un'associazione fra l'esposizione a TBI e il ritardo di crescita. I pazienti sottoposti a TBI arruolati nel presente studio hanno presentato cataratta e SMN in misura maggiore rispetto ai pazienti trattati con Bu e tale differenza è risultata essere statisticamente significativa (rispettivamente 24% versus 4% $p=0.0001$ e 18% versus 0% $p=0.019$), tuttavia in entrambi i casi quando la variabile è stata valutata secondo un modello di analisi multivariata non è risultata la sola a mantenere la significatività statistica. Nel caso della cataratta anche la presenza di GvHD (sia acuta che cronica) è risultata associata allo sviluppo di tale complicanza in modo statisticamente significativo in analisi multivariata (Tabella 8). Tale osservazione è riconducibile all'importanza dell'esposizione alle dosi elevate di steroidi impiegate nel trattamento di questa complicanza (44).

Per quanto concerne l'incidenza di SMN in analisi multivariata è stato possibile evidenziare un'associazione statisticamente significativa sia con la tipologia di condizionamento che con la patologia di base. Il ruolo tumorigenico della TBI è noto ed è stato ampiamente descritto, i dati che emergono dal presente studio confermano quanto precedentemente riportato ma al contempo suggeriscono che oltre all'aspetto del condizionamento debbano essere tenute in considerazione e possibilmente controllate ulteriori variabili, tuttavia, la rarità di questa complicanza e il fatto che fra tutte quelle indagate sia quella con il periodo

di latenza maggiore impongono estrema cautela nella interpretazione di questo dato.

Benché si tratti di uno dei pochi studi multicentrici, basati su una casistica numerosa, specificatamente incentrati sull'aspetto della tossicità a lungo termine nella popolazione pediatrica e svolti secondo un modello di analisi multivariata comprendente diversi effetti tardivi, questo studio presenta alcuni limiti che occorre considerare.

Il primo grosso limite di questa analisi consiste nella sua natura retrospettiva che ovviamente non garantisce una omogenea distribuzione di tutte le variabili potenzialmente confondenti all'interno della popolazione oggetto di studio; si è tentato di ovviare a questo selezionando tutti i pazienti che hanno eseguito alloHSCT consecutivamente e inserendo dei criteri di inclusione che da un lato non limitassero troppo la numerosità del campione ma che al contempo non rendessero possibile l'inclusione di pazienti con caratteristiche tali da alterare i risultati (es pazienti affetti da sindrome di Down, pazienti non in remissione al trapianto, secondo alloHSCT etc). A questo proposito è stato anche avviato uno ulteriore studio prospettico multicentrico internazionale di fase III finalizzato nel caso specifico della ALL a valutare la possibilità di omettere la TBI nel regime di condizionamento (ALL SCT Ped FORUM EudraCT no: 2012-003032-22)

Un altro aspetto da considerarsi è la durata del follow up, che, sebbene sia più che soddisfacente per alcune tipologie di effetto tardivo (es: alterazioni della funzionalità gonadica, tossicità tiroidea, deficit di accrescimento) per altre (es: SNM) risulta a stento soddisfacente.

Infine, un aspetto che purtroppo tale studio, a differenza di altri analoghi, non ha potuto considerare è l'impatto di questi effetti tardivi sulla qualità di vita dei pazienti lungo-sopravvivenenti che da qualche anno a questa parte sta emergendo come uno dei fattori fondamentali nel valutare l'effettivo beneficio di interventi terapeutici complessi come l'alloHSCT (95). Complessivamente i dati di questo studio suggeriscono che la tipologia di condizionamento che ricevono i pazienti pediatrici sottoposti ad alloHSCT (TBI versus Bu) per leucemia acuta (ALL e AML) non è in grado di influenzare in modo significativamente diverso l'incidenza di effetti tardivi e che pertanto la scelta dello stesso non debba tanto essere guidata dal profilo di tossicità a lungo termine ma da quello di tossicità acuta e di efficacia nel controllo della patologia per cui il trapianto viene eseguito.

6. TABELLE E FIGURE

		n	%
Sesso	Maschio	415	62
	Femmina	255	38
Patologia	ALL	497	74
	AML	173	26
Condizionamento	TBI	473	70
	Bu	197	30
Fonte	BM	508	76
	CB	61	9
	PBSC	101	15
Donatore	MFD	280	40
	MUD	321	47
	PMFD	69	13
Profilassi GvHD	CyA	252	38
	CyA-MTX	92	14
	CyA-MTX-ATG	250	37
	altro	76	11

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti e della tipologia di trapianto

ALL: Leucemia Linfoblastica Acuta; AML: Leucemia Mieloide Acuta; TBI: Total Body Irradiation; Bu: busulfano ev o os; BM: midollo osseo; CB: sangue cordonale; PBSC: cellule staminali ematopietiche da sangue periferico; MFD: donatore familiare HLA-identico; MUD: donatore non familiare HLA-compatibile; PMFD: donatore familiare aploidentico; CyA: ciclosporina; MTX: methotrexate; ATG: siero antilinfocitario.

Variabile		%	CI 95%		p
Sesso	M	25	15	40	0,91
	F	28	17	48	
Età	< 5 anni	30	18	52	0,001
	5-10 anni	65	50	76	
	10-15 anni	19	8	45	
	> 15 anni	0			
Patologia	ALL	28	19	42	0,27
	AML	21	13	35	
Tipo TCSE	MFD	17	9	31	0,012
	MUD	33	23	47	
	PMFD	12	4	33	
Stato al TCSE	1 RC	14	9	22	0,16
	2 RC	37	25	55	
	altre RC	3	0,25	25	
GvHD acuta	assente	24	13	44	0,002
	Grado 1	28	15	51	
	Grado 2	20	12	32	
	Grado 3	22	9	57	
	Grado 4	42	16	100	
GvHD cronica	assente	26	18	38	0,99
	limitata	18	10	33	
	estesa	19	9	39	
Condizionamento	TBI	29	20	43	0,45
	Bu	18	10	31	

Tabella 2. Analisi univariata dell'incidenza cumulativa di alterazioni della crescita.

Il regime di condizionamento non è risultato correlato con l'incidenza di alterazioni della crescita, mentre l'età al trapianto, la tipologia di alloHSCt e la presenza di GvHD acuta sono risultate correlate con l'insorgenza di questo effetto tardivo. M: maschio; F: femmina; ALL: leucemia linfoblastica acuta; AML: leucemia mieloide acuta; MFD: donatore familiare HLA-identico; MUD: donatore non familiare HLA-compatibile; PMFD: donatore familiare aploidentico, RC: remissione ematologica di malattia; TBI: Total Body Irradiation; Bu: busulfano e v o os.

Variabile		%	CI 95%		p
Sesso	M	20	10	39	<0,001
	F	52	41	62	
Età	< 5 anni	18	8	41	<0,001
	5-10 anni	32	23	43	
	10-15 anni	30	24	38	
	> 15 anni	32	24	44	
Patologia	LLA	37	27	55	0.94
	LMA	25	16	35	
Tipo TCSE	MFD	26	20	34	0.83
	MUD	27	21	36	
	PMFD	32	18	56	
Stato al TCSE	1 RC	23	18	30	0.67
	2 RC	30	24	38	
	altre RC	20	7	56	
GvHD acuta	assente	21	14	30	0.65
	Grado 1	28	19	39	
	Grado 2	29	22	39	
	Grado 3	67	47	79	
	Grado 4	27	7	97	
GvHD cronica	assente	33	21	52	0.6
	limitata	22	14	34	
	estesa	35	24	51	
Condizionamento	TBI	41	28	61	0.46
	Bu	20	15	30	

Tabella 3. Analisi univariata dell'incidenza cumulativa di alterazioni della funzionalità gonadica.

L'età e il sesso del paziente si sono dimostrate le due variabili correlate con lo sviluppo di alterazioni a carico della funzionalità gonadica. M: maschio; F: femmina; ALL: leucemia linfoblastica acuta; AML: leucemia mieloide acuta; MFD: donatore familiare HLA-identico; MUD: donatore non familiare HLA-compatibile; PMFD: donatore familiare aploidentico, RC: remissione ematologica di malattia; TBI: Total Body Irradiation; Bu: busulfano ev o os.

Variabile		%	CI 95%		p
Sesso	M	13	9	19	0,18
	F	20	14	31	
Età	< 5 anni	24	13	44	0,42
	5-10 anni	17	12	28	
	10-15 anni	15	8	30	
	> 15 anni	5	2	13	
Patologia	LLA	17	12	25	0,80
	LMA	14	9	22	
Tipo TCSE	MFD	14	8	23	0,18
	MUD	18	13	26	
	PMFD	16	7	37	
Stato al TCSE	1 RC	12	19	31	0,92
	2 RC	14	10	20	
	altre RC	6	2	23	
GvHD acuta	assente	10	5	21	0,13
	Grado 1	16	11	24	
	Grado 2	20	12	33	
	Grado 3	22	12	41	
	Grado 4	8	1	54	
GvHD cronica	assente	16	10	23	0,39
	limitata	24	14	40	
	estesa	15	9	26	
Condizionamento	TBI	18	13	26	0,46
	Bu	12	8	20	

Tabella 4. Analisi univariata dell'incidenza cumulativa di alterazioni della funzionalità tiroidea.

Il regime di condizionamento, così come tutte le ulteriori variabili indagate non sono risultate correlate con l'incidenza di alterazioni della funzionalità tiroidea. M: maschio; F: femmina; ALL: leucemia linfoblastica acuta; AML: leucemia mieloide acuta; MFD: donatore familiare HLA-identico; MUD: donatore non familiare HLA-compatibile; PMFD: donatore familiare aploidentico, RC: remissione ematologica di malattia; TBI: Total Body Irradiation; Bu: busulfano e/o os.

Variabile		%	CI 95%		p
Sesso	M	18	11	30	0,85
	F	17	12	26	
Età	< 5 anni	16	9	29	0,67
	5-10 anni	16	11	22	
	10-15 anni	24	13	45	
	> 15 anni	6	2	15	
Patologia	LLA	22	15	33	< 0,001
	LMA	5	2	11	
Tipo TCSE	MFD	16	11	23	0,15
	MUD	24	13	43	
	PMFD	6	2	17	
Stato al TCSE	1 RC	13	9	20	ns
	2 RC	20	13	32	
	altre RC	13	5	33	
GvHD acuta	assente	5	2	10	< 0,001
	Grado 1	20	9	45	
	Grado 2	22	16	32	
	Grado 3	37	24	58	
	Grado 4	25	9	67	
GvHD cronica	assente	16	12	22	0,41
	limitata	8	4	17	
	estesa	23	13	37	
Condizionamento	TBI	24	16	34	< 0,001
	Bu	4	2	10	

Tabella 5. Analisi univariata dell'incidenza cumulativa di cataratta

Il regime di condizionamento, la patologia di base e la presenza di GvHD acuta si sono dimostrate correlate con lo sviluppo di cataratta in modo statisticamente significativo. M: maschio; F: femmina; ALL: leucemia linfoblastica acuta; AML: leucemia mieloide acuta; MFD: donatore familiare HLA-identico; MUD: donatore non familiare HLA-compatibile; PMFD: donatore familiare aploidentico, RC: remissione ematologica di malattia; TBI: Total Body Irradiation; Bu: busulfano e/o os.

Variabile		%	CI 95%		p
Sesso	M	5	2	13	0,77
	F	18	8	42	
Età	< 5 anni	25	7	83	0,8
	5-10 anni	0,1	0,2	4	
	10-15 anni	9	2	41	
	> 15 anni	1,3	0,2	9	
Patologia	LLA	17	7	35	0,02
	LMA	0			
Tipo TCSE	MFD	3	1	10	0,33
	MUD	22	8	54	
	PMFD	12,5	2	78	
Stato al TCSE	1 RC	7	2	24	0,57
	2 RC	16	7	36	
	altre RC	0			
GvHD acuta	assente	0			0,19
	Grado 1	16	6	47	
	Grado 2	13	5	36	
	Grado 3	0			
	Grado 4	0			
GvHD cronica	assente	18	0	40	ns
	limitata	5	1	18	
	estesa	5	0	33	
Condizionamento	TBI	18	9	38	0,019
	Bu	0			

Tabella 6. Analisi univariata dell'incidenza cumulativa di SNM

Il regime di condizionamento e la patologia di base si sono dimostrate correlate con lo sviluppo di seconde neoplasie maligne in modo statisticamente significativo. M: maschio; F: femmina; ALL: leucemia linfoblastica acuta; AML: leucemia mieloide acuta; MFD: donatore familiare HLA-identico; MUD: donatore non familiare HLA-compatibile; PMFD: donatore familiare aploidentico, RC: remissione ematologica di malattia; TBI: Total Body Irradiation; Bu: busulfano ev o os.

Variabile		%	CI 95%		p
Sesso	M	6	4	9	0,47
	F	8	5	13	
Età	< 5 anni	0	0	0	0,17
	5-10 anni	8	5	12	
	10-15 anni	8	4	14	
	> 15 anni	8	4	18	
Patologia	LLA	6	4	9	0,47
	LMA	7	4	13	
Tipo TCSE	MFD	9	6	14	0,31
	MUD	5	3	8	
	PMFD	6	1	27	
Stato al TCSE	1 RC	8	5	12	0,39
	2 RC	5	3	9	
	altre RC	7	1	44	
GvHD acuta	assente	5	2	10	0,07
	Grado 1	6	3	11	
	Grado 2	8	4	13	
	Grado 3	13	6	28	
	Grado 4	18	5	63	
GvHD cronica	assente	5	3	8	0,0011
	limitata	8	4	15	
	estesa	17	10	29	
Condizionamento	TBI	6	4	9	0,3
	Bu	8	4	13	

Tabella 7. Analisi univariata dell'incidenza cumulativa di alterazioni della funzionalità polmonare

La presenza di GvHD acuta e cronica si sono dimostrate correlate con lo sviluppo di alterazioni della funzionalità in modo statisticamente significativo. M: maschio; F: femmina; ALL: leucemia linfoblastica acuta; AML: leucemia mieloide acuta; MFD: donatore familiare HLA-identico; MUD: donatore non familiare HLA-compatibile; PMFD: donatore familiare aploidentico, RC: remissione ematologica di malattia; TBI: Total Body Irradiation; Bu: busulfano ev o os.

Cataratta		RR	CI 95%	p
	Bu vs TBI	0.24	0.06 - 0.914	0.036
	aGvHD grado	1.94	0.82 - 4.5	0.13
	aGvHD grado 2	3.5	1.62 - 7.75	0.0015
	aGvHD grado 3	7.29	3.06 - 17.36	< 0.001
	aGvHD grado 4	13.75	3.26 - 57.9	< 0.001
	AML vs ALL	0.78	0.23 - 2.6	0.69
SMN				
	Bu vs TBI	3.96 x10e-6	1.68x10e-6 - 9.34x10e-6	< 0.001
	AML vs ALL	2.13 x 10e-6	1x10e-6 - 4.45x10-6	< 0.001

Tabella 8. Analisi multivariata

La tipologia di condizionamento e la presenza di GvHD acuta sono risultate associate all'insorgenza di cataratta in modo statisticamente significativo anche in analisi multivariata. La tipologia di condizionamento e la patologia di base sono risultate associate all'insorgenza di neoplasie maligne secondarie (SMN) anche in analisi multivariata. Nel caso della GvHD acuta il rischio relativo (RR) è stato espresso rispetto all' assenza di GvHD. ALL: leucemia linfoblastica acuta; AML: leucemia mieloide acuta; TBI: Total Body Irradiation; Bu: busulfano ev o os.

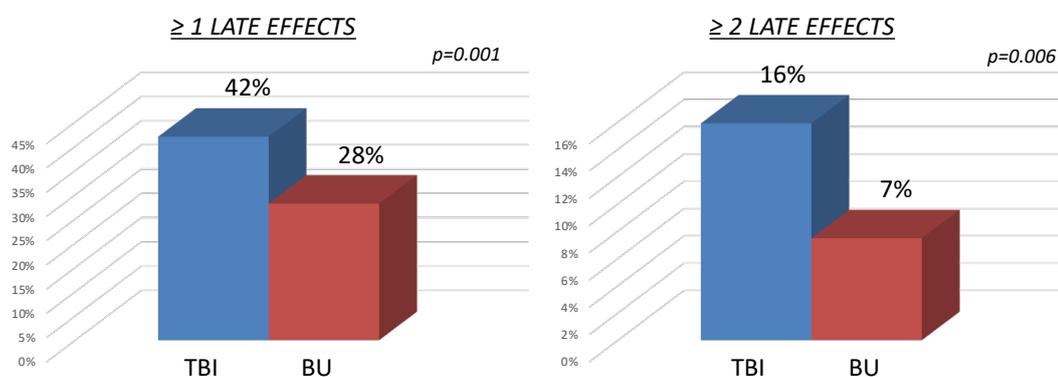


Figura 1. Incidenza di late effects in relazione alla tipologia di regime di cocondizionamento somministrato

L'incidenza di un singolo effetto tardivo è stata più alta nei pazienti sottoposti a TBI rispetto ai pazienti sottoposti a terapia con Bu (42% vs 28%, p=0.001). Analogamente l'incidenza di due o più effetti tardivi è stata maggiore nei pazienti sottoposti a TBI (16% vs 7%, p=0.006): Total Body Irradiation; Bu: busulfano ev o os.

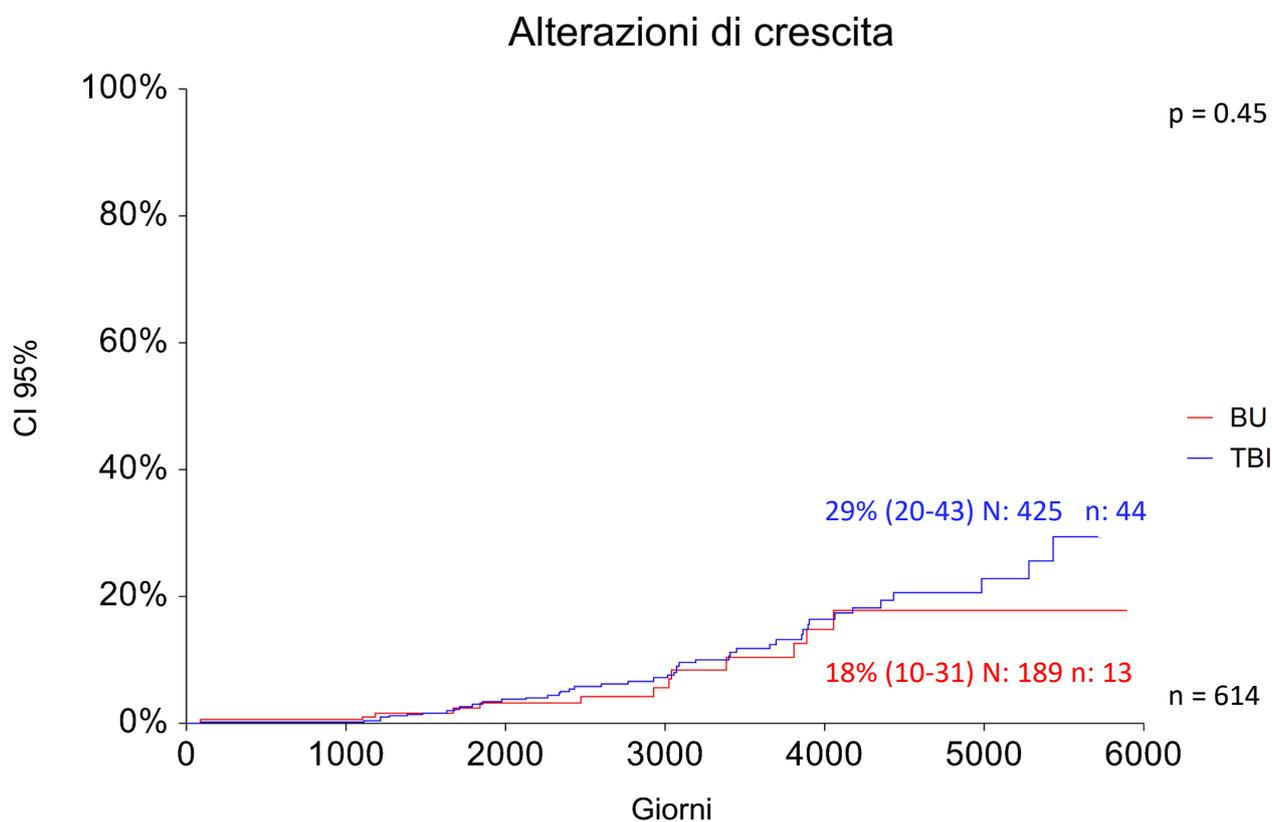


Figura 2. Incidenza cumulativa di alterazioni della crescita in relazione alla tipologia di regime di condizionamento somministrato.

I pazienti sottoposti a condizionamento con Total Body Irradiation hanno presentato un incremento di incidenza di alterazioni della crescita rispetto ai pazienti trattati con busulfano, ma tale differenza non è risultata essere statisticamente significativa. BU: busulfano ev o os; TBI: Total Body Irradiation; CI95% : intervallo di confidenza al 95%.

Alterazioni della funzionalità gonadica

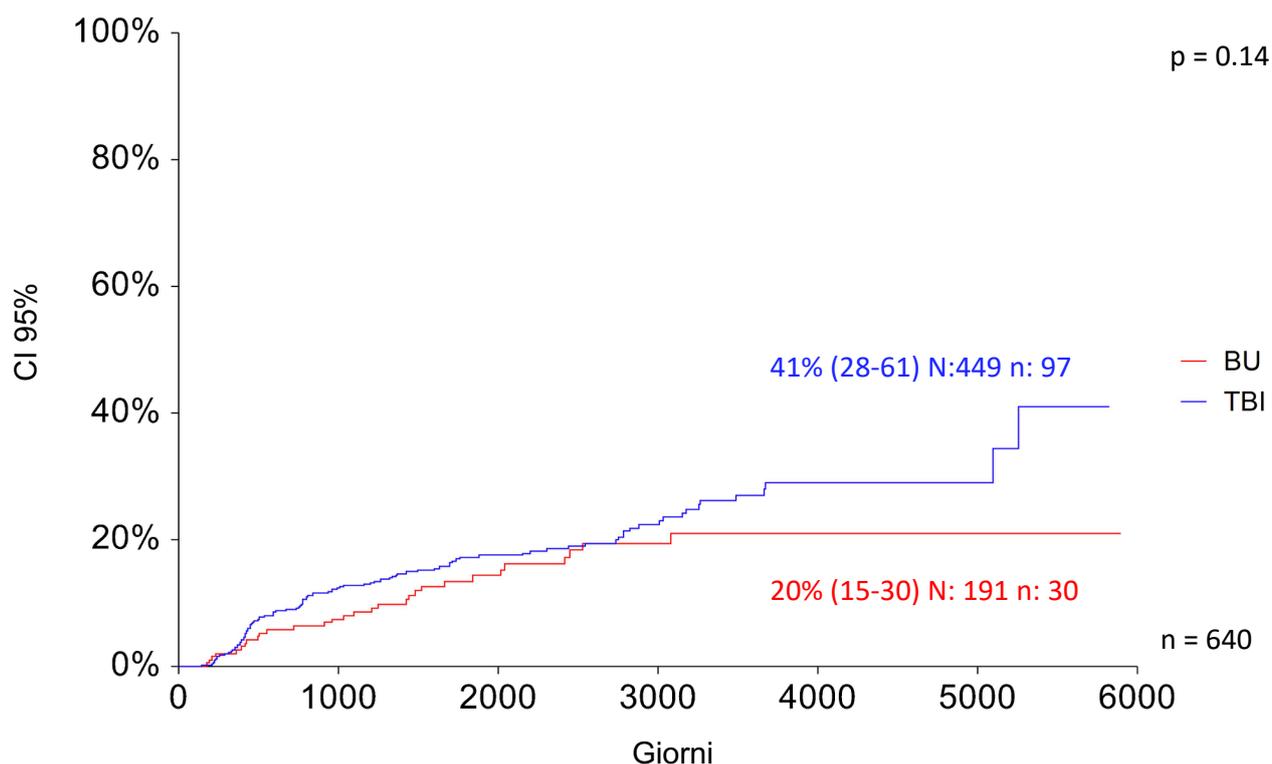


Figura 3. Incidenza cumulativa di alterazioni della funzionalità gonadica in relazione alla tipologia di regime di condizionamento somministrato.

I pazienti sottoposti a condizionamento con Total Body Irradiation hanno presentato un incremento di incidenza di alterazioni della funzionalità rispetto ai pazienti trattati con busulfano, ma tale differenza non è risultata essere statisticamente significativa. BU: busulfano ev o os; TBI: Total Body Irradiation; CI95%: intervallo di confidenza al 95%.

Alterazioni della funzionalità tiroidea

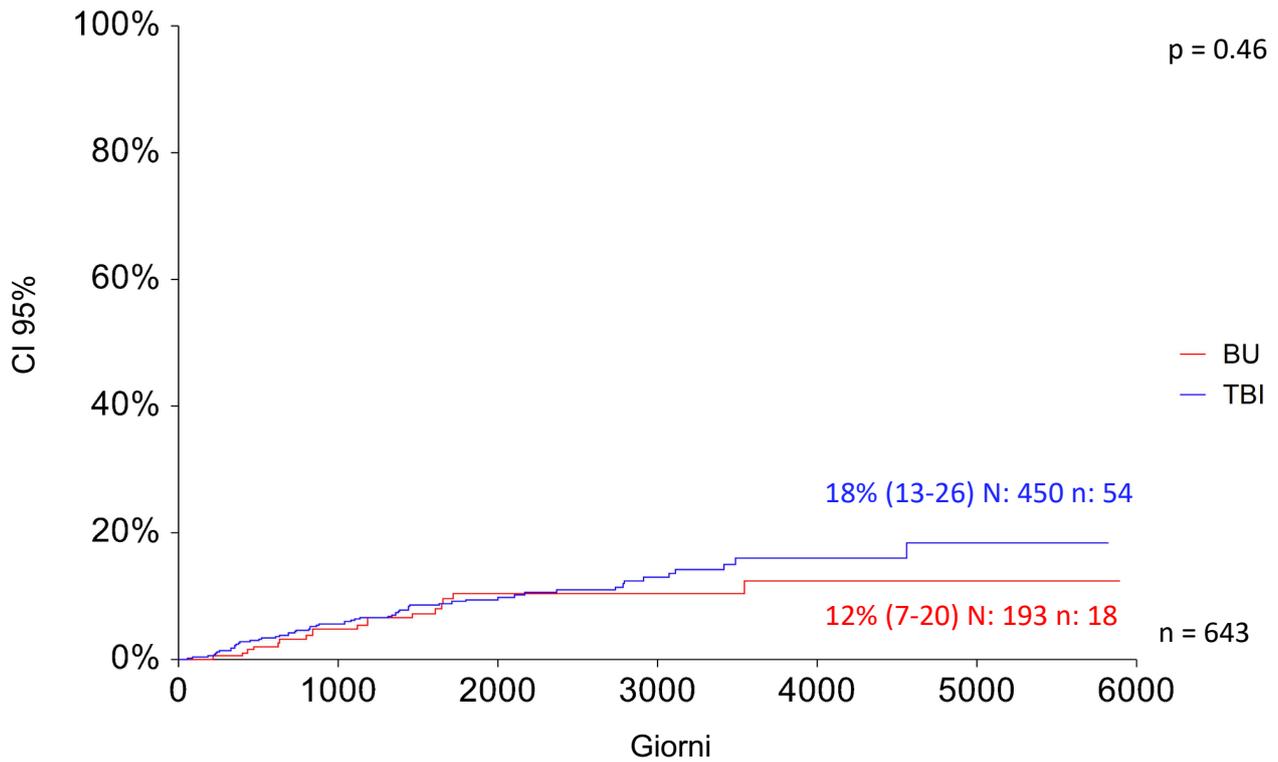


Figura 4. Incidenza cumulativa di alterazioni della funzionalità tiroidea in relazione alla tipologia di regime di condizionamento somministrato.

I pazienti sottoposti a condizionamento con Total Body Irradiation non hanno presentato un sostanziale incremento di incidenza di alterazioni della funzionalità tiroidea rispetto ai pazienti trattati con busulfano. BU: busulfano ev o os; TBI: Total Body Irradiation; CI95%: intervallo di confidenza al 95%.

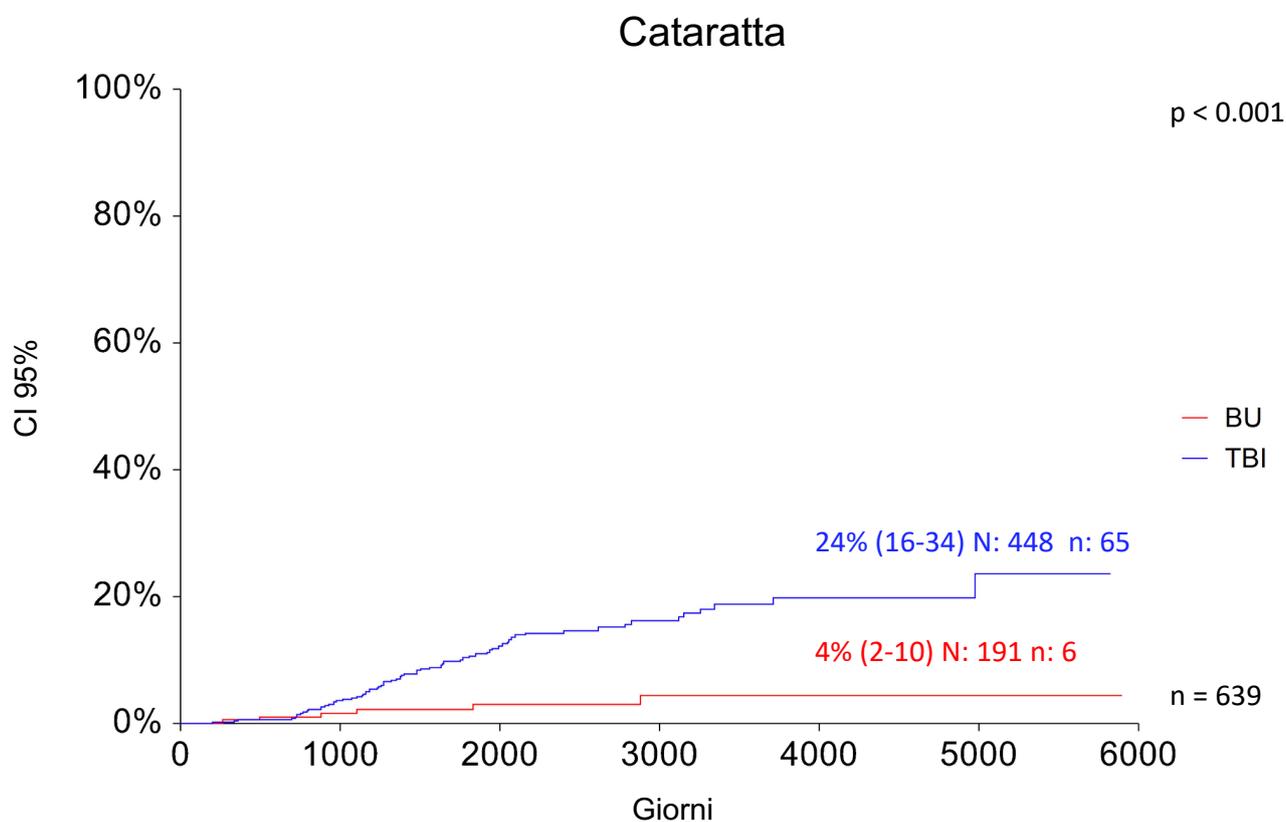


Figura 5. Incidenza cumulativa di cataratta in relazione alla tipologia di regime di condizionamento somministrato.

I pazienti sottoposti a condizionamento con Total Body Irradiation hanno presentato un' incrementata incidenza di cataratta rispetto ai pazienti trattati con busulfano, e tale differenza è risultata essere statisticamente significativa. BU: busulfano ev o os; TBI: Total Body Irradiation; CI95%: intervallo di confidenza al 95%.

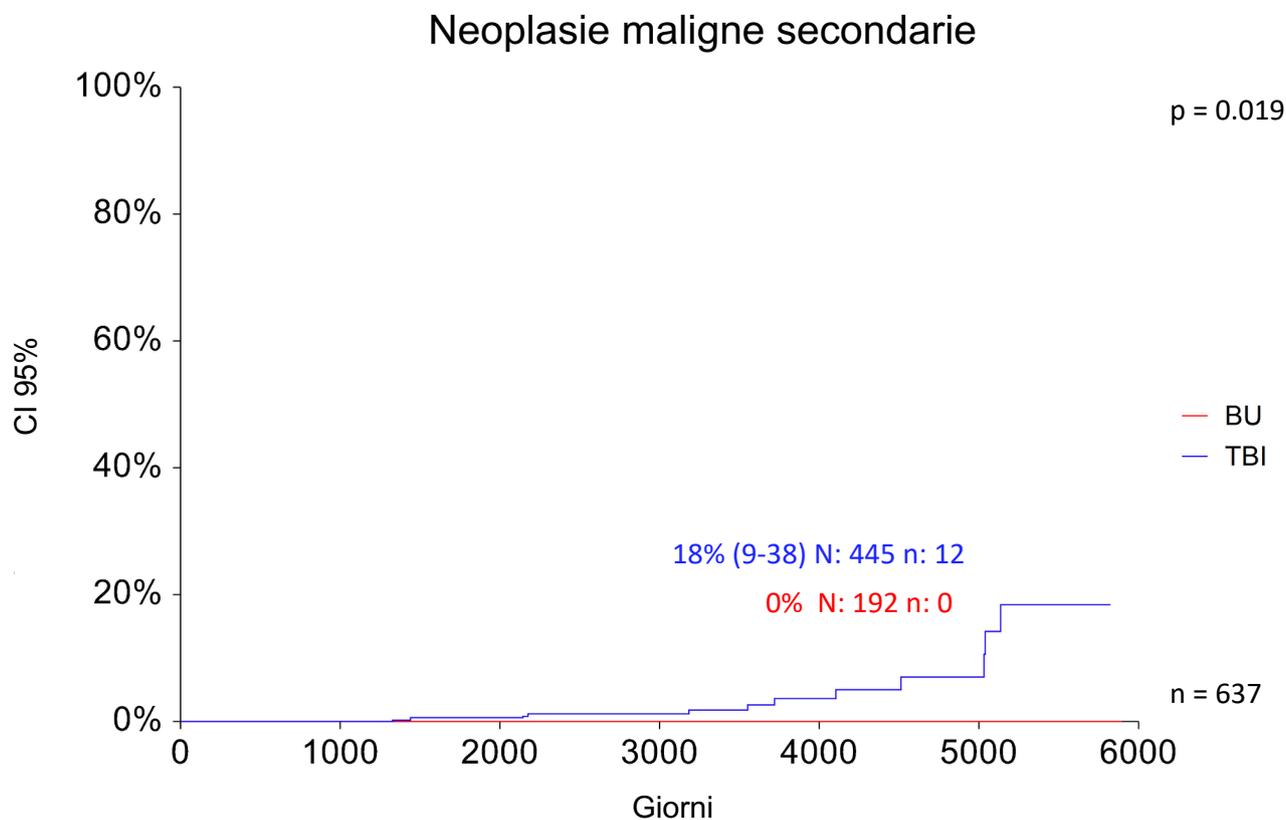


Figura 6. Incidenza cumulativa di neoplasie maligne secondarie in relazione alla tipologia di regime di condizionamento somministrato.

I pazienti sottoposti a condizionamento con Total Body Irradiation hanno presentato un incremento di incidenza di neoplasie maligne secondarie rispetto ai pazienti trattati con busulfano, e tale differenza è risultata essere statisticamente significativa. BU: busulfano ev o os; TBI: Total Body Irradiation; CI95%: intervallo di confidenza al 95%.

Alterazioni della funzionalità polmonare

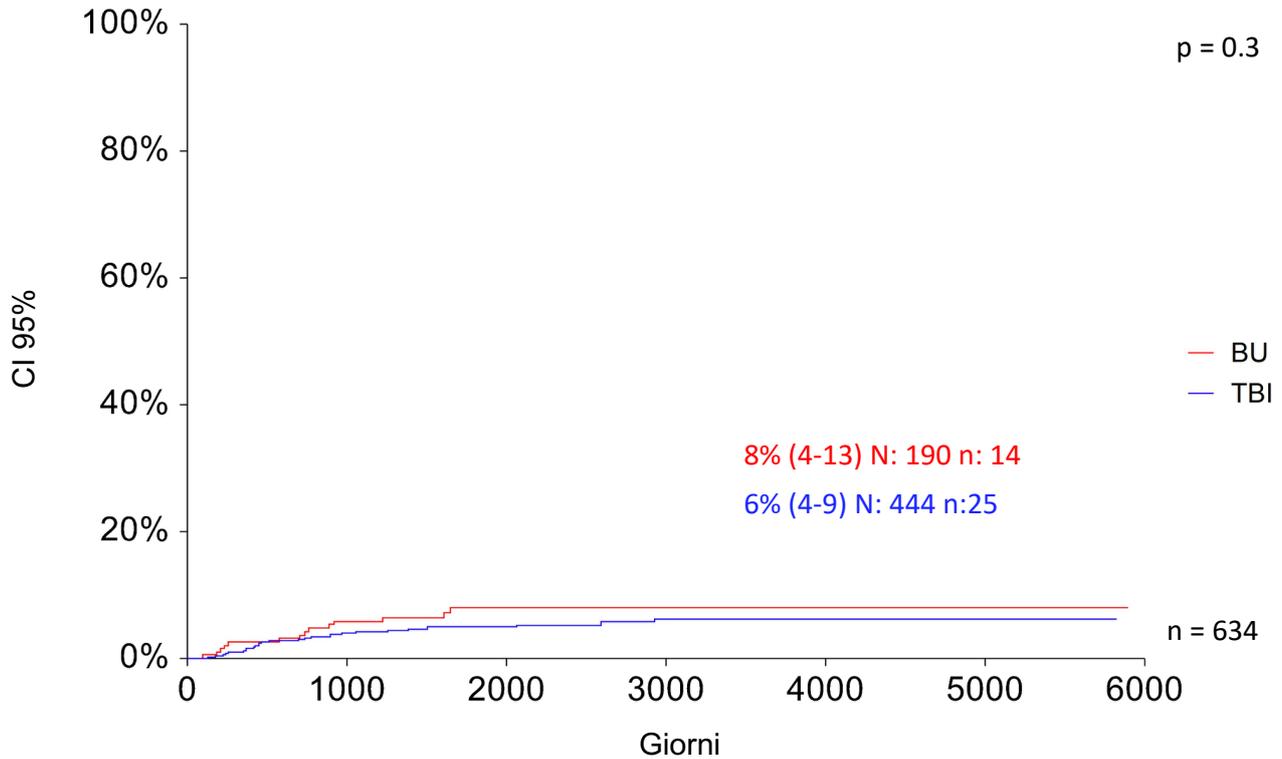


Figura 7. Incidenza cumulativa di alterazioni della funzionalità polmonare in relazione alla tipologia di regime di condizionamento somministrato.

I pazienti sottoposti a condizionamento con Total Body Irradiation non hanno presentato sostanziali differenze di incidenza di alterazioni della funzionalità polmonare rispetto ai pazienti trattati con busulfano. BU: busulfano ev o os; TBI: Total Body Irradiation; CI95%: intervallo di confidenza al 95%.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Jacobson LO, Marks EK, et al. The role of the spleen in radiation injury. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1949 Apr;70(4):740-2.
2. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *Journal of the National Cancer Institute*. 1951 Aug;12(1):197-201.
3. Main JM, Prehn RT. Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *Journal of the National Cancer Institute*. 1955 Feb;15(4):1023-9.
4. Trentin JJ. Effect of x-ray dose on mortality and skin transplantability in mice receiving F1 hybrid marrow. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1956 Oct;93(1):98-100.
5. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. 1956 Mar 10;177(4506):452-4.
6. Mc GJ, Jr., Russell PS, Atkins L, Webster EW. Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission. *The New England journal of medicine*. 1959 Apr 2;260(14):675-83.
7. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *The Journal of clinical investigation*. 1959 Oct;38:1709-16.
8. Thomas ED, Ashley CA, Lochte HL, Jr., Jaretzki A, 3rd, Sahler OD, Ferrebee JW. Homografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood*. 1959 Jun;14(6):720-36.
9. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta haematologica*. 1958 Jul-Oct;20(1-4):156-66.
10. Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *The New England journal of medicine*. 1975 Apr 17;292(16):832-43.
11. Hansen JA, Clift RA, Thomas ED, Buckner CD, Storb R, Giblett ER. Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. *The New England journal of medicine*. 1980 Sep 4;303(10):565-7.
12. Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Experimental hematology*. 1986 Mar;14(3):192-6.

13. Socinski MA, Cannistra SA, Elias A, Antman KH, Schnipper L, Griffin JD. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* (London, England). 1988 May 28;1(8596):1194-8.
14. Schmitz N, Dreger P, Suttorp M, Rohwedder EB, Haferlach T, Loffler H, et al. Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor). *Blood*. 1995 Mar 15;85(6):1666-72.
15. Schmitz N, Beksac M, Hasenclever D, Bacigalupo A, Ruutu T, Nagler A, et al. Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia. *Blood*. 2002 Aug 1;100(3):761-7.
16. Blaise D, Kuentz M, Fortanier C, Bourhis JH, Milpied N, Sutton L, et al. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol*. 2000 Feb;18(3):537-46.
17. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989 May;86(10):3828-32.
18. Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E, Auerbach AD, Douglas G, Cooper S, et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood cells*. 1991;17(2):313-29.
19. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine*. 1989 Oct 26;321(17):1174-8.
20. Rocha V, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone marrow transplantation*. 2008 Jan;41(2):207-14.
21. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*. 1998 Feb 1;91(3):756-63.
22. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):265-84.
23. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, Moricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors

in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 2010 Apr 22;115(16):3206-14.

24. Fagioli F, Zecca M, Rognoni C, Lanino E, Balduzzi A, Berger M, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: a retrospective multicenter study of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Jun;18(6):852-60.

25. Mann G, Attarbaschi A, Schrappe M, De Lorenzo P, Peters C, Hann I, et al. Improved outcome with hematopoietic stem cell transplantation in a poor prognostic subgroup of infants with mixed-lineage-leukemia (MLL)-rearranged acute lymphoblastic leukemia: results from the Interfant-99 Study. *Blood*. 2010 Oct 14;116(15):2644-50.

26. Balduzzi A, Valsecchi MG, Uderzo C, De Lorenzo P, Klingebiel T, Peters C, et al. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet (London, England)*. 2005 Aug 20-26;366(9486):635-42.

27. Peters C, Schrauder A, Schrappe M, von Stackelberg A, Stary J, Yaniv I, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukaemia: the BFM/IBFM/EBMT concepts. *Bone marrow transplantation*. 2005 Mar;35 Suppl 1:S9-11.

28. Amadori S, Testi AM, Arico M, Comelli A, Giuliano M, Madon E, et al. Prospective comparative study of bone marrow transplantation and postremission chemotherapy for childhood acute myelogenous leukemia. The Associazione Italiana Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 1993 Jun;11(6):1046-54.

29. Horan JT, Alonzo TA, Lyman GH, Gerbing RB, Lange BJ, Ravindranath Y, et al. Impact of disease risk on efficacy of matched related bone marrow transplantation for pediatric acute myeloid leukemia: the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35):5797-801.

30. Niewerth D, Creutzig U, Bierings MB, Kaspers GJ. A review on allogeneic stem cell transplantation for newly diagnosed pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Sep 30;116(13):2205-14.

31. Pession A, Masetti R, Rizzari C, Putti MC, Casale F, Fagioli F, et al. Results of the AIEOP AML 2002/01 multicenter prospective trial for the treatment of children with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 Jul 11;122(2):170-8.

32. Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kerndrup G, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*. 2003 Feb;17(2):277-82.

33. Locatelli F, Nollke P, Zecca M, Korthof E, Lanino E, Peters C, et al. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): results of the EWOG-MDS/EBMT trial. *Blood*. 2005 Jan 1;105(1):410-9.
34. Strahm B, Nollke P, Zecca M, Korthof ET, Bierings M, Furlan I, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for advanced myelodysplastic syndrome in children: results of the EWOG-MDS 98 study. *Leukemia*. 2011 Mar;25(3):455-62.
35. Hall GW. Cytogenetic and molecular genetic aspects of childhood myeloproliferative/myelodysplastic disorders. *Acta haematologica*. 2002;108(4):171-9.
36. Cwynarski K, Roberts IA, Iacobelli S, van Biezen A, Brand R, Devergie A, et al. Stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in children. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1224-31.
37. Sureda A, Robinson S, Canals C, Carella AM, Boogaerts MA, Caballero D, et al. Reduced-intensity conditioning compared with conventional allogeneic stem-cell transplantation in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma: an analysis from the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol*. 2008 Jan 20;26(3):455-62.
38. Claviez A, Canals C, Dierickx D, Stein J, Badell I, Pession A, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents with recurrent and refractory Hodgkin lymphoma: an analysis of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2009 Sep 3;114(10):2060-7.
39. Gross TG, Hale GA, He W, Camitta BM, Sanders JE, Cairo MS, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for refractory or recurrent non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Feb;16(2):223-30.
40. Majhail NS, Tao L, Bredeson C, Davies S, Dehn J, Gajewski JL, et al. Prevalence of hematopoietic cell transplant survivors in the United States. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Oct;19(10):1498-501.
41. Chow EJ, Cushing-Haugen KL, Cheng GS, Boeckh M, Khera N, Lee SJ, et al. Morbidity and Mortality Differences Between Hematopoietic Cell Transplantation Survivors and Other Cancer Survivors. *J Clin Oncol*. 2017 Jan 20;35(3):306-13.
42. Chow EJ, Anderson L, Baker KS, Bhatia S, Guilcher GM, Huang JT, et al. Late Effects Surveillance Recommendations among Survivors of Childhood Hematopoietic Cell Transplantation: A Children's Oncology Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 May;22(5):782-95.

43. Gurney JG, Ness KK, Rosenthal J, Forman SJ, Bhatia S, Baker KS. Visual, auditory, sensory, and motor impairments in long-term survivors of hematopoietic stem cell transplantation performed in childhood: results from the Bone Marrow Transplant Survivor study. *Cancer*. 2006 Mar 15;106(6):1402-8.
44. Horwitz M, Auquier P, Barlogis V, Contet A, Poiree M, Kanold J, et al. Incidence and risk factors for cataract after haematopoietic stem cell transplantation for childhood leukaemia: an LEA study. *British journal of haematology*. 2015 Feb;168(4):518-25.
45. Suh DW, Ruttum MS, Stuckenschneider BJ, Mieler WF, Kivlin JD. Ocular findings after bone marrow transplantation in a pediatric population. *Ophthalmology*. 1999 Aug;106(8):1564-70.
46. Kinahan KE, Sharp LK, Seidel K, Leisenring W, Didwania A, Lacouture ME, et al. Scarring, disfigurement, and quality of life in long-term survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor study. *J Clin Oncol*. 2012 Jul 10;30(20):2466-74.
47. Martires KJ, Baird K, Steinberg SM, Grkovic L, Joe GO, Williams KM, et al. Sclerotic-type chronic GVHD of the skin: clinical risk factors, laboratory markers, and burden of disease. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4250-7.
48. Michelis FV, Kotchetkov R, Grunwald RM, Azeem A, Atenafu EG, Lipton JH, et al. Long-Term Incidence of Secondary Malignancies after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Single-Center Experience. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Jun;23(6):945-51.
49. Sanders JE, Hoffmeister PA, Woolfrey AE, Carpenter PA, Storer BE, Storb RF, et al. Thyroid function following hematopoietic cell transplantation in children: 30 years' experience. *Blood*. 2009 Jan 8;113(2):306-8.
50. Bailey HK, Kappy MS, Giller RH, Gralla J. Time-course and risk factors of hypothyroidism following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children conditioned with fractionated total body irradiation. *Pediatric blood & cancer*. 2008 Sep;51(3):405-9.
51. Tauchmanova L, Selleri C, Rosa GD, Pagano L, Orio F, Lombardi G, et al. High prevalence of endocrine dysfunction in long-term survivors after allogeneic bone marrow transplantation for hematologic diseases. *Cancer*. 2002 Sep 1;95(5):1076-84.
52. Brignardello E, Corrias A, Isolato G, Palestini N, Cordero di Montezemolo L, Fagioli F, et al. Ultrasound screening for thyroid carcinoma in childhood cancer survivors: a case series. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008 Dec;93(12):4840-3.
53. Chemaitilly W, Li Z, Krasin MJ, Brooke RJ, Wilson CL, Green DM, et al. Premature Ovarian Insufficiency in Childhood Cancer Survivors: A Report From

the St. Jude Lifetime Cohort. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2017 Jul 1;102(7):2242-50.

54. Metzger ML, Meacham LR, Patterson B, Casillas JS, Constine LS, Hijiya N, et al. Female reproductive health after childhood, adolescent, and young adult cancers: guidelines for the assessment and management of female reproductive complications. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 20;31(9):1239-47.

55. Kenney LB, Cohen LE, Shnorhavorian M, Metzger ML, Lockart B, Hijiya N, et al. Male reproductive health after childhood, adolescent, and young adult cancers: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2012 Sep 20;30(27):3408-16.

56. Biasin E, Salvagno F, Berger M, Nesi F, Quarello P, Vassallo E, et al. Ovarian tissue cryopreservation in girls undergoing haematopoietic stem cell transplant: experience of a single centre. *Bone marrow transplantation*. 2015 Sep;50(9):1206-11.

57. Joshi S, Savani BN, Chow EJ, Gilleece MH, Halter J, Jacobsohn DA, et al. Clinical guide to fertility preservation in hematopoietic cell transplant recipients. *Bone marrow transplantation*. 2014 Apr;49(4):477-84.

58. Mulder RL, Kremer LC, van Santen HM, Ket JL, van Trotsenburg AS, Koning CC, et al. Prevalence and risk factors of radiation-induced growth hormone deficiency in childhood cancer survivors: a systematic review. *Cancer treatment reviews*. 2009 Nov;35(7):616-32.

59. Patterson BC, Chen Y, Sklar CA, Neglia J, Yasui Y, Mertens A, et al. Growth hormone exposure as a risk factor for the development of subsequent neoplasms of the central nervous system: a report from the childhood cancer survivor study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014 Jun;99(6):2030-7.

60. Ergun-Longmire B, Mertens AC, Mitby P, Qin J, Heller G, Shi W, et al. Growth hormone treatment and risk of second neoplasms in the childhood cancer survivor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006 Sep;91(9):3494-8.

61. Gower WA, Collaco JM, Mogayzel PJ, Jr. Pulmonary dysfunction in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients: non-infectious and long-term complications. *Pediatric blood & cancer*. 2007 Sep;49(3):225-33.

62. Armstrong GT, Liu Q, Yasui Y, Neglia JP, Leisenring W, Robison LL, et al. Late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: a summary from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol*. 2009 May 10;27(14):2328-38.

63. Uhlving HH, Buchvald F, Heilmann CJ, Nielsen KG, Gormsen M, Muller KG. Bronchiolitis obliterans after allo-SCT: clinical criteria and treatment options. *Bone marrow transplantation*. 2012 Aug;47(8):1020-9.

64. Lipshultz SE, Adams MJ, Colan SD, Constine LS, Herman EH, Hsu DT, et al. Long-term cardiovascular toxicity in children, adolescents, and young adults who receive cancer therapy: pathophysiology, course, monitoring, management, prevention, and research directions: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2013 Oct 22;128(17):1927-95.
65. Armenian SH, Sun CL, Kawashima T, Arora M, Leisenring W, Sklar CA, et al. Long-term health-related outcomes in survivors of childhood cancer treated with HSCT versus conventional therapy: a report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study (BMTSS) and Childhood Cancer Survivor Study (CCSS). *Blood*. 2011 Aug 4;118(5):1413-20.
66. Nieder ML, McDonald GB, Kida A, Hingorani S, Armenian SH, Cooke KR, et al. National Cancer Institute-National Heart, Lung and Blood Institute/pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium First International Consensus Conference on late effects after pediatric hematopoietic cell transplantation: long-term organ damage and dysfunction. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Nov;17(11):1573-84.
67. Jones DP, Spunt SL, Green D, Springate JE. Renal late effects in patients treated for cancer in childhood: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatric blood & cancer*. 2008 Dec;51(6):724-31.
68. McDonald GB. Hepatobiliary complications of hematopoietic cell transplantation, 40 years on. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010 Apr;51(4):1450-60.
69. Castellino S, Muir A, Shah A, Shope S, McMullen K, Ruble K, et al. Hepato-biliary late effects in survivors of childhood and adolescent cancer: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatric blood & cancer*. 2010 May;54(5):663-9.
70. Socie G, Baker KS, Bhatia S. Subsequent malignant neoplasms after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Jan;18(1 Suppl):S139-50.
71. Krishnan A, Bhatia S, Slovak ML, Arber DA, Niland JC, Nademanee A, et al. Predictors of therapy-related leukemia and myelodysplasia following autologous transplantation for lymphoma: an assessment of risk factors. *Blood*. 2000 Mar 1;95(5):1588-93.
72. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, Socie G, Kingma DW, Banks PM, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood*. 1999 Oct 1;94(7):2208-16.
73. Rowlings PA, Curtis RE, Passweg JR, Deeg HJ, Socie G, Travis LB, et al. Increased incidence of Hodgkin's disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1999 Oct;17(10):3122-7.

74. Majhail NS, Brazauskas R, Rizzo JD, Sobecks RM, Wang Z, Horowitz MM, et al. Secondary solid cancers after allogeneic hematopoietic cell transplantation using busulfan-cyclophosphamide conditioning. *Blood*. 2011 Jan 6;117(1):316-22.
75. Rizzo JD, Curtis RE, Socie G, Sobocinski KA, Gilbert E, Landgren O, et al. Solid cancers after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2009 Jan 29;113(5):1175-83.
76. Wong JYC, Filippi AR, Dabaja BS, Yahalom J, Specht L. Total Body Irradiation: Guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group (ILROG). *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2018 Jul 1;101(3):521-9.
77. Girinsky T, Benhamou E, Bourhis JH, Dhermain F, Guillot-Valls D, Ganansia V, et al. Prospective randomized comparison of single-dose versus hyperfractionated total-body irradiation in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2000 Mar;18(5):981-6.
78. Labar B, Bogdanic V, Nemet D, Mrsic M, Vrtar M, Grgic-Markulin L, et al. Total body irradiation with or without lung shielding for allogeneic bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*. 1992 May;9(5):343-7.
79. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschorner WE, Bias WB, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *The New England journal of medicine*. 1983 Dec 1;309(22):1347-53.
80. Wall DA, Chan KW, Nieder ML, Hayashi RJ, Yeager AM, Kadota R, et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of intravenous busulfan in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric blood & cancer*. 2010 Feb;54(2):291-8.
81. Dalle JH, Wall D, Theoret Y, Duval M, Shaw L, Larocque D, et al. Intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in infants: clinical and pharmacokinetic results. *Bone marrow transplantation*. 2003 Oct;32(7):647-51.
82. Andersson BS, Kashyap A, Gian V, Wingard JR, Fernandez H, Cagnoni PJ, et al. Conditioning therapy with intravenous busulfan and cyclophosphamide (IV BuCy2) for hematologic malignancies prior to allogeneic stem cell transplantation: a phase II study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(3):145-54.
83. Davies SM, Ramsay NK, Klein JP, Weisdorf DJ, Bolwell B, Cahn JY, et al. Comparison of preparative regimens in transplants for children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000 Jan;18(2):340-7.

84. Bunin N, Aplenc R, Kamani N, Shaw K, Cnaan A, Simms S. Randomized trial of busulfan vs total body irradiation containing conditioning regimens for children with acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study. *Bone marrow transplantation*. 2003 Sep;32(6):543-8.
85. Lucchini G, Labopin M, Beohou E, Dalissier A, Dalle JH, Cornish J, et al. Impact of Conditioning Regimen on Outcomes for Children with Acute Myeloid Leukemia Undergoing Transplantation in First Complete Remission. An Analysis on Behalf of the Pediatric Disease Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Mar;23(3):467-74.
86. Ferry C, Socie G. Busulfan-cyclophosphamide versus total body irradiation-cyclophosphamide as preparative regimen before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: what have we learned? *Experimental hematology*. 2003 Dec;31(12):1182-6.
87. Litzow MR, Perez WS, Klein JP, Bolwell BJ, Camitta B, Copelan EA, et al. Comparison of outcome following allogeneic bone marrow transplantation with cyclophosphamide-total body irradiation versus busulphan-cyclophosphamide conditioning regimens for acute myelogenous leukaemia in first remission. *British journal of haematology*. 2002 Dec;119(4):1115-24.
88. Kanda Y, Sakamaki H, Sao H, Okamoto S, Kodera Y, Tanosaki R, et al. Effect of conditioning regimen on the outcome of bone marrow transplantation from an unrelated donor. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 Nov;11(11):881-9.
89. Uberti JP, Agovi MA, Tarima S, Haagenson M, Gandham S, Anasetti C, et al. Comparative analysis of BU and CY versus CY and TBI in full intensity unrelated marrow donor transplantation for AML, CML and myelodysplasia. *Bone marrow transplantation*. 2011 Jan;46(1):34-43.
90. Wingard JR, Plotnick LP, Freemer CS, Zahurak M, Piantadosi S, Miller DF, et al. Growth in children after bone marrow transplantation: busulfan plus cyclophosphamide versus cyclophosphamide plus total body irradiation. *Blood*. 1992 Feb 15;79(4):1068-73.
91. Michel G, Socie G, Gebhard F, Bernaudin F, Thuret I, Vannier JP, et al. Late effects of allogeneic bone marrow transplantation for children with acute myeloblastic leukemia in first complete remission: the impact of conditioning regimen without total-body irradiation--a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997 Jun;15(6):2238-46.
92. Bernard F, Auquier P, Herrmann I, Contet A, Poiree M, Demeocq F, et al. Health status of childhood leukemia survivors who received hematopoietic cell transplantation after BU or TBI: an LEA study. *Bone marrow transplantation*. 2014 May;49(5):709-16.

93. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone marrow transplantation. 1995 Jun;15(6):825-8.
94. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2005 Dec;11(12):945-56.
95. Parsons SK, Tighiouart H, Terrin N. Assessment of health-related quality of life in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients: progress, challenges and future directions. Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research. 2013 Apr;13(2):217-25.
-