

Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica

**Gruppo di Lavoro “Insufficienze Midollari”
Coordinatore: Dr.ssa Francesca Fioredda**

**RACCOMANDAZIONI DIAGNOSTICO-TERAPEUTICHE
SULLE APLASIE MIDOLLARI ACQUISITE
IN ETÀ PEDIATRICA**

Autori: A. Guarina, P. Farruggia, P. Saracco, A. Barone, D. Onofrillo, S. Cesaro, R. Angarano, W. Barberi, S. Bonanomi, P. Corti, B. Crescenzi, A. De Matteo, R. De Vito, A.P. Iori, S. Ladogana, A. Lucarelli, B. Martire, E. Mastrodicasa, G. Menna, M. Miano, L.D. Notarangelo, G. Palazzi, F. Pierri, M. Pillon, U. Ramenghi, G. Russo, F. Saettini, F. Timeus, F. Verzegnassi, M. Zecca, F. Fioredda, C. Dufour.

Sommario

1. ABBREVIAZIONI FREQUENTEMENTE USATE NEL TESTO.....3

2. METODOLOGIA.....6

3. DEFINIZIONE, CLASSIFICAZIONE, EZIOLOGIA, EPIDEMIOLOGIA, FISIOPATOLOGIA, CLINICA, RAPPORTI CON EMOGLOBINURIA PAROSSISTICA NOTTURNA.....8

 3.1 DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE SULLA BASE DELLA GRAVITÀ 8

 3.2 EZIOLOGIA 8

 3.2.1 AA E SOSTANZE CHIMICHE 9

 3.3 EPIDEMIOLOGIA 10

 3.4 FISIOPATOLOGIA 10

 3.4.1 ANEMIA APLASTICA ACQUISITA ED EMOGLOBINURIA PAROSSISTICA NOTTURNA (PHN) 11

4. DIAGNOSI 13

 4.1 ITER DIAGNOSTICO INIZIALE 13

 4.2 DIAGNOSI DIFFERENZIALE 14

 4.3 ANEMIA APLASTICA ACQUISITA ASSOCIATA AD EPATITE (HEPATITIS-ASSOCIATED APLASTIC ANEMIA, HAAA) ... 19

5. TERAPIA 19

6. TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA.....20

 6.1 FATTORI PREDITTIVI DI RISPOSTA E INDICAZIONI..... 20

 6.2 GLOBULINA ANTILINFOCITARIA..... 22

 6.3 CICLOSPORINA 23

 6.4 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA EMATOLOGICA DOPO IST..... 26

 Esami per la valutazione della risposta 26

 6.5 TERAPIE ALTERNATIVE IMMUNOSOPPRESSIVE E NON 27

7. TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE36

 7.1 TRAPIANTO ALLOGENICO DA DONATORE FAMILIARE HLA IDENTICO 36

 Regime di condizionamento..... 36

 Profilassi GVHD 38

 Fonte di cellule staminali 40

 7.2 TRAPIANTO ALLOGENICO DA DONATORE NON FAMILIARE 41

 Regime di condizionamento FCA 42

 Regime di condizionamento FCC..... 44

 Profilassi GVHD 44

 Fonte di cellule staminali 44

 Review, Consensus e Linee guida 45

 7.3 TRAPIANTO ALLOGENICO DA DONATORE ALTERNATIVO 46

Trapianto con sangue di cordone da banca	46
Trapianto allogenico da donatore aploidentico	47
7.4 SECONDO TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE IN SAA	49
8. FOLLOW-UP	51
Evoluzione clonale nelle AA	51
Secondi tumori nella AA.....	53
8.1 FOLLOW UP NEI PAZIENTI TRATTATI CON TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA.....	54
Recidiva	54
Esami per la valutazione della recidiva	55
Trattamento della recidiva	55
8.2 FOLLOW UP NEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE.....	56
Rigetto e recidiva.....	56
8.3 IL FOLLOW UP DELLA AA NON SEVERA (NSAA).....	56
9. TERAPIA DI SUPPORTO	58
9.1 TRASFUSIONE DI EMOCOMPONENTI.....	58
9.2 TERAPIA FERROCHELANTE	62
9.3 SUPPORTO PSICOLOGICO	63
9.4 G- CSF	64
9.5 SUPPORTO ANTI-INFETTIVO.....	64
9.6 VACCINAZIONI	66
9.7 GRAVIDANZA	68
BIBLIOGRAFIA.....	71

1. ABBREVIAZIONI FREQUENTEMENTE USATE NEL TESTO

AA *Acquired Aplastic Anaemia*, Anemia Aplastica Acquisita

AIDS *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, Sindrome da Immunodeficienza Acquisita

AIEOP Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica

AF Anemia di Fanconi

AL Acute Leukemia, Leucemia Acuta

ALL-T *Acute Lymphoblastic Leukemia T*, Leucemia Linfoblastica Acuta T

AML *Acute Myeloid Leukemia*, Leucemia Mieloide Acuta

ATG *Anti-Thymocyte Globulin*, Globulina Antilinfocitaria

BOM Biopsia Osteomidollare

cAMT *Congenital Amegakaryocytic Thrombocytopenia*, Trombocitopenia Amegacariocitica Congenita

cGy CentiGray

cMPL Gene Codificante per il Recettore della Trombopoietina

CMV Citomegalovirus

CsA Ciclosporina A

CSE Cellule Staminali Emopoietiche

CTX Ciclofosfamide

CVC Catetere venoso centrale

DADA2 Deficit di adenosina deaminasi 2

DBA Anemia di Diamond – Blackfan

DD Diagnosi differenziale

DDT Dichlorodiphenyltrichloroethane

DEB Diepossibutano

DKC *Dyskeratosis Congenita*, Discheratosi Congenita

DKC1 Dyskeratosis Congenita Gene 1

EBMT European Group for Blood and Marrow Transplantation

EBV Epstein Barr Virus

EFS *Event free survival*, sopravvivenza libera da eventi

EO Expert Opinion

FANS Farmaci Antiinfiammatori Non Steroidei

FFS *Failure free survival*

FISH *Fluorescence in Situ Hybridization*, Ibridazione Fluorescente in Situ

FKBP12 12-kDa FK506-binding protein

FLAER fluorescent-labeled aerolysin

FUO Febbre di origine sconosciuta

FUP Follow up

GB Globuli Bianchi

G-CSF *Granulocyte Colony Stimulating Factor*, Fattore di Crescita Granulocitario

GDL Gruppo di Lavoro

GF Graft Failure

GPI Glicosilfosfatidilinositolo

GITMO Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo, Cellule Staminali Emopoietiche e Terapia Cellulare

GVHD *Graft Versus Host Disease*, Malattia del Trapianto verso l'Ospite

Gy Gray

HAA *Hepatitis-Associated Aplasia*, Aplasia Associata ad Epatite

HAV Virus dell'Epatite A

HBV Virus dell'Epatite B

HCV Virus dell'Epatite C

HDV Virus dell'Epatite D

HEV Virus dell'Epatite E

HGV Virus dell'Epatite G

HHV6 Herpes Virus Umano 6

HIV Virus dell'Immunodeficienza Umana

HLA Antigene Umano Leucocitario

HMGA2 High Mobility Group AT-Hook 2 Gene

HSCT *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, Trapianto di Cellule Staminali Emopoietiche

IgG Immunoglobulina di Classe G

IL2 Interleuchina 2

INF-gamma Interferon-gamma

IST *Immunosuppressive Therapy*, Terapia Immunosoppressiva

LDH Lattato Deidrogenasi

LES Lupus Eritematoso Sistemico

MDMA 3,4 Methylenedioxymethamphetamine

MDS *Myelodysplastic Syndrome*, Sindrome Mielodisplastica

MMC Mitomicina-C

MMF Micofenolato Mofetile

MoAb Anticorpo Monoclonale

MPD Metilprednisolone

MRD *Matched Related Donor*, Donatore correlato di Midollo osseo

mTOR Bersaglio della Rapamicina nei Mammiferi

MTX Methotrexate

MUD *Matched Unrelated Donor*, Donatore non Correlato di Midollo osseo

NIH National Institute of Health

NSAA Non Severe Aplastic Anaemia, Anemia Aplastica Moderata

ORR *Overall Response Rate*, tasso di sopravvivenza globale

OS *Overall Survival*, sopravvivenza globale

PDN Prednisone

PLT Piastrine

PNH Emoglobinuria Parossistica Notturna

PRES Sindrome da Encefalopatia Posteriore Reversibile

PTLD Disordine Linfoproliferativo Post-Trapianto

RAPA Rapamicina

RCC Citopenia refrattaria

RMN Risonanza Magnetica Nucleare

RT-PCR Reazione a Catena della Polimerasi in Tempo Reale

SAA *Severe Aplastic Anaemia*, Anemia Aplastica Grave

SAAWP *Severe Aplastic Anaemia Working Party*

SDS Sindrome di Shwachman-Diamond

TBC Tubercolosi

TBI *Total body irradiation*, irradiazione corporea totale

T-CGF Fattore di crescita dei Linfociti T

TCSE Trapianto di cellule staminali ematopoietiche

TERC Telomerase RNA Component

TERT *Telomerase Reverse Transcriptase*

TINF2 Proteina 2 Legante le Ripetizioni Telomeriche

TNF-alfa Fattore di Necrosi Tumorale-Alfa

TPO *Thrombopoietin*, Trombopoietina

USA Stati Uniti d'America

VSAA *Very Severe Aplastic Anaemia*, Anemia Aplastica Molto Grave

2. METODOLOGIA

La produzione di queste raccomandazioni è avvenuta a partire da una valutazione delle migliori prove scientifiche disponibili sul tema, realizzata attraverso una revisione della letteratura esistente, dal 2013 ad oggi.

E' presente una parte descrittiva, seguita dalle raccomandazioni, che sono state oggetto della votazione durante la Consensus Conference finale.

La parte descrittiva descrive lo stato dell'arte, riassumendo le evidenze disponibili, basate su risultati di studi sperimentali, caratterizzati da diversa "forza" dimostrativa, in conseguenza del tipo di studio.

La forza delle evidenze è stata attribuita seguendo il seguente criterio di selezione dei lavori (prospettici, retrospettivi, caso controllo), case series, case report:

- I (il più alto) Studio clinico randomizzato con alto valore statistico;
- II Studio clinico randomizzato con valore statistico limitato;
- III Studio clinico non randomizzato con gruppo di controllo;
- IV Studio clinico non randomizzato con gruppo di controllo storico; studio osservazionale;
- V (il più basso) Descrizione di casistica, senza gruppo di controllo;
- EO: Expert opinion, Reviews, Linee-Guida;
- Metanalisi: gli studi di metanalisi offrono già una revisione delle evidenze e sono serviti per "rinforzare" o "indebolire" la forza delle evidenze.

In base a questa selezione dei lavori, la qualità delle evidenze è risultata:

- Alta, derivante da lavori di grado I-II;
- Moderata, derivante da lavori di grado III;
- Bassa, derivante da lavori di grado IV;
- Molto bassa, derivante da lavori di grado V o da EO.

Seguendo il metodo GRADE, molto utilizzato nella stesura rigorosa di Raccomandazioni e Linee-guida, il giudizio di qualità (alta, moderata, bassa, molto bassa) delle evidenze è stato aumentato (upgrading) o diminuito (downgrading), secondo le seguenti indicazioni:

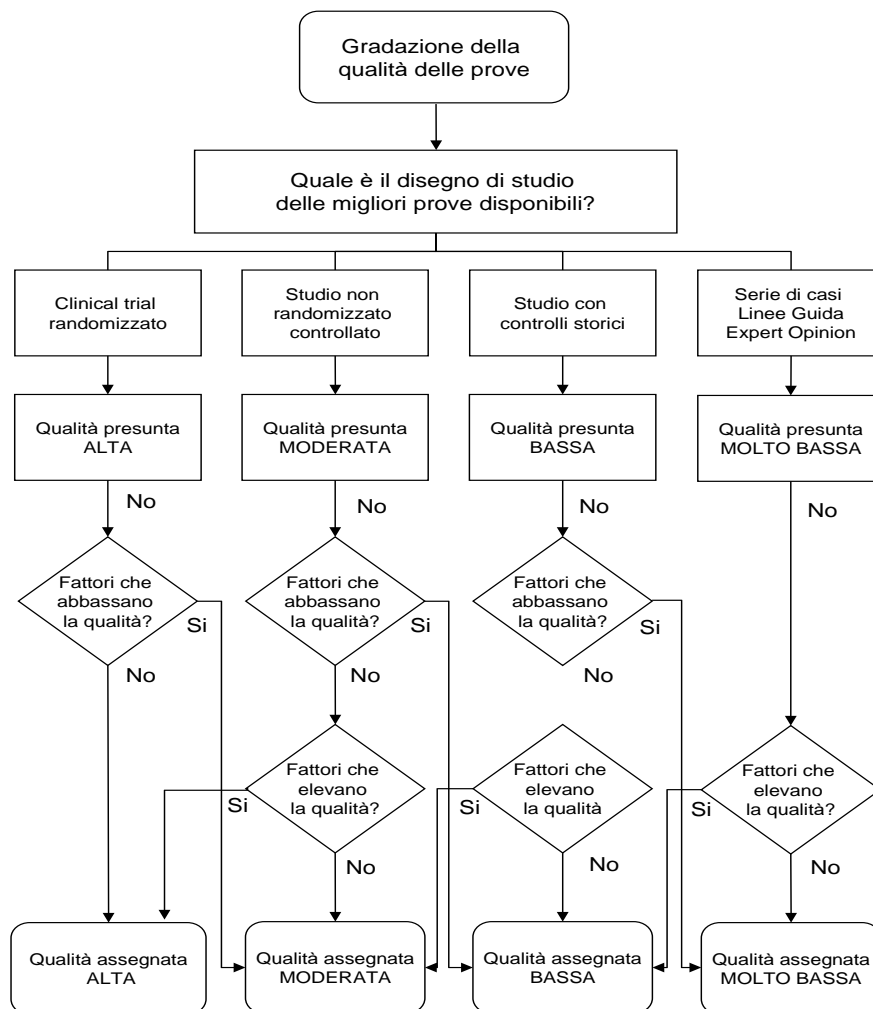
Diminuzione (downgrading) della categoria di attribuzione (es. da "alta" a "moderata"):

- incoerenza dei risultati tra studi differenti sullo stesso quesito;
- alcune (-1 livello) o importanti (-2 livelli) incertezze circa la diretta trasferibilità dei risultati rispetto ai soggetti/pazienti per i quali deve essere formulata la raccomandazione.

Aumento (upgrading) della categoria di attribuzione (es. da "bassa" a "moderata"):

- associazione intervento-outcome forte, sulla base di prove concordanti provenienti da due o più studi osservazionali, senza alcun fattore di confondimento plausibile;
- presenza di un gradiente dose-risposta;

Anche le metanalisi e le Cochrane reviews hanno contribuito a far aumentare o diminuire il giudizio di qualità delle evidenze dei singoli studi (Figura).



Votazioni

- Voto 1-3: rappresenta disaccordo sull'enunciato;
- Voto 4-6: rappresenta accordo moderato sull'enunciato;
- Voto 7-9: rappresenta accordo pieno sull'enunciato;

E' stato poi calcolato un punteggio medio (*"forza del consenso"*) per ogni singolo enunciato.

- Il risultato tra 1 e 3 è stato considerato indicativo di non raccomandato;
- Il risultato tra 3.01 e 6.99 come indicativo di non uniformemente raccomandato;
- Il risultato tra 7 e 9 come raccomandato.

E' stato poi calcolato il livello di unanimità (*"livello del consenso"*):

- Livello A (accordo forte) in presenza di una varianza per singolo enunciato < varianza media;
- Livello B (accordo moderato) in presenza di una varianza entro 2 DS dalla varianza media;
- Livello C (disaccordo) in presenza di una varianza > 2 DS dalla varianza media.

Infine, per ogni enunciato è stato riportato:

- Livello di evidenza
- Livello del consensus
- Forza del consensus

3. DEFINIZIONE, CLASSIFICAZIONE, EZIOLOGIA, EPIDEMIOLOGIA, FISIOPATOLOGIA, CLINICA, RAPPORTI CON EMOGLOBINURIA PAROSSISTICA NOTTURNA

3.1 DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE SULLA BASE DELLA GRAVITÀ

Il termine **ANEMIA APLASTICA (AA)** o più propriamente **APLASIA MIDOLLARE** definisce una condizione patologica caratterizzata da pancitopenia periferica dovuta a ridotta o assente produzione di cellule ematiche da parte del midollo osseo, in assenza di infiltrato cellulare atipico e senza aumento di reticolina (Marsh JC et al. Br J Haematol 2009; Killick SB et al. Br J Hematol 2016).

L'AA può essere differenziata, in base alla gravità, in 3 forme (Camitta BM et al. Blood 1976, Bacigalupo A et al. Br J Hematol 1988, Guinan EC Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011) (Tabella 1).

Tabella 1. Classificazione delle AA in base alla gravità

MODERATA O NON GRAVE	GRAVE	MOLTO GRAVE
Cellularità emopoietica midollare <30% Neutrofili >500 ≤1000/mmc Oppure: non criteri delle altre 2 forme	Cellularità emopoietica midollare < 30% Almeno due delle seguenti condizioni: Neutrofili < 500/mmc Piastrine < 20.000/mmc Reticolociti < 20.000/mmc	Come grave ma: Neutrofili <200/mmc

3.2 EZIOLOGIA

La maggioranza dei casi di AA (70-80%) è idiopatica; in alcuni casi si può identificare un farmaco, un agente chimico o infettivo quale possibile causa precipitante o scatenante l'insufficienza midollare.

Una possibile classificazione delle aplasie midollari acquisite comprende:

- Idiopatiche o immuno-mediate (causa non documentabile).
- Da cause infettive (virus epatitici, EBV, CMV, Parvovirus B19, virus erpetici, Adenovirus, HIV, Micobatteri etc.).
- Da esposizione tossica a radiazioni e agenti chimici (Tabella 2).
- Da Graft versus host disease (GVHD).
- In corso di gravidanza.
- In corso di timoma.
- In corso di emoglobinuria parossistica notturna (AA/PNH).
- Da deficit di vitamina B12, acido folico, rame.
- In corso di patologie autoimmuni (LES, ALPS etc.).
- Associata a difetti immunologici.

Nel 15-20% delle AA e nel 25-30% delle AA pediatriche (Bessler M. et al Nathans and Oski's Hematology of infancy and childhood, 2014) un'aplasia apparentemente acquisita può in realtà essere una forma di insufficienza midollare costituzionale/ereditaria, causata da mutazioni di geni coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA, nella biogenesi e/o funzione dei ribosomi, nella riparazione e/o protezione dei telomeri ovvero nel pathway di differenziazione e/o autorinnovamento delle cellule staminali; possibili anche forme di AA nell'ambito di immunodisregolazioni costituzionali (Furlong E et al. J Paediatr Child Health 2020; Young NS NEJM 2018; Bluteau O et al. Blood 2017, Wlodarski MW et al. Elsevier Incorporated 2017, Kuehn HS et al. Science 2014, Michniacki TF et al. J Clin Immunol 2018, Savage SA Semin Hematol. 2017). Qui di seguito sono riportate le patologie/sindromi più frequentemente associate:

- Anemia di Fanconi (AF)
- Discheratosi congenita (DKC)
- Sindrome di Shwachman-Diamond (SDS)
- Trombocitopenia congenita amegacariocitica (CAMT)
- Sindrome di Diamond-Blackfan (DBA)
- Deficit di GATA2
- Deficit di adenosina deaminasi 2 (DADA2)
- Deficit di CTLA-4

Oltre alle condizioni genetiche più note, sono state riscontrate occasionalmente varianti anche a carico di geni solo di rado associati a sindromi da insufficienza midollare, quali SAMD9/SAMD9L (fenotipo caratterizzato da aplasia transitoria e monosomia 7), MECOM/EVI1 (fenotipo caratterizzato da grave anemia aplastica neonatale) e ERCC6L2 (fenotipo caratterizzato da lieve pancitopenia e sindrome mielodisplastica - MDS) (Bluteau O et al. Blood 2017).

Il presente documento si riferisce in modo specifico alla forma di AA acquisita idiopatica, solitamente immuno-mediata.

3.2.1 AA E SOSTANZE CHIMICHE

Riguardo agli agenti chimici, numerose sono le sostanze il cui uso è stato associato all’insorgenza di AA. Esse sono riassunte nella Tabella 2.

È in genere estremamente difficile dimostrare il ruolo eziologico di una sostanza. Tuttavia, laddove il ruolo eziologico di un farmaco venga considerato altamente probabile, va valutata la possibilità di sospensione dello stesso, ove possibile.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.7; livello del consensus B)

Tabella 2. Elenco delle sostanze per le quali è stata riportata associazione con l’insorgenza di AA

FARMACI	
Antibiotici	cloramfenicolo (non evidenza per colliri né compresse), sulfonamidi, cotrimossazolo, linezolid
Antireumatici	Sali d'oro, penicillamina
Antinfiammatori	indometacina, fenilbutazone, naproxene, diclofenac, piroxicam, sulfasalazina
Anticonvulsivanti	fenitoina, carbamazepina
Antitiroidei	carbimazolo, tiouracile
Antidepressivi	fenotiazine, dotiepina
Ipoglicemizzanti	clorpropamide, tolbutamide
Antimalarici	cloroquina
Altri	mebendazolo, allopurinolo, tiazidi
SOSTANZE CHIMICHE	

Benzene e altri solventi	
Pesticidi	Organo-cloruri ed organo-fosfati, pentaclorofenolo, DDT e carbamati
Oli e agenti lubrificanti	
Droghe	ecstasy, MDMA
Altri	esposizione a specie animali aviarie o a fertilizzanti animali

3.3 EPIDEMIOLOGIA

L'incidenza di AA nel mondo occidentale è di 2 nuovi casi/anno/milione di abitanti, mentre risulta 2-3 volte superiore nell'est asiatico. Il rapporto maschi-femmine è di 1:1 e vi sono 2 picchi di incidenza, uno nel giovane adulto e l'altro nell'anziano (Montanè E et al. Haematologica 2008, Young NS et al. Haematologica 2008). L'età mediana alla diagnosi in età pediatrica è 8-9 anni (Hartung HD et al. Pediatr Clin North Am 2013, Furlong E et al. J Paediatr Child Health. 2020).

3.4 FISIOPATOLOGIA

Dal punto di vista patogenetico, l'AA è una malattia multifattoriale in cui differenti meccanismi sono coinvolti, talora in modo associato (Young NS Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2013).

L'ipotesi più accreditata è una disregolazione del sistema immunitario che comporta la distruzione di cellule staminali ad opera di linfociti T autoreattivi in individui geneticamente predisposti (Young NS. NEJM 2018). Anche difetti intrinseci dei progenitori emopoietici e disfunzioni del microambiente midollare possono contribuire allo sviluppo della malattia (Schoettler ML et al Hematol Oncol Clin North Am 2018).

Uno dei meccanismi prevalenti è quello immuno-mediato verso un antigene quasi sempre sconosciuto, per effetto del quale cloni T auto-reattivi si attivano, liberando citochine mielosoppressive fra cui TNF-alfa e INF-gamma, le quali, bloccando la mitosi e inducendo l'apoptosi via Fas/FasL distruggerebbero le cellule staminali midollari (Dufour C et al, Haematologica 2009, Lin F et al. Blood 2014; Wu Q et al. PloS One 2014, Liu CY et al. Genet Mol Res 2014, Smith JNP Front Immunol 2016, Young NS. NEJM 2018).

Nei pazienti aplastici è stata riscontrata un'espansione oligoclonale di linfociti T CD8+, a supporto dell'ipotesi che un antigene, presumibilmente di una cellula progenitrice, induca una risposta linfocitaria patologica (Schoettler ML et al Hematol Oncol Clin North Am 2018; Giudice V et al Haematologica 2018).

Anche mutazioni somatiche nel pathway di STAT3 possono essere patogenetiche in alcune forme di AA, inducendo cellule T costituzionalmente attivate (Jerez A et al. Blood 2013; Young NS NEJM 2018).

È stata riscontrata anche una correlazione significativa tra i polimorfismi +874 (T/A) e VNDR 1349 (omozigosi per 12 CA) di IFN-gamma e il rischio di insorgenza di AA (Deng S et al. Hematology 2020; Dufour C et al. Br J Haematol. 2004). IFN-gamma può, inoltre, esercitare il suo effetto inibitorio sulla proliferazione della cellula staminale impedendo il legame della trombopoietina (TPO) al recettore MPL espresso dei progenitori pluripotenti, attraverso la formazione di un complesso eteromerico incapace di legarsi al recettore.

Un numero limitato di studi ha inoltre valutato il potenziale ruolo eziopatogenetico dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) di FAS, FASL, FOXP3, alcuni dei quali (ad esempio il polimorfismo in rs3761549 di FOXP3) sembrano correlare non solo con l'insorgenza di AA ma anche con la risposta alla terapia immunosoppressiva (IST) (Savage SA et al Am J Hum Genet 2020; Won In J et al. Hematology. 2017).

Nei pazienti con AA sono state anche riportate anomalie numeriche e/o funzionali delle cellule CD4+ con aumento dei Th1 e Th2 e riduzione delle cellule T regolatorie, il cui ruolo è importante nella soppressione delle cellule T effettrici autoreattive (Kordasti S et al. Blood 2012; Young NS. NEJM 2018).

Alcuni polimorfismi genetici sono associati all'AA. Fra questi, HLA-DR2, HLA-B14 o delezioni del gene GSTT1. In molti studi l'antigene HLA DR2 è risultato iper-rappresentato in pazienti di varie etnie (anche europea e nordamericana) affetti da AA, PNH e, in particolare, da sindrome AA/PNH, ed è risultato essere predittivo pure di risposta alla IST (Maciejewski JP Blood 2001, Sauntharajah Y Blood 2002). I polimorfismi di HLA-A e HLA-DRB1 sono associati ad un aumentato rischio di AA, mentre altri polimorfismi di HLA-DRB avrebbero un effetto protettivo (Deng XZ et al. Hematology 2017). Si ipotizza che le varianti alleliche degli antigeni di istocompatibilità siano coinvolte nella patogenesi della AA con due meccanismi: l'attivazione di cellule T autoreattive e la ridotta produzione di cellule T autoregatorie (Zeng Y Clin Exp Immunol. 2015).

Nel 10-15% dei pazienti sono presenti cloni di cellule staminali che, per perdita di eterozigosi a carico di 6p o di mutazioni somatiche che comprendono gli alleli HLA codificanti la presentazione dell'autoantigene, sembrano sfuggire ai linfociti T citotossici (Babushok DV et al. Blood Adv. 2017, Betensky M et al. Cancer Genetics 2016, Zaimoku Y et al. Blood 2017; Wlodarski MW et al. Blood 2012).

Un'altra caratteristica dei pazienti aplastici è rappresentata dall'accorciamento dei telomeri nei leucociti, imputabile ad un meccanismo di stress replicativo per l'aumentata domanda mitotica su un pool limitato di cellule staminali (Townsend DM et al. Blood 2014), ovvero a fattori genetici, epigenetici o ambientali sconosciuti (Schoettler ML et al Hematol Oncol Clin North Am 2018). L'accorciamento del telomero può essere però anche dovuto a varianti nei geni di riparazione o protezione dei telomeri (DKC1, TERC, TERT etc.) che sono responsabili di forme costituzionali di aplasia (Aspesi A et al. Pediatr Blood Cancer 2010, Townsend DM et al. Blood 2014). Questo particolare meccanismo si realizzerebbe in quelle forme apparentemente acquisite ma in realtà legate a un substrato genetico, in cui il fenotipo somatico extramidollare è molto attenuato o del tutto normale. Di rilievo è poi il fatto che la lunghezza dei telomeri alla diagnosi di AA risulta essere il principale fattore predittivo di risposta all'IST (Narita A et al Haematologica 2015) e di possibile evoluzione in MDS/AML (Calado RT et al. Leukemia 2012; Calado RT et al. Blood 2015), forse anche attraverso un meccanismo di instabilità genomica (Patel BJ Br J Haematol. 2020).

Un'ematopoiesi clonale è frequente nell'AA (Cooper JN et al. Blood 2017), indicando che l'accumulo di mutazioni può avere un ruolo nella malattia. Le mutazioni somatiche più frequentemente riscontrate sono BCOR/BCOR1, PIG-A e 6pLOH, mentre sono più rare quelle più tipicamente riscontrate in MDS/AML come DNMT3A e ASXL1 (Yoshizato T et al. NEJM 2015, Schoettler ML et al Hematol Oncol Clin North Am 2018). Tuttavia, i casi con cloni mutati solo raramente presentano un'evoluzione maligna (Young NS. NEJM 2018).

Il ruolo del microambiente midollare nella patogenesi dell'AA è suggerito dalla comparsa, nell'evoluzione delle AA sia costituzionali sia acquisite, delle stesse anomalie cromosomiche, in genere delezioni o monosomia del cromosoma 7, riscontrate in MDS/AML (Young NS. NEJM 2018).

Nella forma di AA da reazioni idiosincrasiche a farmaci è infine verosimile una tossicità diretta in un possibile ambito di aumentata suscettibilità individuale, geneticamente determinata, legata a deficit delle vie metaboliche di detossificazione: ad esempio il fenotipo null di alcune glutatone transferasi, iper-rappresentato nei pazienti aplastici asiatici, è risultato associato a un maggior rischio di sviluppare AA (Dirksen U et al. Pediatr Res. 2004). Tale associazione non è stata confermata nei pazienti europei (Dufour C et al. Haematologica 2005).

In sintesi, dunque, la patogenesi dell'AA appare complessa, multifattoriale e ancora non completamente definita in tutti i suoi aspetti (Savaşan S Pediatr Clin North Am 2018, Bluteau O et al. Blood 2017, Blombery P et al. Haematologica 2021).

3.4.1 ANEMIA APLASTICA ACQUISITA ED EMOGLOBINURIA PAROSSISTICA NOTTURNA (PNH)

La PNH deriva dall'espansione clonale di cellule staminali emopoietiche con mutazioni somatiche acquisite a carico del gene PIG-A, un enzima essenziale per la sintesi del glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI), molecola che a sua volta funge da sistema di ancoraggio per numerose proteine presenti sulla superficie cellulare

(proteine GPI-linked) (Peffault de Latour R et al. Blood 2008; Peffault de Latour R et al The EBMT Handbook 2019).

Vi è una complessa relazione tra aplasia midollare acquisita e PNH, con possibilità di evoluzione dall'una all'altra forma. Un'emopoiesi alterata è presente nella maggioranza dei pazienti con PNH, alla diagnosi o nel corso della malattia (Nishimura J et al. Medicine (Baltimore) 2004, Mercuri A et al. Blood Cells, Molecules and Diseases 2017). Metodiche citofluorimetriche ad alta risoluzione hanno permesso di evidenziare piccolissime percentuali di granulociti PNH+ anche in soggetti normali (Araten DJ et al. Proc Natl Acad Sci USA 1999).

L'ipotesi più accreditata per spiegare l'espansione clonale nella PNH è che le cellule PNH+ possano selezionarsi in quanto resistenti ad un insulto immuno-mediato, fenomeno chiamato "immune escape" (Karadimitris A et al Blood 2000). Vi sarebbe cioè un vantaggio selettivo in termini di sopravvivenza delle cellule ematopoietiche GPI- (glycosylphosphatidylinositol) che vengono differentemente riconosciute da cellule T o NK. Ad esempio, nei pazienti con AA ed evidenza di cloni PNH sono state riscontrate cellule T CD1d+ reattive verso GPI (Gargiulo L et al. Blood 2017; Luzzatto L BJH 2020). Ciò spiega la frequente osservazione di cloni PNH (anche in assenza di sintomatologia franca da PNH) nella aplasia midollare acquisita. Si tratta solitamente di cloni minori, la cui presenza è stata in alcuni studi associata ad una migliore risposta alla terapia immunosoppressiva (Maciejewski JP et al. Blood 2001, Ishiyama K et al. Blood 2003, Sugimori C et al. Blood 2006, Narita A et al Haematologica 2015, Zhao X et al. Ann Hematol. 2015), anche se vi sono pochi studi che valutino la presenza e l'evoluzione di cloni PNH in pazienti pediatrici con AA (Urbano-Ispizua et al. Haematologica 2017, Sreedharanunni S et al. Pediatr Blood Cancer. 2016, Yoshida N et al. Br J Haematol. 2008, Timeus F et al. Br J Haematol. 2010, Timeus F et al. ASH Annual Meeting Abstracts 2012).

L'osservazione in 2 pazienti PNH di un riarrangiamento del cromosoma 12 interessante il gene HMGA2 ha suggerito che l'espansione dei cloni PNH possa essere un processo multistep con l'acquisizione da parte di cellule PIGA mutate di una minore suscettibilità all'apoptosi (Inoue N et al. Blood. 2006). È stato anche ipotizzato che una deregolazione dell'espressione del gene HMGA2 in pazienti con PNH e senza anomalie cromosomiche possa essere alla base dell'espansione del clone PNH (Murakami Y et al. Br J Haematol. 2012).

Un sostanziale miglioramento nell'approccio diagnostico della PNH si deve all'impiego, dal 1996 (Hall SE et al. Blood. 1996), della citofluorimetria: con questa metodica è possibile valutare l'espressione di varie molecole GPI-linked sulla superficie delle diverse popolazioni cellulari.

L'analisi citofluorimetrica, fornendo un dato quantitativo anche in termini di intensità di espressione delle molecole GPI-linked, ha permesso di evidenziare popolazioni eritrocitarie PNH con deficit totale (PNH tipo III) o parziale (PNH tipo II), associate a diverso tipo di mutazione del gene PIGA (phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis Class A) (frame shift mutations versus point mutations).

Il test va eseguito sui granulociti neutrofili e sugli eritrociti; la popolazione che meglio riflette le dimensioni del clone PNH è quella dei granulociti, in quanto gli eritrociti PNH possono risultare sottostimati a causa di eventuali emotrasfusioni ricevute o della presenza di emolisi intravascolare; in caso di presenza del clone, l'analisi va estesa ai monociti, che costituiscono anche un test di conferma. Un passo successivo nella diagnosi citofluorimetrica di PNH è stato l'utilizzo della aerolisina batterica inattiva in grado di legarsi direttamente alla ancora GPI: tale metodica è dotata di maggiore sensibilità nell'evidenziare cloni PNH rispetto ai classici anticorpi monoclonali come l'anti-CD59 (Brodsky RA et al. Am J Clin Pathol. 2000).

Attualmente i panels e le procedure consigliate per evidenziare un clone PNH in un paziente affetto da AA sono i seguenti (Borowitz MJ Cytometry B Clin Cytom. 2010, Cytometry B Clin Cytom. 2018):

- globuli rossi: analisi su sangue intero senza lisi dei globuli rossi, numero minimo di eventi da acquisire nel gate 3×10^5 ; MoAb antiCD235a e anti-CD59;

- granulociti e monociti: analisi dopo lisi dei globuli rossi, gating sequenziale, numero minimo di eventi da acquisire nel gate 3×10^5 ; MoAb anti-CD45, CD33, CD15, CD14, CD24, FLAER.

4. DIAGNOSI

4.1 ITER DIAGNOSTICO INIZIALE

L'algoritmo diagnostico deve essere costruito allo scopo di:

- Caratterizzare e definire il grado di aplasia.
- Proporre un approccio *ragionato* per evidenziare l'eventuale agente causale dell'AA ed approfondire altre possibili cause di pancitopenia con midollo ipocellulare (Tab 3a).
- Effettuare una accurata diagnosi differenziale con forme neoplastiche/constituzionali/autoimmuni o legate a disregolazione immunitaria (Tabella 3b, 3c).

L'iter diagnostico iniziale deve prevedere:

Anamnesi familiare: etnia, consanguineità e studio di eventuale familiarità per anemia, citopenia, neoplasie ematologiche ed epiteliali (possibili elementi di sospetto forme di aplasia eredo-familiari).

Anamnesi personale: esposizione a sostanze ematotossiche (Marsh J et al. BJH 2009, Rovo A et al. BMT 2013) e/o infezioni. La principale infezione che può precedere una aplasia acquisita è un'epatite (par 4.3). La durata della citopenia, se prolungata, può rappresentare un criterio che ne definisce la natura congenita.

Esame Clinico: deve includere lo stato di accrescimento staturale-ponderale, ed in primis, va mirato ad escludere la presenza di malformazioni, microcefalia, dismorfismi facciali, anomalie scheletriche (arti, etc), macchie cutanee, distrofia ungueale, incanutimento precoce, ipogonadismo, alterazioni orofaringee (eritro/leucoplachia) ed altri elementi caratterizzanti le forme congenite (Shimamura A. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009). Vanno poi indagati i segni ed i sintomi della AA, di solito legati alla gravità della pancitopenia (pallore, astenia, tachicardia, infezioni e/o febbre, petecchie, ecchimosi, emorragie, etc.). L'esame obiettivo può poi fornire dati sul coinvolgimento di fegato, polmoni e SNC (epatosplenomegalia, segni di insufficienza respiratoria, atassia cerebellare etc).

Esame emocromocitometrico: di norma caratterizzato da anemia normocromica normocitica o macrocitica, leuco/neutropenia e piastrinopenia; nelle fasi iniziali può esserci una citopenia isolata, in genere piastrinopenia, con piastrine di basso volume (Rovo A et al. BMT 2013).

Striscio di sangue periferico: sono assenti i blasti, le emazie presentano anisopoichilocitosi e frequentemente macrocitosi; i neutrofili possono presentare granulazioni tossiche. In generale mancano le alterazioni morfologiche di monociti, neutrofili ed eritrociti tipiche della MDS (Rovo A et al BMT2013) (tabella 3c).

Conta reticolocitaria: caratterizzata da marcata reticolocitopenia, con reticolociti $<20.000/\text{mmc}$ se metodo manuale o $<60.000/\text{mmc}$ se con contaglobuli automatizzato (lo strumento può sovrastimare i valori bassi) (Rovo A et al BMT2013).

Screening immunologico: valutazione delle sottopopolazioni linfocitarie, ricerca di autoanticorpi e dosaggio delle immunoglobuline permettono di evidenziare eventuali segni di immunodisregolazione o immunodeficienze potenzialmente alla base dell'insufficienza midollare. Dosaggio titolo anticorpale contro agenti vaccinali.

Aspirato midollare: non consente, da solo, una corretta valutazione della cellularità emopoietica del midollo osseo, in quanto un midollo osseo ipocellulare può essere legato a problemi tecnici di aspirazione e, raramente, può anche accadere di osservare una cellularità normale, qualora il prelievo sia stato fatto in una delle isole di ematopoiesi ancora conservate.

Biopsia osteomidollare: è l'esame diagnostico elettivo che evidenzia adipocitosi midollare con scomparsa o marcata riduzione delle cellule emopoietiche (possono essere presenti piccoli foci di emopoiesi residua normomaturante) con aumento diffuso e uniforme delle cellule adipose. Al contrario dell'aspirato midollare, offre la possibilità di valutare comparativamente la componente cellulare

emopoietica e non (grasso, stroma, reticolo, cellule infiammatorie), mostrando così una effettiva riduzione delle cellule emopoietiche; ciò aiuta a differenziare le AA dalle leucemie ipocellulari dove sono presenti i blasti e dalle MDS, in cui sono in genere presenti dis-eritro/dis-mielo e dis-megacariocitopoiesi (Niemeyer CM et al. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011). Quantificazione immunoistochimica delle CD 34 come indicato in tabella 3a.

Ecografia dell'addome: la valutazione ecografica addominale è suggerita al fine di valutare qualitativamente il parenchima epatico e quello splenico, oltre che per identificare la presenza di eventuali malformazioni renali.

4.2 DIAGNOSI DIFFERENZIALE

La diagnosi differenziale è finalizzata ad escludere altri disordini ematologici caratterizzati da midollo ipoplasico. Tre sono gli ambiti più frequentemente implicati: leucemie e MDS ipocellulari, insufficienze midollari congenite, immunodeficienze/immunodisregolazioni.

Leucemia ipocellulare: una pancitopenia con ipoplasia midollare può rappresentare l'esordio di una leucemia acuta (AL), sia mieloide sia linfoide, con una bassa conta di blasti (fenomeno che può perdurare anche per alcune settimane). Circa il 2% di tutte le leucemie linfoblastiche acute (ALL) dell'infanzia sono precedute da una fase di aplasia transitoria, per le forme mieloidi il fenomeno è più tipico e frequente in età adulta (Bennet JM et al. Haematologica 2009). La biopsia ossea può consentire di porre diagnosi di AL in caso di aspirazione inefficace e, generalmente, non mostra l'incremento del tessuto adiposo tipico delle AA. In caso di sospetto esordio ipocellulare di leucemia si raccomanda la ricerca di marcatori molecolari di monoclonalità. Un altro criterio orientativo verso la leucemia è la presenza di cellule CD34+. Nel pannello citofluorimetrico si consiglia di includere i marcatori sia mieloidi che linfoidi (Bennet JM et al. Haematologica 2009). Le cellule ematopoietiche nella fase aplastica hanno generalmente un cariotipo normale, ma talvolta possono essere identificate le anomalie citogenetiche caratteristiche della leucemia conclamata diagnosticata fino a 9 mesi dopo (Niemeyer CM et al. Hematol Educ Program 2011).

Mielodisplasia ipocellulare e Citopenia refrattaria pediatrica (RCC): circa il 20% delle MDS si presenta con midollo ipocellulare. La forma più frequente di MDS dei bambini è la citopenia refrattaria pediatrica (RCC), introdotta come entità provvisoria nella WHO del 2008 e confermata come tale nella revisione del 2017: la diagnosi differenziale con la AA è difficoltosa e dibattuta. La RCC è infatti una forma di mielodisplasia di basso grado, perlopiù ipocellulare (almeno nell'80% dei casi) di cui, nonostante negli ultimi anni siano state ampliate le conoscenze dei markers molecolari caratteristici, esistono ancora quadri che non è possibile classificare geneticamente e che solo la morfologia ed in particolare l'istologia riesce ad identificare. Come evidenziato nella tabella 3a, la diagnosi differenziale tra SAA ed RCC comprende alterazioni morfologiche delle tre linee cellulari che vanno dalla ridotta maturazione della granulopoiesi, alle alterazioni morfologiche della linea megacariocitica con la presenza caratteristica di micromegacariociti nella RCC, alle alterazioni della linea eritroide che si caratterizza dal punto di vista citologico per presenza di forme megaloblastoidi con segmentazioni e ponti nucleari e dal punto di vista istologico per la presenza di isole eritroidi ampie composte da oltre 20-30 cellule immature irregolarmente distribuite nel contesto di un midollo adiposo. È proprio quest'ultimo l'aspetto più caratteristico per l'orientamento verso la RCC, ma essendo focale può sfuggire ad un singolo campionamento, per cui è importante avere due prelievi biotici a distanza di almeno due settimane per esaminare una adeguata quantità di tessuto e prevenire l'erroneo inquadramento come aplasia di una RCC (Baumann I et al. Histopathology 2012).

Nota sullo studio citogenetico midollare: in circa la metà dei casi di MDS pediatriche ipocellulari sono riscontrabili anomalie citogenetiche (monosomia del cromosoma 7, trisomia del cromosoma 8 o del cromosoma 21, cariotipo complesso con ≥ 3 anomalie). Generalmente nelle aplasie midollari lo studio citogenetico è normale, anche se in circa il 10-12% dei casi può individuarsi un clone citogenetico anormale e le anomalie riscontrabili sono, almeno in parte, le stesse delle MDS ipocellulari. Nelle AA le anomalie cromosomiche possono anche essere transitorie e ciò riflette una oligoclonalità delle cellule staminali. Nei casi di clonalità invece, in aggiunta a -7, +8 e +21, si possono riscontrare anomalie

numeriche e strutturali a carico del cromosoma 13 e trisomia del cromosoma 6 (Hasle H et al. Curr Opin Pediatr 2007).

Nel midollo aplastico spesso è difficile ottenere materiale sufficiente per l'analisi del cariotipo, per cui si consiglia, in caso di materiale insufficiente, di ripetere più volte il prelievo. In alternativa l'analisi di FISH in interfase può integrare la citogenetica convenzionale con sonde centromeriche e locus specifiche per le regioni cromosomiche più frequentemente coinvolte (Gupta V et al. Br J Haematol 2006, Hasle H. Curr Opin Pediatr 2007).

Tabella 3a. Caratteristiche istologiche e citomorfologiche delle RCC e delle AA

	hRCC		AA	
CRITERIO	BIOPSIA OSTEOMIDOLLARE	ASPIRATO MIDOLLARE	BIOPSIA OSTEOMIDOLLARE	ASPIRATO MIDOLLARE
Eritropoiesi	Distribuzione focale Deviazione a sinistra della curva di maturazione Incremento delle mitosi	Segmentazione nucleare Multinuclearità Modificazioni megaloblastoidi	Assente o piccolo focolaio singolo <10 cellule con maturazione	Assente o marcatamente ridotta, senza displasia o modificazioni megaloblastoidi
Granulopoiesi	Marcatamente ridotta Deviazione a sinistra della curva di maturazione	Anomalie pseudo-Pelger-Huët Citoplasma agranulare-ipogranulare Anomalie di maturazione nucleo-citoplasmatiche	Assente o marcatamente ridotta, piccoli foci di cellule maturanti	Poche cellule maturanti, assenza di displasia
Megacariocitopoiesi	Marcatamente ridotta o assente Alterazioni displastiche Micromegacariociti	Micromegacariociti Nuclei multipli e separati Nuclei piccoli e tondi	Assente o marcatamente ridotta, assenza di displasia	Assente o ridotta, assenza di displasia
Linfociti	Possono essere aumentati, in maniera focale o dispersa	Possono essere aumentati	Possono essere aumentati, in maniera focale o dispersi, in genere ci sono prevalentemente linfociti	Possono essere aumentati
Precursori cellulari CD34+	Non aumentati		Non aumentati	Non aumentati
Precursori cellulari KIT+ (CD117+)	Non aumentati		Non aumentati	Non aumentati
Mast cells KIT+ (CD117+)	Lievemente aumentate		Lievemente aumentate	

Differenze istologiche e citomorfologiche fra hRCC e AA. Modificata da Baumann I., Niemeyer C. M., Bennet J. M. Childhood myelodysplastic syndrome, in WHO 2017).

Aplasie genetiche e/o costituzionali: sono in genere associate a segni e sintomi somatici (ritardo di accrescimento staturo-ponderale, anomalie della pigmentazione cutanea, distrofia di unghie ed annessi, malformazioni viscerali, alterazioni scheletriche, alterazioni metaboliche etc) che le rendono identificabili. Può però accadere che alcune forme genetiche presentino un fenotipo sfumato o normale (AF, alcune forme di DKC, cAMT, DBA, SDS) (Alter B Hematology Am Soc haematol Program 2007). Anche nel caso

di mutazioni di *TERT* o *TERC*, i soggetti possono non presentare segni di classica DKC ed avere una familiarità negativa. I soggetti con mutazioni di tali geni tendono ad avere ipocellularità midollare, ridotto numero di cellule CD34+ e di progenitori emopoietici, ma l'emocromo può essere normale o con solo lievi anomalie (come la macrocitosi), specie nella fase iniziale.

Oltre alle insufficienze midollari tradizionali sopracitate, ci sono forme che esordiscono con ipo/aplasia midollare e che possono evolvere o associarsi a trasformazioni neoplastiche: i geni imputati includono in primis *GATA2*, *RUNX1*, *DDX41*, *ANKRD26*, *SAMD9*, *SAMD9L*, *ETV6*, *SRP54*, *MECOM*, ma il loro numero è certamente destinato ad aumentare (Godley LA et al. Blood 2017). Sarebbe opportuno che anche queste varianti, ove possibile, fossero inserite nel pannello diagnostico.

Per tutte queste ragioni lo studio genetico delle forme di AA, soprattutto in quei casi in cui non ci sono delle "suggestioni" cliniche, deve comprendere pannelli piuttosto estesi di geni e può talora essere utile lo studio dell'intero genoma. Di seguito la tabella 3b che identifica la tipologia degli esami suggeriti e le rispettive informazioni fornite.

Tabella 3b. Esami di screening per la diagnosi differenziale con malattie congenite e/o alle forme da disregolazione immunitaria

TEST DI SCREENING PER LA RICERCA DI DISORDINI EREDITARI	INFORMAZIONI SU
Sensibilità cromosomica alla MMC o DEB test su sangue periferico (se dubbio da eseguire anche su fibroblasti per eventuale studio mosaicismo)	Sospetto di Anemia di Fanconi Scelta del condizionamento in caso di BMT (nelle aplasie non Fanconi ma con fragilità cromosomica)
Studio della lunghezza dei telomeri	Discheratosi e altre malattie del telomero <ul style="list-style-type: none"> a. <1 percentile: verosimile telomeropatia b. 1-10 percentile: possibile telomeropatia ma anche altre insufficienze midollari congenite (ie DBA)
Screening genetico mirato su periferico/midollo/fibroblasti per mutazioni germinali/somatiche (sanger PCR)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>TERC</i> ha frequente associazione (1-10%) con aplasia idiopatica - Se telomero corto o altre stimate ricerca geni discheratosi più frequenti: <i>DKC1</i>, <i>TINF2</i> - Se Trombocitopenia con assenza di megacariociti: <i>c-Mpl</i> - Se Monocitopenia, infezioni da papillomavirus, linfedema etc; <i>GATA2</i> - Se disturbi metabolici/pancreatici: <i>SDS</i> - Se storia di patologia vascolare/infiammazione: <i>ADA2</i>
Pannelli NGS comprendenti geni coinvolti in: DKC, AF, DBA, CAMT, SCN, GATA2 deficiency, DADA2, sindromi dell'immunodisregolazione etc WES	
Indagini strumentali	Esami radiologici per evidenziare displasia scheletrica (FA, SDS; TAR; MECOM) Ecocardiogramma ed elettrocardiogramma Ecografia/TAC d'organo per esaminare possibili malformazioni/danni d'organo
Screening genetico dei donatori	In caso di trapianto lo studio genetico dei potenziali donatori familiari è cruciale al fine di evitare di scegliere un donatore con la stessa mutazione e quindi una inadeguata riserva di cellule staminali.

Malattie autoimmuni/da disregolazione immunitaria o immunodeficienze: le alterazioni del sistema immunitario devono essere tenute in considerazione nella DD e ricercate con esami di screening mirati. È noto, infatti, che segni di immunodisregolazione possono essere presenti nelle Aplasie costituzionali “classiche” e addirittura possono raramente rappresentarne l’espressione clinica prevalente (Korthof et al. Am J Hematol 2016, Allenspach EJ et al. J Allergy Clin Immunol. 2013), vista la penetranza incompleta delle mutazioni coinvolte che può portare a quadri clinici spesso sfumati e di non chiara interpretazione. Tuttavia, è anche noto che l’autoimmunità secondaria a sindromi dell’immunodisregolazione può colpire i precursori midollari generando quindi insufficienza midollare. (Sayour EJ et al. Pediatr Blood Cancer 2016, Sklarz T et al. Cold Spring Harb Mol case Stud 2020). Lo scenario diagnostico è ulteriormente complicato da alcuni disordini congeniti in cui sia l’insufficienza midollare che l’immunodisregolazione sono parte integrante del processo fisiopatologico, creando di fatto un quadro di “overlap” tra immunodeficienza e aplasia. Ad esempio, le proteine coinvolte nelle “Chromosomal breakage Syndromes” alterano sia la ricombinazione VDJ del TCR e delle immunoglobuline che l’omeostasi della cellula staminale emopoietica (Chrzanowska KH et al. Orphanet J Rare Dis 2012). Il deficit di GATA2 coinvolge un fattore di trascrizione che gioca anch’esso un ruolo chiave nell’omeostasi della staminale, particolarmente evidente nei precursori mielo-monocitari, generando quindi non solo l’insufficienza midollare ma anche monocitopenia e immunodeficit (Ganapathi KA et al. and Blood. 2015, Oleaga-Quintas C et al. J Clin Immunol 2021). ADA2 è invece un enzima prodotto dalle cellule dendritiche, particolarmente espresso a livello del midollo osseo e con il ruolo di legarsi a specifici recettori delle cellule T con un’attività di stimolo e regolazione ancora non ben chiarita. Il suo deficit porta ad un quadro clinico di immunodisregolazione ed insufficienza midollare, particolarmente evidente a carico della serie rossa ma con citopenia anche secondaria a distruzione periferica immuno-mediata (Ly PG et al. Frontiers Ped 2018).

Il work-up per le AA prevede una serie di esami biochimici, genetici e strumentali, alcuni identificati come obbligatori, altri come ancillari. Di seguito la tabella di riferimento (Tabella 3c parte I e parte II).

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

Tabella 3c parte I. Esami diagnostici obbligatori

ESAMI DIAGNOSTICI OBBLIGATORI	INFORMAZIONI SU
Esame emocromocitometrico completo	Diagnosi e definizione di gravità
Conta dei reticolociti (con contaglobuli automatico o microscopio)	Diagnosi e definizione di gravità
Striscio di sangue periferico	Diagnosi differenziale
Esami di funzionalità epatica	Associazione con epatite
Sierologia e ricerca del genoma virale (DNA/RNA) dei virus epatitici ed epatotropi (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV, CMV, EBV, Parvovirus B19, HIV, HHV6).	Associazione con virus epatitici o altra infezione virale
Aspirato midollare per analisi morfologica, analisi immunofenotipica e cariotipo standard	Diagnosi, diagnosi differenziale, prognosi
Analisi citofluorimetrica su sangue midollare e periferico: ricerca di popolazioni monoclonali B- o T-cellulari, popolazioni di blasti. Ricerca di pattern anomali di maturazione/differenziazione come segno di displasia. Valutazioni dei monociti delle cellule B T ed NK	Diagnosi differenziale con neoplasie mieloidi, associazione con varianti genetiche peculiari. Associazione con linfoma

Biopsia osteomidollare con immuno-evidenziazione degli antigeni CD34 e CD117 e colorazioni per il ferro	Diagnosi, diagnosi differenziale, prognosi
Sensibilità cromosomica alla MMC o DEB test su sangue periferico	Diagnosi differenziale con AF
Ricerca di cloni PNH su sangue periferico mediante citofluorimetria multiparametrica nelle popolazioni dei neutrofili, dei monociti e degli eritrociti (se non trasfusi)	Associazione con cloni PNH: diagnosi, diagnosi differenziale, prognosi
Screening per autoanticorpi (pannello in funzione della presentazione clinica), inclusi anticorpi anti-nucleo ed anti-DNA. Sottopopolazioni linfocitarie con doppi negativi, dosaggio Ig; titoli vaccinali	Associazione con malattie autoimmuni, immunodeficienze, sindromi da immunodisregolazione: diagnosi, diagnosi differenziale, prognosi
Dosaggio di vitamina B12, acido folico, funzione tiroidea	Esclusione di deficit vitaminico o ipotiroidismo
Fibrinogeno, Ferritina	Diagnosi differenziale con la sindrome emofagocitica
Elastasi pancreatica fecale, amilasi e lipasi sieriche	Diagnosi differenziale con SDS
Dosaggio di bilirubina sierica, LDH, HbF	Indici aspecifici. Possono aumentare in caso di eritropoiesi inefficace di modesta entità
Rx-torace	Esclusione di infezioni o slargamento del mediastino per malattie proliferative
Ecografia addome ed ecocardiogramma	Aumento di volume di milza e/o linfonodi (linfoproliferazione acuta da neoplasia ematologia o Linfoproliferazione cronica benigna da Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa/ALPS). Malformazioni o malposizione di organi (AF).

Tabella 3c parte II. Esami diagnostici ancillari

ESAMI DIAGNOSTICI ANCILLARI	INFORMAZIONI SU
Culture di sangue midollare, colorazioni per bacilli acido-alcol resistenti su campioni istologici.	Ricerca di infezioni micobatteriche (soprattutto micobatteri atipici, meno frequentemente TBC).
Esecuzione su sangue midollare di FISH per monosomia 7, trisomia 8, delezione del 5q, etc.	Diagnosi, diagnosi differenziale, prognosi
Test clonogenici su midollo (risultati non ben standardizzati, non eseguibili in tutti i centri)	Diagnosi differenziale tra insufficienza midollare e MDS. Si può rilevare inibizione di colture di donatori omogruppo da parte del surnatante delle colture del paziente
Determinazione della lunghezza del telomero	L'accorciamento telomerico può essere effetto dell'aplasia o causa della stessa (marker di telomeropatia misconosciuta ed evoluta in aplasia). Telomero accorciato sull'intera popolazione cellulare (e comunque almeno su linfociti e granulociti, malattia del telomero) vs telomero accorciato solo sui granulociti (probabile AA)
STIR o RMN tradizionale di alcuni segmenti	Disomogeneità del contenuto midollare per

scheletrici (colonna vertebrale)	sostituzione di midollo da parte del tessuto adiposo (probable AA)
NGS/WGS	Diagnosi, diagnosi differenziale

È raccomandata la tipizzazione HLA alla diagnosi sia del paziente sia dei familiari.
(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 9; livello del consensus B).

Se non è disponibile un donatore familiare HLA identico, è consigliato avviare nel work-up iniziale la ricerca di un donatore nei registri internazionali.
(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 9; livello del consensus B)

4.3 ANEMIA APLASTICA ACQUISITA ASSOCIATA AD EPATITE (HEPATITIS-ASSOCIATED APLASTIC ANEMIA, HAAA)

L’AA acquisita associata ad epatite (HAAA) rappresenta una distinta sindrome clinica. È riportata nel 2-5% dei casi di AA in Occidente e nel 4-10% dei casi in aree geografiche con maggiore prevalenza di epatite (Estremo Oriente) oppure con basso livello socioeconomico; non è correlata ad età, sesso e gravità dell’epatite, sebbene sia più frequente nei bambini e in adolescenti o giovani adulti di sesso maschile (Brown KE et al. N Engl J Med 1997; Gonzalez-Casas R et al. Aliment Pharmacol Ther 2009; Rauff B et al. Virology journal 2011).

Si presenta, generalmente, con pancitopenia grave e ipoplasia midollare dopo 2-3 mesi dall’insorgenza di un episodio di epatite acuta, che può presentarsi in forma grave (fino a quadri di insufficienza epatica fulminante tali da richiedere il trapianto di fegato), o lieve e autolimitante ovvero cronica. Sebbene alcuni casi siano associati ad infezioni virali quali epatite A, epatite B, epatite C, epatite E, epatite G, virus epatitici non A-E, parvovirus B19, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6, Torque-Teno-virus, echovirus-3, HIV, nella maggior parte dei casi gli agenti eziologici non vengono identificati e la causa scatenante rimane sconosciuta (HAAA sieronegative) (Safadi R et al. Bone Marrow Transplant 2001; Alshaibani A et al. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2020).

La considerazione che l’HAAA può svilupparsi anche dopo trapianto di fegato eseguito per epatite fulminante, insieme al riscontro di varie alterazioni immunologiche descritte nei pazienti affetti da HAAA (riduzione del rapporto CD4+/CD8+, riduzione delle cellule T reg ed incremento delle citochine IFN-gamma e TNF-alfa nel sangue periferico, con associata infiltrazione diffusa del parenchima epatico da parte di linfociti T attivati) suggerisce una patogenesi di tipo immunomediato in cui, per esempio, durante le fasi precoci della flogosi epatocitaria, cloni di linfociti T citotossici (CTLs) stimolati da un’infezione virale, riconoscono antigeni comuni espressi sia dal fegato che dal midollo osseo l’espansione successiva di questi cloni CTLs condurrebbe successivamente all’apoptosi delle cellule staminali emopoietiche, determinando il quadro di AA (Ikawa Y et al. Br J Haematol 2013).

5. TERAPIA

Il trattamento dei pazienti pediatrici con AA va effettuato in centri specialistici di comprovata competenza nella gestione di pazienti con insufficienza midollare. Il centro deve garantire servizi e presidi idonei ad un rapido approvvigionamento di farmaci immunosoppressori specifici, una ottimale terapia di supporto trasfusionale ed antinfettiva e un’adeguata gestione medico/infermieristica (Höchsmann B et al. Bone Marrow Transplant. 2013; Korthof ET et al. Bone Marrow Transplant. 2013). L’iter diagnostico-terapeutico da intraprendere in un paziente pediatrico con pancitopenia idiopatica è estremamente complesso. In attesa di stabilire con certezza la diagnosi di AA ed il grado di severità, è indicato un limitato periodo di osservazione durante il quale va praticata la sola terapia di supporto. È inoltre raccomandabile che le condizioni cliniche del paziente, in termini di controllo emorragico e trattamento delle infezioni, vengano

stabilizzate prima dell'avvio del trattamento. Il trattamento specifico si basa sul ripristino della ematopoiesi attraverso il trapianto di cellule staminali emopoietiche o l'avvio di terapia immunosoppressiva.

6. TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA

La IST (Terapia Immunosoppressiva) combinata, ovvero l'associazione di ATG (Globulina Antilinfocitaria) e CsA (Ciclosporina A), è un trattamento consolidato per i pazienti affetti da AA che non dispongano di un donatore HLA identico.

Nella SAA la terapia combinata ha consentito di raggiungere una percentuale di risposte ematologiche ed un tasso di sopravvivenza libera da eventi significativamente superiori rispetto a quanto ottenuto nei pazienti trattati con la sola ATG (Bacigalupo A et al. Semin Hematol 2000; Frickhofen N et al. Blood 2003); anche nel setting di pazienti con NSAA trasfusione-dipendente, la combinazione di ATG e CsA è risultata più efficace della CsA in monoterapia (Marsh J et al. Blood. 1999; Jiang S et al. Pediatr Hematol Oncol. 2009)

6.1 FATTORI PREDITTIVI DI RISPOSTA E INDICAZIONI

Il continuo miglioramento dei risultati del trattamento trapiantologico nella AA pediatrica e la considerazione che l'outcome a lungo termine della IST è legato al rischio di refrattarietà, recidiva ed evoluzione clonale, conferiscono particolare interesse alla possibilità di avere dei fattori predittivi di risposta favorevole alla IST. Età, sesso, conte periferiche alla diagnosi, espressione di citochine, mutazioni geniche, presenza di cloni minori PNH, accorciamento dei telomeri, sono stati considerati in letteratura come fattori predittivi di risposta alla IST, talora con risultati contrastanti. In un precedente studio retrospettivo su 316 pazienti con SAA erano risultati altamente predittivi di risposta a sei mesi dalla terapia combinata i seguenti fattori: la giovane età e un numero elevato di reticolociti e linfociti all'esordio di malattia (nei pazienti con reticolociti > 25.000/mmc e linfociti > 1.000/mmc la risposta è stata pari all'83% rispetto al 41% dei pazienti con conte più basse) (Scheinberg P et al. Br J Haematol 2009). Mutazioni in *PIGA*, *BCOR*, and *BCORL1* sono state associate ad outcome favorevole, mentre mutazioni in *DNMT3A* and *ASXL1* hanno mostrato significato prognostico sfavorevole. Alti livelli di TPO, accorciamento dei telomeri, negatività per la presenza di cloni minori PNH sono state invece predittivi di risposta sfavorevole alla IST. Wang J et al (Exp Ther Med 2020) in una metanalisi di 10 studi, di cui 5 con pazienti in età pediatrica, pubblicati dal 1997 al 2011, comprendenti complessivamente 1820 casi, hanno riscontrato quali fattori di rischio significativamente correlati a una cattiva risposta alla IST l'età superiore ai 60 anni, la negatività per HLA-DR2 e il riscontro di anomalie citogenetiche ($p=0.006$, $p=0.04$ and $p=0.01$, rispettivamente). Tu J et al (Acta Haematol 2021) in una recente metanalisi hanno valutato il ruolo predittivo dei cloni PNH nella risposta a 6 mesi e nella mortalità precoce a 3 mesi in pazienti trattati con IST: sono stati analizzati 11 studi di coorte-controllati per un totale di 1236 pazienti. I pazienti PNH+ hanno mostrato una migliore risposta a 6 mesi (OR 2.85, CI 2.17-3.75, $p<0.00001$). Tuttavia, analizzando solo i casi pediatrici, non è stata osservata una significatività statistica ($p=0.08$). La mortalità precoce a 3 mesi non è stata influenzata dalla presenza di cloni PNH+.

Nella popolazione adulta con AA la terapia combinata garantisce una percentuale di risposte del 60-80% ed una sopravvivenza a 5 anni del 75-85% (Wang Set al. Int J Hematol 2013; Tichelli A et al. Ann Intern Med 2002; Bacigalupo A et al. Blood 2000; Rosenfeld S t al. JAMA. 2003; Locasciulli A et al. Haematologica 2007); nei pazienti pediatrici è stata riportata una sopravvivenza a 10 anni del 90% (Scheinberg P et al. J Pediatr 2008) con un tasso di recidiva intorno al 30% (Locasciulli A t al. Haematologica 2007; Schrezenmeier H et al. Br J Haematol 1993). Un recente studio retrospettivo del North American Pediatric Aplastic Anemia Consortium (Rogers et al. Haematologica 2019) ha valutato 314 pazienti pediatrici con AA trattati con IST (hATG/CsA) dal 2002 al 2014: a 5 anni l'OS era del 93%, ma con un EFS del 64% e senza evidenza di raggiungimento di un plateau. Una evoluzione in MDS o leucemia acuta è stata osservata nell'1.9% dei casi.

Un tapering più lento e graduale della CsA è stato associato ad una riduzione del tasso di recidiva sia nella popolazione adulta, come segnalato in uno studio EBMT (Bacigalupo A et al. Blood 2000), sia nella

popolazione pediatrica, nel cui ambito è stata riportata una incidenza cumulativa di ricaduta, a 10 anni, inferiore al 15% (Führer M et al. Blood 2005). Nello studio prospettico USA di un ciclo prolungato di CsA (2 anni, con tapering dopo 6 mesi) la ricaduta è stata solo ritardata ma non prevenuta (Scheinberg P et al. Am J Hematol 2014). Nel 2008 il gruppo di studio delle Insufficienze midollari dell'AIEOP (Saracco P et al. Br J Haematol 2008) ha condotto uno studio su 42 pazienti in età pediatrica trattati con IST, dimostrando come il rischio di ricaduta sia associato alla rapida sospensione di CyA in modo statisticamente significativo ($p = 0.001$): 60% rispetto al 7.6% nel gruppo sottoposto a lento tapering (incluso tapering molto lento, cioè < 0.3 mg/kg/mese e tapering lento, cioè 0.7-0.4 mg/kg/mese, senza alcuna differenza in termini di ricaduta tra i due gruppi). I pazienti in recidiva dopo una iniziale risposta al primo ciclo di IST possono giovarsi nuovamente dell'immunosoppressione, la quale offre una possibilità di sopravvivenza del 75%; anche un terzo ciclo di IST può costituire una opzione possibile nei pazienti che hanno precedentemente risposto a suddetta terapia (Gupta V et al. Br J Haematol 2005).

I pazienti che non rispondono ad un primo ciclo IST possono rispondere ad un secondo ciclo. In studi non recentissimi la possibilità di risposta era del 30-60% (Tichelli A et al. Br J Haematol 1998; Scheinberg P et al. Br J Haematol 2006), sia con ATG di cavallo (Gupta V et al. Br J Haematol 2005) sia con ATG di coniglio dopo mancata risposta ad ATG di cavallo (Scheinberg P et al. Br J Haematol 2006, Di Bona E et al. Br J Haematol 1999). Uno studio giapponese un po' più recente ha esaminato prospetticamente 52 bambini non responsivi al primo ciclo di ATG di coniglio che avevano ricevuto un secondo ciclo di ATG di coniglio o un trapianto da donatore non correlato: i dati apparivano molto meno confortanti con risposta al secondo ciclo solo dell'11% e sopravvivenza libera da ricaduta a 5 anni del 9.5%; tre pazienti hanno inoltre sviluppato anafilassi dopo somministrazione di ATG (Kosaka Y et al. Blood 2008). Non esistono poi dati conclusivi sulla risposta ad un secondo ciclo di ATG di cavallo dopo primo ciclo effettuato con ATG di coniglio.

In caso di fallimento dopo secondo ciclo IST la probabilità di risposta ad un terzo è molto ridotta. I pazienti refrattari alla IST presentano, verosimilmente, una malattia con fisiopatologia differente, ma al momento non sono disponibili strumenti e parametri sufficienti a distinguerli dai pazienti responsivi. Ovviamente una identificazione precoce dei casi sicuramente refrattari alla immunosoppressione sarebbe auspicabile al fine di avviarli precocemente a HSCT (trapianto di cellule staminali emopoietiche) da donatore alternativo.

In buona sostanza le indicazioni alla IST si sono via via ridotte nel corso degli ultimi anni e i dati più recenti (Dufour et al. Br J Haematol 2015) sono decisamente a favore di un approccio trapiantologico anche, secondo alcuni, nella terapia di prima linea in pazienti privi di un donatore familiare HLA identico; in un gruppo di pazienti di età inferiore a 20 anni affetti da AA e trattati in prima linea con HSCT tra il 2005 e il 2014 si è osservato una FFS a 2 anni sovrapponibile fra MRD (matched related donor) e MUD (matched unrelated donor) (92% vs 87%) e decisamente superiore a quello della IST (40%). Inoltre, una recente metanalisi (Zhu et al. BMC Immunol 2020) inclusiva di alcuni studi retrospettivi pediatrici (Dufour et al. BJH 2015a, Choi et al. BMT 2017) ha evidenziato che la qualità della vita nei pazienti sottoposti a IST è inferiore rispetto a quella dei pazienti sottoposti a trapianto, incluso il trapianto aploidentico. In conclusione, il continuo miglioramento dei risultati del trattamento trapiantologico nella AA pediatrica in termini non solo di sopravvivenza globale, ma soprattutto di sopravvivenza libera da eventi rispetto alla IST, ha di fatto portato a cambiare la strategia di scelta terapeutica a favore del trapianto rispetto alla IST.

Nei pazienti in cui non sia possibile effettuare, entro 2-3 mesi dalla diagnosi, un trapianto da donatore familiare HLA identico o da donatore non familiare HLA identico (inteso come con al massimo 1 antigene mismatched/10) può essere preso in considerazione un ciclo di IST.

(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8; livello del consensus C)

Nei pazienti che mancano sia di un donatore familiare HLA identico che di un donatore non familiare HLA identico (inteso come con al massimo 1 antigene mismatched/10) e che vengono

trattati con IST, in caso di recidiva, non appare opportuno praticare ulteriori cicli IST ma sembra consigliabile vagliare con attenzione tutte le strategie trapiantologiche disponibili.

(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.7; livello del consensus B)

6.2 GLOBULINA ANTILINFOCITARIA

L'ATG, globulina policlonale, è la frazione purificata di IgG ottenuta da sieri di animali (cavallo o coniglio) immunizzati con timociti umani o con linee T-cellulari.

La sua azione immunosoppressiva è legata principalmente alla deplezione dei linfociti circolanti attraverso la lisi complemento-mediata, l'attivazione T-cellulare e l'apoptosi; altri potenziali meccanismi d'azione includono la modulazione di molecole di adesione o dell'espressione di recettori chemochinici e l'induzione di cellule T regolatrici (Treg CD4+CD25+).

L'ATG di coniglio (Thymoglobuline) e quella di cavallo (Lymphoglobuline) hanno un analogo metodo di produzione, si legano ad epitopi simili e sono in grado di determinare una deplezione dei Linfociti T Citotossici CD8+ sovrapponibile. Tuttavia, l'impiego di ATG di coniglio si associa ad una deplezione più profonda dei Linfociti T CD4+. Rispetto all'ATG di cavallo, Thymoglobuline ha una maggiore emivita, una maggiore affinità per i linfociti umani, determina un periodo di linfopenia più lungo (Scheinberg P et al. Blood 2007) ed ha pertanto un potere immunosoppressivo maggiore (Atta EH et al. Ann Hematol 2010).

In Europa la preparazione standard di ATG è stata, sino ad alcuni anni fa, quella di ATG di cavallo (Horse ATG, Lymphoglobuline, Genzyme), impiegata in tutti gli studi cooperativi sino al 2009. Negli USA è stata utilizzata una preparazione di ATG di cavallo (ATGAM, Pfizer) ad un dosaggio leggermente diverso (40 mg/kg x 4 giorni) rispetto alla Lymphoglobuline, in genere impiegata a 15 mg/kg x 5 giorni. Nel 2007 in Europa la preparazione equina è stata ritirata dal commercio e sostituita da ATG di coniglio (Rabbit ATG, Thymoglobuline, Genzyme), spesso utilizzata, in precedenza, nella terapia immunosoppressiva di seconda linea. In Cina la non disponibilità della ATG di cavallo ed i minori costi rispetto alla ATG di coniglio hanno determinato l'utilizzo della ATG porcina, con risultati soddisfacenti nel trattamento immunosoppressivo della AA in età pediatrica (Cui Q et al. Int J Hematol 2018; Liu LP et al. Pediatr Res 2019).

Diversi studi, pilota e retrospettivi, hanno confrontato gli outcome dei pazienti trattati con ATG di cavallo con quelli dei pazienti trattati con ATG di coniglio.

In uno studio prospettico randomizzato (Scheinberg P et al. N Engl J Med 2011), condotto su pazienti pediatrici ed adulti affetti da AA, è stato dimostrato che la risposta ematologica dopo trattamento con ATG di coniglio è nettamente inferiore a quella ottenuta con ATG di cavallo (37% vs 68%). Anche la sopravvivenza nel braccio di ATG di coniglio è stata largamente inferiore (76%) a quella osservata nel braccio trattato con ATG di cavallo (96%).

Uno studio multicentrico europeo ha confrontato i risultati ottenuti in 35 pazienti trattati con ATG di coniglio e CsA con i risultati ottenuti in 105 pazienti trattati con ATG di cavallo e CsA. Il trattamento con ATG di coniglio e CsA rispetto ad ATG di cavallo ha mostrato una percentuale di risposta inferiore (60% vs 67%), una sopravvivenza complessiva (68% vs 86%) e libera da successivo trapianto (52% vs 76%) minori ed una risposta tardiva simile (Marsh JC et al. Blood 2012).

In una metanalisi che confrontava efficacia e sicurezza del siero di cavallo e coniglio (Hayakawa J et al. Int J Hematol 2017) sono stati analizzati 13 studi, con una età media o mediana che andava da 8 (Jeong DC Haematologica 2014) a 50 anni. Nel confronto tra siero di cavallo e coniglio, il primo ha dimostrato una migliore ORR (overall response rate) a sei mesi. Inoltre, quando la metanalisi è stata condotta su 12 studi, escludendone uno per eterogeneità, la mortalità precoce a 3 mesi è risultata più elevata nel gruppo siero di coniglio, con morti dovute principalmente ad infezioni ed emorragie.

In conclusione, sembra ormai confermato che l'IST più efficace sia quella basata sull'associazione di ATG di cavallo e CsA.

In Italia ATGAM non è autorizzato né commercializzato, per cui l'AIFA con DG n° 03/2020 del 30/04/2020 ha autorizzato l'Azienda produttrice ad importare l'ATGAM in Italia.

Si raccomanda, nella terapia immunosoppressiva, l'utilizzo di ATG di cavallo. L'uso di ATG di coniglio (Thymoglobuline) va limitato solo ai casi di assoluta indisponibilità di ATG di cavallo (ATGAM), data la documentata inferiorità in termini di efficacia.

(Livello di evidenza II; Forza del consensus 9; livello del consensus B)

Dose e modalità di somministrazione

La dose giornaliera di ATG di cavallo è di 40 mg/kg/die per 4 giorni (Rosenfeld S et al. JAMA 2003; Rosenfeld SJ et al. Blood 1995) mentre quella di ATG di coniglio è 3.75 mg/kg/die per 5 giorni; entrambe vengono somministrate per via endovenosa tramite CVC in un tempo non inferiore alle 12-18 ore. I pazienti devono essere ricoverati in ambiente protetto.

Durante il trattamento il numero delle piastrine dovrebbe essere mantenuto sopra 30.000/mm³; le stesse non vanno infuse contemporaneamente alla somministrazione di ATG a causa di un'attività anti-piastrinica dell'ATG.

Vanno utilizzate, allo scopo di ridurre le reazioni trasfusionali, piastrine filtrate e irradiate in accordo con le raccomandazioni di uno studio EBMT (Marsh J et al. Br J Haematol 2010).

Nella scheda tecnica viene riportata l'indicazione ad eseguire un test cutaneo per valutare l'eventuale ipersensibilità al farmaco e avviare un protocollo di desensibilizzazione nei soggetti con test positivo; tuttavia, l'esperienza maturata in ambito pediatrico ha portato a considerare tale test non strettamente necessario. Si raccomanda, invece, un'adeguata premedicazione antiallergica ed antipiretica con steroide, acetaminofene e difenilidramina. Per ridurre il rischio di reazioni dovute all'infusione dell'ATG (sindrome acuta da rilascio di citochine e malattia da siero che tipicamente insorge tra il settimo ed il quattordicesimo giorno dall'inizio dell'ATG) sono indicati la premedicazione con il paracetamolo e l'impiego di metilprednisolone 1-2 mg/Kg/die endovena, quest'ultimo per 14 giorni dopo l'inizio del siero, somministrandolo almeno 30 minuti prima di ciascuna dose di ATG, dimezzando la dose ogni 7 giorni a partire dal giorno +15 fino allo stop al giorno +28. Dopo i primi 7 giorni il prednisone per via orale può sostituire la somministrazione endovenosa. Se durante l'infusione dell'ATG si osservano gravi reazioni (brividi scuotenti, broncospasmo, ipotensione) si può sospendere l'infusione di ATG che può, a reazione superata, essere riavviata ad una velocità inferiore (superando anche le 24 ore d'infusione continua). I sintomi più comuni della malattia da siero sono artralgie, mialgie, rash, febbre, ipertransaminasemia, proteinuria e piastrinopenia da consumo.

L'ipertransaminasemia tende a normalizzarsi in alcuni giorni e un aumento lieve-moderato delle transaminasi non è una controindicazione all'infusione di ATG.

In caso di grave tossicità secondaria a somministrazione di ATG non vi è indicazione al passaggio da una formulazione ad un'altra (da ATG di cavallo ad ATG di coniglio e viceversa).

Immunodepressione e riattivazione virale

La riattivazione dei virus EBV e CMV, senza sviluppo di malattia, è frequente dopo ATG. Nello studio di Scheinberg (Scheinberg P et al. Blood 2007) su 78 pazienti trattati con diversi regimi di IST, la riattivazione di EBV è stata osservata nell'87% dei casi con un picco di copie più elevato e maggior durata della riattivazione nei pazienti trattati con ATG di coniglio; la riattivazione di CMV dopo ATG di cavallo è stata meno frequente (33% dei casi) ma superiore come durata.

6.3 CICLOSPORINA

La CsA inibisce l'immunità cellulo-mediata, la produzione T-dipendente di anticorpi e la produzione ed il rilascio di linfocine (IL-2, TCGF). Dati sperimentali mostrano che la CsA blocca i linfociti quiescenti in fase G0 all'inizio della fase G1 del ciclo cellulare. Agisce sui linfociti in modo specifico e reversibile, non deprime l'emopoiesi e non altera la funzione dei fagociti.

La CsA è utilizzata nel trattamento delle SAA e delle NSAA trasfusione-dipendenti in associazione con ATG; la terapia di combinazione, come già detto, si è dimostrata più efficace rispetto al trattamento con la

sola CsA (Bacigalupo A et al. Semin Hematol 2000). Uno studio prospettico randomizzato ha confrontato hATG+CsA versus CsA in monoterapia in 114 pazienti con NSAA. L'OS è stata significativamente più alta nel braccio hATG+CsA (74% versus 46%) (Marsh J et al. Blood 1999). Purtroppo, nei paesi in via di sviluppo, l'uso di CsA in monoterapia è a volte una scelta obbligata per la mancata disponibilità dell'ATG (Al-Ghazaly J et al. Ann Saudi Med 2005). Nei pazienti con NSAA trasfusione-indipendenti la CsA è stata impiegata anche in associazione con gli androgeni (Wang S et al. Int J Hematol 2013).

Dose

Ad oggi non è noto quale sia la dose ottimale di CsA nel trattamento delle AA; nella maggior parte degli studi ed in tutti i protocolli europei viene utilizzata, sia negli adulti sia nei pazienti pediatrici, la dose di 5-7 mg/kg/die suddivisa in due somministrazioni (Führer M et al. Blood 2005; Kamio T et al. Haematologica 2011) mentre negli USA si somministra una dose nettamente superiore, pari a 15 mg/kg/die. Nei protocolli pediatrici giapponesi si utilizza la dose di 5 mg/kg (Kamio T et al. Haematologica 2011).

Non esistono dati certi neppure sui livelli ematici da raggiungere. Il target di livello ematico misurato prima della somministrazione della CsA ("trough level") è di 150-250 ng/ml nei protocolli europei (Passweg JR, Marsh JC Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2010) e di 200-400 ng/ml in quelli statunitensi (Scheinberg P et al. N Engl J Med 2011). Nei protocolli pediatrici giapponesi si utilizza un target di livello ematico pre-dose di 100-250 ng/ml (Kamio T et al. Haematologica 2011). Uno studio pediatrico AIEOP ha mostrato che il mantenimento di livelli ematici più elevati non migliora i tassi di risposta ma aumenta il rischio di tossicità (Saracco P et al. Br J Haematol 2008). Mutuando l'esperienza dal trapianto di rene (Trompeter R et al. Pediatr Transplant. 2003), un indice più attendibile dei livelli ematici terapeutici potrebbe essere quello a due ore dall'assunzione della CsA poiché il picco massimo di concentrazione plasmatica si osserva tra la prima e la terza ora dopo l'assunzione orale (800 ng/ml dopo 180 mg in adulti). In attesa di uno studio di validazione dei livelli ematici ottimali, sia basali sia dopo due ore, in pazienti pediatrici con AA, si raccomanda di mantenere i livelli basali tra 100-250 ng/ml e di utilizzare il dosaggio a due ore nei pazienti con livelli sub-ottimali ai fini di documentare l'assorbimento e la reale concentrazione del farmaco durante la fase di picco (Levy GA BioDrugs 2001).

Concludendo, la CsA viene somministrata per os dal primo giorno di ATG oppure dal termine della infusione al 5° giorno (Samarasinghe et al. Br J Haematol 2018, Rogers et al. Haematologica. 2019) alla dose di 5 mg/kg/die; aggiustamenti successivi della posologia andranno effettuati al fine di mantenere i livelli ematici pre-dose nel range 100-250 ng/ml.

Nel trattamento immunosoppressivo la dose raccomandata di CsA per os è 5 mg/Kg/die, mantenendo i livelli ematici basali tra 100 e 250 ng/ml.

(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.8; livello del consensus B)

Durata del trattamento

In molti studi la durata del trattamento con CsA prevista dal protocollo è di sei mesi. In caso di risposta completa la sospensione può essere rapida o graduale, ma quest'ultima strategia è la più comune e anche la più logica, sebbene manchino adeguati studi prospettici comparativi. Uno studio NIH su 102 pazienti con AA trattati con IST in cui la sospensione della CsA avveniva nell'arco di 18 mesi ha dimostrato un ritardo di un anno nella comparsa di recidiva rispetto ai controlli storici, in cui la sospensione avveniva a 6 mesi, ma ciò non riduceva il numero assoluto delle recidive (Scheinberg P et al. Am J Haematol, 2014). Uno studio retrospettivo pediatrico italiano (Saracco P et al. Br J Haematol 2008) ha dimostrato un più elevato rischio di recidiva effettuando un tapering rapido della CsA e gli autori raccomandano di continuare la CsA a dose terapeutica per almeno 12 mesi dopo l'ottenimento della massima risposta ematologica, per poi avviare un tapering lento e graduale (5-10% della dose ogni mese sino alla sospensione in non meno di 24 mesi in caso di risposta completa) (Marsh JC et al. Br J Haematol 2009; Saracco P et al. Br J Haematol 2008).

L'efficacia di tale strategia nel ridurre il numero di recidive nei pazienti pediatrici con SAA è stata confermata in altri studi pediatrici (Kamio T et al. Haematologica 2011; Cui et al. Int J Hematol. 2018; Huo et al. Annals of Hematology 2020; Rogers et al. Haematologica 2019; Yoshida et al. Curr Oncol Rep. 2018, Yan). Anche in un recente studio sull'associazione di eltrobopag alla IST standard, una elevata incidenza di recidive (32-54%) è stata attribuita alla precoce sospensione della CsA, mentre una riduzione delle recidive è stata ottenuta continuando il mantenimento con CsA per 2 anni (Townesley et al. N Engl J Med. 2017).

Si raccomanda di continuare la ciclosporina a dose terapeutica per almeno 12 mesi dopo la risposta massima, con successivo graduale e lento tapering (5-10% della dose ogni mese) sino alla sospensione non prima di 24 mesi dopo la massima risposta.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.9; livello del consensus B)

Tossicità

Gli effetti avversi cronici più frequenti legati all'uso di CsA (Frickhofen N Blood 2003) sono l'ipertricosi (38%), l'ipertrofia gengivale (15%), l'ipertensione (8,5%) e l'epatotossicità (4.8%). Soltanto nel 4.8% dei casi si osserva un incremento significativo dei livelli di creatinina e in altrettanti casi è necessario sospendere il farmaco per gli effetti avversi. L'ipertensione perdura, nonostante la sospensione del farmaco, nel 15% dei pazienti con necessità di trattamento antiipertensivo protratto (Pongtanakul B Pediatr Blood Cancer 2008). Nello specifico:

Nefrotossicità: l'insufficienza renale è dose-correlata e spesso associata ad ipertensione. La CsA determina una riduzione reversibile del flusso ematico renale e, attraverso una vasocostrizione delle arteriole afferenti, una riduzione della filtrazione glomerulare. Una nefrotossicità lieve-moderata risponde in genere alla riduzione della dose. Dosi cumulative elevate o elevati livelli ematici basali possono associarsi allo sviluppo di fibrosi interstiziale e quindi determinare una nefrotossicità cronica progressiva non reversibile.

La funzionalità renale deve essere sempre monitorata durante il trattamento, ma altre potenziali cause di nefrotossicità (ad esempio altri farmaci quali i FANS) vanno escluse prima di modificare le dosi della CsA.

Neurotossicità: effetti collaterali di tipo neurologico possono verificarsi in oltre il 40% dei pazienti trattati con CsA. La Sindrome da Encefalopatia Posteriore Reversibile (PRES) rappresenta la complicanza neurologica più grave ed è caratterizzata da cefalea, alterazione dello stato mentale, convulsioni, cecità corticale, altri disturbi del visus ed ipertensione arteriosa. Lo studio neuroradiologico mostra caratteristiche alterazioni di segnale a carico della sostanza bianca, generalmente ma non sempre nella regione posteriore dell'encefalo.

Altri effetti neurotossici della CsA includono cefalea, tremori, encefalopatia diffusa, sindrome cerebellare, sindrome extrapiramidale, sofferenza piramidale, neuropatia periferica, crisi convulsive, stato psicotico.

L'utilizzo di steroidi ad alte dosi, l'ipertensione arteriosa, l'ipomagnesemia, l'ipertrigliceridemia e la presenza di un danno endoteliale con aumento della permeabilità della barriera emato-encefalica potrebbero favorire lo sviluppo di neurotossicità da CsA.

Una correlazione tra l'evento avverso e livelli basali di CsA elevati o sospetti per tossicità si riscontra solo nel 60% dei casi; in genere la sospensione temporanea e la riduzione della dose sono sufficienti alla risoluzione del quadro neurologico.

Alterazioni dermatologiche: includono ipertricosi, acne, prurito, follicolite, cisti epidermiche e neoplasie cutanee. Sono stati riportati rari casi di follicolodistrofia, pseudoporfiria ed eritrodermia.

Epatotossicità: le complicanze epatiche sono comuni (50% dei pazienti) ma generalmente lievi e autolimitanti: aumento di bilirubina, transaminasi e fosfatasi alcalina, talvolta ittero colestatico. Sono stati segnalati rari casi di epatite ed insufficienza epatica grave.

Disturbi gastrointestinali: iperplasia gengivale, diarrea, nausea, vomito, anoressia e dolore addominale; raramente pancreatite. L'incidenza di iperplasia gengivale è minore con la formulazione microemulsione e risponde talvolta a terapia con metronidazolo.

Disturbi cardiovascolari: le problematiche a carico dell'apparato cardiovascolare sono, per lo più, secondarie ad ipertensione arteriosa indotta da CsA. Inoltre, è stata documentata, in corso di terapia con CsA, una ridotta produzione di ossido nitrico (basale e sotto stimolo) cui consegue disfunzione endoteliale ed aumentato rischio di aterosclerosi prematura.

Disturbi endocrino-metabolici: ipertrigliceridemia, iperprolattinemia, riduzione di testosterone, ginecomastia, iperglicemia ed ipertricosi.

Disturbi oculari: sono stati riportati pseudotumor cerebri, edema del disco ottico e cecità tossica retinica (un solo caso).

Disturbi immunologici: la CsA determina ovviamente aumentata suscettibilità alle infezioni opportunistiche. Sono riportati casi di infezioni epatiche da virus B e C, polmoniti da *Pneumocystis* e altre infezioni virali, batteriche e fungine.

Neoplasie: lo sviluppo di neoplasie, in particolare tumori cutanei e linfomi, è più frequente nei pazienti immunodepressi e il ruolo reale della CsA resta ancora speculativo. In un ampio studio è stata riscontrata un'aumentata incidenza di linfomi e sarcomi di Kaposi nei pazienti trattati con CsA rispetto a quelli trattati con azatioprina e prednisone (Sheil AG et al. Transplant Proc. 1997); in pazienti adulti sottoposti a trapianto d'organo, peraltro, l'incidenza di neoplasie è risultata maggiore nei pazienti trattati con tacrolimus rispetto a CsA (Sampaio et al. Transplantation 2012; Wimmer et al. Transplant International 2013).

6.4 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA EMATOLOGICA DOPO IST

Poiché la risposta ematologica alla terapia immunosoppressiva non si manifesta prima di 2 o 3 mesi, la valutazione della risposta al trattamento va effettuata al giorno, o comunque non dopo, il giorno +120. È necessario che la stessa venga confermata su almeno due o tre emocromi eseguiti, senza concomitante uso di G-CSF.

Esami per la valutazione della risposta

Giorno + 120: Emocromo con reticolociti, aspirato midollare, BOM, cariotipo, ricerca cloni PNH.

Definizione di Risposta Completa, Risposta Parziale e Non Risposta (Scheinberg P et al. Haematologica 2009):

Per la definizione di **Risposta Completa** devono essere soddisfatti tutti i seguenti criteri:

- Hb > 10 g/dl
- Neutrofili > 1000/mmc
- PLT > 100.000/mmc
- Nessuna evidenza di evoluzione clonale

Per la definizione di **Risposta Parziale** devono essere soddisfatti tutti i seguenti criteri:

- Non soddisfare più i criteri per la diagnosi di SAA
- Trasfusione indipendenza (sia di GRCF sia di PLT)
- Hb > 8 g/dl
- Neutrofili > 500/mmc
- PLT > 20.000/mmc

Per la definizione di **Non Risposta** il paziente non deve soddisfare nessun criterio di quelli descritti sopra

6.5 TERAPIE ALTERNATIVE IMMUNOSOPPRESSIVE E NON

La terapia immunosoppressiva combinata standard (ATG/CsA) è gravata da effetti collaterali a breve e lungo termine e da un significativo rischio di refrattarietà, recidiva ed evoluzione clonale (Kamio, Haematologica 2011; Scheinberg, Br J Haematol. 2006).

Per i pazienti refrattari o in recidiva dopo IST e/o non candidabili ad un trapianto di cellule staminali sono state a volte proposte altre opzioni terapeutiche. Due sono le strade prevalentemente percorse dai diversi gruppi di studio:

- intensificazione del regime standard ATG/CsA con l'aggiunta di un terzo agente immunosoppressore, possibilmente con un diverso meccanismo d'azione per sfruttare la sinergia tra farmaci;
- impiego di agenti con spiccata attività immunosoppressiva, possibilmente con un miglior profilo di tossicità, in monoterapia o in terapie di combinazione.

Ciclosporina in monoterapia

La terapia immunosoppressiva basata unicamente sulla CsA, in genere al dosaggio di 5 mg/kg/die è stata studiata in alcuni trials svolti prevalentemente in India (Shetty, J Clin Diagn Res. 2016; Mandal, Indian J Hematol Blood Transfus. 2017): il tasso di risposta è stato fra il 30 e il 50%. Alla luce dei pochi dati disponibili appare chiaro che tale terapia possa essere presa in considerazione unicamente in pazienti adulti, specie se abitanti in paesi con limitate risorse economiche (Killick, Br J Haematol. 2016).

L'utilizzo della ciclosporina in monoterapia non è consigliabile in età pediatrica.

(Livello di evidenza V, EO; Forza del consensus 8.7; livello del consensus B)

Micofenolato Mofetile

Il Micofenolato Mofetile (MMF) è un inibitore della sintesi delle purine che si comporta come inibitore selettivo, non competitivo e reversibile dell'enzima inosina monofosfatodeidrogenasi, da cui dipende la via sintetica di DNA e RNA dei linfociti T e B: inibisce, quindi, la proliferazione dei linfociti B e T ed è stato utilizzato nel trattamento e nella prevenzione del rigetto del trapianto di organi solidi così come nel trattamento di malattie autoimmuni come rettocolite ulcerosa, artrite reumatoide e sclerosi multipla (Marsh, Br J Hematol 2009).

A parte sporadici case report in cui il MMF è stato utilizzato, con risultati variabili, non in ambito IST (Krečak, Ann Hematol. 2020), il suo impiego nel trattamento dei pazienti con SAA è stato testato in uno studio prospettico di fase II del National Institutes of Health (NIH) statunitense: tra il 1999 ed il 2003, 104 pazienti (26% di età inferiore a 20 anni, range mediano 3-76 anni) con nuova diagnosi di SAA sono stati trattati con ATG di cavallo/CsA/MMF; il confronto con lo storico (ATG di cavallo/CsA) non ha mostrato alcun vantaggio né in termini di risposta al trattamento (62% a 6 mesi) né in termini di prevenzione delle recidive (37%, nonostante il mantenimento con MMF) (Scheinberg, Br J Haematol. 2006).

Alla luce degli studi disponibili, il MMF non sembra quindi essere efficace quale farmaco aggiuntivo alla CsA sia nel trattamento di prima linea né, verosimilmente, in caso di refrattarietà.

L'utilizzo del MMF non è consigliabile in età pediatrica.

(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.2; livello del consensus C)

Rapamicina/Sirolimus

Il Sirolimus (RAPA) è un antibiotico macrolide inibitore di mTOR, una serina treonina chinasi multifunzionale. Il Sirolimus lega la immunofilina FKBP12 bloccando l'attivazione IL-2 dipendente dei linfociti T; inoltre, il complesso FKBP12/RAPA inibisce mTOR bloccando la progressione del ciclo cellulare dalla fase G₁ a S (Abraham, Annu Rev Immunol 1996). Il Sirolimus attiva anche i Linfociti T regolatori. Il

sinergismo della combinazione Sirolimus/CsA è stato studiato in vitro ed in clinica, soprattutto nel setting del trapianto di organi solidi (Kahan, Transplant Proc 1991; Stepkowski, Transplant Proc 1991).

L'NIH ha condotto, tra il 2003 ed il 2005, uno studio randomizzato che confrontava il regime standard ATG/CsA con il nuovo regime ATG/CsA/sirolimus. Sono stati arruolati 77 pazienti con SAA di età compresa tra 4 e 78 anni. Il tasso di risposta è stato, a tre mesi, del 37% per ATG di cavallo/CsA/sirolimus e del 50% per ATG di cavallo/CsA e, a sei mesi, del 51% per ATG/CsA/sirolimus e del 62% per ATG di cavallo/CsA. L'arruolamento è stato chiuso dopo i primi 30 casi valutabili per l'impossibilità di documentare una differenza che fosse statisticamente significativa ed un beneficio connesso all'aggiunta del Sirolimus. Il tasso di recidiva, evoluzione clonale e sopravvivenza non differiva in maniera statisticamente significativa tra i due gruppi (Scheinberg, Haematologica. 2009). Complessivamente l'aggiunta del sirolimus alla CsA non è risultata efficace nel trattamento di prima linea.

È altresì possibile che il sirolimus, secondo alcune segnalazioni (Niu, Medicine (Baltimore) 2020) possa trovare spazio in casi selezionati quando, sulla base dei dati di nefrotossicità, non possa essere utilizzata la CsA.

L'uso del sirolimus può essere preso in considerazione in età pediatrica unicamente quale sostituto della Ciclosporina quando questa, per motivi di vario genere, non sia utilizzabile.

(Livello di evidenza I; Forza del consensus 8.1; livello del consensus B)

Alte dosi di Ciclofosfamide

La ciclofosfamide (CTX) ad alte dosi ha un potere immunosoppressivo elevato e, per tale ragione, è stata utilizzata nel trattamento delle malattie autoimmuni (Brodsky, Ann Intern Med. 1998; Drachman, Ann Neurol. 2003). L'uso della CTX ad alte dosi trova razionale nella selettiva azione tossica sui linfociti T attivati che hanno ridotti livelli degli enzimi della famiglia di enzimi dell'aldeide deidrogenasi 1 (principale meccanismo di inattivazione del farmaco) a differenza delle cellule staminali.

Nel 1996 è stato pubblicato un primo studio pilota condotto al John Hopkins Hospital (Baltimora, MD, USA) su 10 pazienti con SAA e VSAA con un'età mediana di 19 anni (range 7-38; 6 pazienti con età ≤19 anni) trattati con alte dosi di CTX (45 mg/Kg/die e.v. per 4 giorni consecutivi). Sette pazienti hanno ottenuto una risposta ematologica completa: di questi uno è deceduto per AIDS dopo 44 mesi di follow-up mentre i restanti sei non hanno presentato recidive né evoluzione clonale in un follow-up di durata compresa tra 9 e 19 anni al momento della pubblicazione (Brodsky, Blood 1996).

L'entusiasmo per l'impiego della ciclofosfamide è venuto meno negli anni successivi a seguito dei risultati di uno studio prospettico randomizzato, condotto su 31 pazienti di età compresa tra 18 e 67 anni. Lo studio, che confrontava ATG/CsA con CTX/CsA (CTX alla dose di 50 mg/Kg/d per 4 giorni), è stato interrotto precocemente a causa dell'aumento di infezioni fungine e morti precoci nel braccio sperimentale, verosimilmente secondarie alla prolungata neutropenia dovuta all'impiego di CTX (Tisdale, Lancet 2000). Gli autori non hanno confermato neppure l'osservazione che l'impiego di CTX potesse ridurre il rischio di evoluzione clonale (Tisdale, Blood 2002).

Nonostante ciò, l'esperienza del John Hopkins Hospital ha continuato a mostrare risultati sorprendenti. In uno studio su 67 pazienti con SAA, di età compresa tra 2 e 68 anni, il tasso di risposta è stato del 70.5% nei pazienti naïve e del 47.8% nei pazienti refrattari, seppure con una tossicità non trascurabile (incidenza d'infezioni fungine pari al 18.2% nei naïve e al 43.5% nei refrattari, con un 7.5% di mortalità precoce): veniva però riportata una buona sopravvivenza a lungo termine (quella complessiva a 10 anni e quella libera da malattia nei pazienti naïve sono state dell'88% e 58% rispettivamente, mentre nei non responders sono state pari al 61.8% e 27.7% rispettivamente) (Brodsky, Blood 2010). In un successivo studio randomizzato, 121 pazienti arruolati sono stati trattati con alte dosi di CTX e CsA (48 casi) o ATG e CsA (73 casi). Il tasso di risposta nel primo e nel secondo gruppo è stato rispettivamente del 54.2% e 57.5% a 3 mesi e 72.9% e 78.1% a 12 mesi. A fronte di una efficacia comparabile, i costi del trattamento con ciclofosfamide sono stati del 54.8 % inferiori a quelli della terapia con ATG (Zhang F Exp Hematol. 2013).

Nel 2016 una coorte di 28 pazienti in età pediatrica affetti da SAA (22 naive e 6 ricaduti o refrattari) sono stati trattati con CTX alla dose di 50 mg/kg/die per 4 giorni consecutivi (Gamper, J Pediatr Hematol Oncol 2016): si sono registrati una OS dell'85% e un tasso di risposta del 79% (con un 66% di RC); la mortalità (verificatasi solo nei recidivati/refrattari) è stata del 14% ma il tasso di infezioni batteriche (86%) o fungine (62%) si è mostrato decisamente elevato. Un altro studio di poco precedente (Scheinberg, Blood. 2014) aveva esplorato la possibilità di utilizzare dosi più ridotte (120 mg/kg): anche con questa modalità il tasso di infezioni batteriche e fungine, a fronte peraltro di un tasso di risposta a 6 mesi insoddisfacente (41%), si è mostrato decisamente elevato al punto che il Data Safety Monitoring Board ha raccomandato l'interruzione dell'arruolamento.

In conclusione, alla luce di quanto pubblicato, la CTX ad alte dosi non sembra in pratica essere più annoverabile fra le opzioni terapeutiche disponibili per la AA, specie in età pediatrica (Killick, Br J Haematol. 2016).

L'utilizzo della CTX in monoterapia ad alte dosi non è consigliabile in età pediatrica.

(Livello di evidenza IV, EO; Forza del consensus 8.7; livello del consensus B)

Androgeni

Da studi recenti sembra emergere che la efficacia degli androgeni possa essere legata ad un effetto di up-regulation sulle telomerasi e sulle cellule T-regolatorie (Townsend, N Engl J Med. 2016; Bär, Haematologica 2015; Kordasti, Blood. 2016; Khurana, Hematology 2018).

Gli steroidi anabolizzanti, derivati sintetici del testosterone, sono stati ampiamente impiegati nel trattamento dell'AA soprattutto prima che divenissero disponibili ATG e CsA. Il testosterone però, al dosaggio di 40 mg/die per 5-7 giorni a settimana, è stato utilizzato anche recentemente (Giammarco, Blood. 2016;128(22): Abstract 3900) su 78 pazienti che avevano ricevuto trattamento con ATG, erano in terapia con CsA e mostravano conte ematologiche persistentemente basse: la durata mediana di terapia è stata di 517 giorni; il tasso di risposta parziale è stato pari al 38% e quello di risposta completa del 29% senza chiara evidenza di segni di virilizzazione o tossicità epatica. Tuttavia, l'uso di testosterone in età pediatrica è gravato da importanti rischi di virilizzazione (Marsh, Br J Haematol. 2009), per cui tale terapia può essere di fatto presa in considerazione solo nell'adulto.

L'Ossimetolone è un agente stimolante l'eritropoiesi, in grado di determinare anche risposte ematologiche trilineari. È stato utilizzato in passato nel trattamento dei pazienti affetti da sindrome da insufficienza midollare congenita non candidabili a trapianto di midollo osseo (Samarasinghe, Br J Haematol. 2012) e, in uno studio ormai datato (Bacigalupo, Br J Haematol 1993), in associazione con ATG, anche nel trattamento dell'AA, mostrando risultati migliori rispetto all'uso della sola ATG. In un più recente studio retrospettivo francese, condotto su 87 pazienti con nuova diagnosi di AA, la risposta alla terapia di combinazione (ATG/Ossimetolone) è stata del 77% con una sopravvivenza a 5 anni del 78% (Leleu Ann Hematol. 2006): la conclusione di tale studio è stata che i risultati erano simili a quelli ottenuti con ATG/CsA ma con un minor tasso di evoluzione clonale. Mancano però studi prospettici randomizzati di confronto tra le due combinazioni terapeutiche e, inoltre, l'uso di Ossimetolone, soprattutto in età pediatrica, è gravato da importanti effetti collaterali quali virilizzazione, prematura chiusura dell'epifisi, ittero, sviluppo di adenomi epatici, aumento delle transaminasi e cambiamenti del comportamento (Marsh, Br J Haematol. 2009), tanto da essere richiesto un regolare monitoraggio ecografico e laboratoristico della funzionalità epatica durante il trattamento.

Il Danazolo è un androgeno non virilizzante con proprietà simili a quelle dei corticosteroidi. Inibisce la produzione di interleuchina-1 e TNF-alfa (Mori, Am J Reprod Immunol. 1990) ed è stato utilizzato nel trattamento dei pazienti affetti da trombocitopenia immune, anemia emolitica ed aplasia pura della serie rossa. Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi studi sul suo impiego nel trattamento di pazienti con AA. Nel 2007 è stato pubblicato (Chuhjo, Am J Hematol. 2008) uno studio giapponese su 16 pazienti con AA refrattaria o in recidiva trattati con Danazolo alla dose di 300 mg/die per 12 settimane: il trattamento è

risultato non virilizzante ed associato ad una epatotossicità di grado lieve/moderato, risoltasi al termine della terapia e il 31.3% dei pazienti ha ottenuto una remissione parziale entro la 12^a settimana di terapia. Nel 2011 è stato pubblicato uno studio messicano sull'impiego del Danazolo nel trattamento di prima linea di pazienti con AA (Jaime-Pérez, Ann Hematol. 2011); il tasso di risposta è stato del 45.9% con una sopravvivenza a 5 anni del 60%. Da uno studio retrospettivo giapponese su una popolazione pediatrica è emerso che l'aggiunta del Danazolo alla terapia immunosoppressiva standard determina un tasso di risposta più elevato rispetto all'impiego delle sole ATG e CsA (67.9% vs. 57.1%), tuttavia anche il tasso di recidiva risulta significativamente più alto (29.0% vs 9.8% a 10 anni) (Kamio Haematologica 2011) e gli autori concludono affermando la necessità di una conoscenza più approfondita del meccanismo d'azione degli androgeni per dar loro una collocazione adeguata nel trattamento delle anemie aplastiche.

Recentemente, inoltre, si sta valutando l'uso degli androgeni in combinazione con altre terapie o come boost dell'IST: in uno studio retrospettivo la risposta ematologica complessiva in 12 pazienti trattati con eltrombopag, CsA/tacrolimus e danazolo è stata del 42% (Gao Q, Hematology. 2020). In un altro recente studio retrospettivo con follow-up a 10 anni su 232 pazienti trattati con una combinazione di CsA, levamisole e danazolo si è osservato una risposta del 52.1% a 6 mesi ed una OS a 10 anni del 60.2 %: sebbene la probabilità di interruzione terapeutica a lungo termine sia del 50% circa, con un decalage lento della terapia, si è ridotto il rischio di ricaduta al 9.5% (Huo J. Ann Hematol. 2020).

È infine, in corso di arruolamento uno studio clinico prospettico, randomizzato controllato sull'uso di CsA, androgeni e levamisolo nei pazienti affetti da NSAA (NCT03218657).

In conclusione, è possibile che in casi selezionati in pazienti adulti la terapia della AA possa avvalersi anche dell'uso degli androgeni (Killick. Br J Haematol. 2016) ma in età pediatrica il loro uso è da ritenersi sostanzialmente abbandonato.

L'utilizzo degli androgeni non è consigliabile in età pediatrica.

(Livello di evidenza: EO; Forza del consensus 8.2; livello del consensus C)

Alemtuzumab

L'Alemtuzumab (Campath 1H) è un anticorpo (IgG1 kappa) monoclonale umanizzato anti-CD52 che provoca la morte di tutte le cellule esprimenti la glicoproteina CD52, sia attraverso la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente che la lisi cellulare complemento-mediata (Dumont, Curr Opin Investig Drugs 2001). Dato che l'antigene CD52 è ampiamente espresso sulla membrana dei linfociti B e T ma non su quella delle cellule staminali emopoietiche e dei progenitori emopoietici committed, l'Alemtuzumab svolge un'importante azione linfolitica determinando una profonda e prolungata deplezione soprattutto dei linfociti CD4+ e CD8+ mentre risparmia il comparto staminale emopoietico. Il farmaco è stato inizialmente impiegato nella cura delle neoplasie linfoidi e successivamente utilizzato, con successo, nel trattamento di patologie quali la sclerosi multipla (CAMMS223, N Engl J Med. 2008) e le citopenie autoimmuni (Gómez-Almaguer, Blood 2010; Willis, Br J Haematol 2001; Selleri, Mini Rev Med Chem. 2011) nonché in diversi regimi di condizionamento per il trapianto di cellule staminali.

L'impiego di Alemtuzumab nel trattamento dei pazienti con AA trova il proprio razionale nell'estremo potere immuno-ablativo dimostrato in vivo; la deplezione linfocitaria è completa ed il recupero linfoide richiede molti mesi soprattutto per i linfociti CD4+, tanto da rendere l'azione di questo anticorpo monoclonale comparabile a quella di ATG con un profilo di tossicità accettabile. Esiste però una certa riserva sull'uso di Alemtuzumab nel setting dei pazienti con insufficienza midollare per il timore di complicanze infettive, inclusa la possibile tossicità midollare secondaria a riattivazione citomegalica, frequente nei pazienti con disordini linfoproliferativi (Elter, Ann Hematol. 2009).

Di seguito sono riportati gli studi che hanno testato l'Alemtuzumab nei pazienti con AA.

- Nel 2009 è stato pubblicato uno studio dose escalation coreano nel quale veniva testata l'efficacia e la sicurezza di Alemtuzumab a due differenti dosaggi (60 e 90 mg) somministrati in tre giorni consecutivi ad una coorte di 17 pazienti con AA, in combinazione con CsA (1.5 mg/Kg due volte al

giorno per sei mesi) (Kim, Leuk Res. 2009). Il tasso di risposta globale è stato del 35% con un 23% di risposte complete ed un 12% di risposte parziali; sorprendentemente tutti i pazienti che hanno risposto al trattamento appartenevano alla coorte che aveva ricevuto il dosaggio più basso. Nello studio non sono state sollevate preoccupazioni relative alla sicurezza del trattamento; la sopravvivenza a 2 anni è stata dell'81% e non sono stati segnalati casi di evoluzione clonale. Quattro pazienti arruolati avevano un'età compresa tra 16 e 19 anni: 2 hanno ottenuto una risposta inizialmente parziale e poi completa e al FUP risultano vivi in remissione, mentre gli altri 2, risultati non responder, sono vivi ed in remissione dopo trapianto allogenico.

- Nel 2010 il Working Party Severe Aplastic Anemia dell'EBMT ha pubblicato i risultati di uno studio di fase II che ha testato efficacia (in termini di migliore risposta ottenuta) e sicurezza di Alemtuzumab sottocute (dose totale di 103 o 73 mg) in pazienti con AA moderata associato a più basse dosi di CsA (1 mg/Kg) (Risitano, Br J Haematol 2010). Lo studio ha arruolato 13 pazienti con AA, di cui 9 non precedentemente trattati. Nove dei 13 pazienti (69%) hanno ottenuto una risposta ematologica (probabilità cumulativa di risposta a 12 mesi) pari al 78%: vi sono state 5 risposte complete e 4 risposte parziali. I risultati migliori sono stati ottenuti sui 9 pazienti naïve: 3 hanno ottenuto una risposta completa e 3 una risposta parziale molto buona. La recidiva è stata un evento frequente, verificatosi in 7 pazienti su 9, tuttavia il ritrattamento con Alemtuzumab ha consentito una seconda risposta ematologica. Il FUP a 4 anni ha mostrato una sopravvivenza globale del 67% e una sopravvivenza libera da malattia del 37%. La mortalità precoce per infezioni è risultata nel range dell'atteso mentre il profilo di sicurezza a lungo termine è stato soddisfacente. Il trattamento è stato effettuato senza necessità di ricovero ospedaliero. Lo studio non ha arruolato pazienti pediatrici.
- L'efficacia biologica di Alemtuzumab nei pazienti con AA è stata confermata da uno studio messicano nell'ambito del quale, tra il 2005 ed il 2007, 14 pazienti naïve sono stati trattati con Alemtuzumab sottocute alla dose di 50 mg (10 mg/die per 5 giorni consecutivi) in combinazione con CsA (2 mg/Kg bid) (Gómez-Almaguer, Blood 2010). Il follow-up mediano è stato di 20 mesi, il tasso di risposte del 57% con un 14% di risposte complete ed un 43% di risposte parziali. Il profilo di sicurezza è stato buono e non sono state segnalate morti precoci per infezioni correlate al trattamento né riattivazioni citomegaliche. L'età mediana dei pazienti arruolati era di 20 anni, con 6 pazienti di età compresa tra 6 e 19 anni. Nell'ambito di questo gruppo sono state ottenute una risposta completa e 3 risposte parziali; c'è stato un solo decesso, una paziente di 7 anni, non responder.
- Tra il 2003 ed il 2010 anche il NIH (Scheinberg, Blood. 2012) ha saggiato l'efficacia di Alemtuzumab in monoterapia (10 mg/die endovena per 10 giorni) su 68 pazienti con AA di cui 16 naïve, 25 in recidiva e 27 refrattari ad una prima linea di IST con ATG. Il gruppo dei pazienti refrattari era randomizzato ad Alemtuzumab (n=27) versus ATG di coniglio + CsA (n=27). Il tasso di risposta è stato del 37% nel gruppo Alemtuzumab versus il 33% nel gruppo ATG di coniglio; la sopravvivenza a 3 anni è stata dell'83% e 60% rispettivamente ($p=0.16$). Nell'ambito dei 25 pazienti in recidiva, il tasso di risposta ad Alemtuzumab è stato del 56% con una sopravvivenza a 3 anni dell'86%. I risultati ottenuti in seconda linea non si sono confermati nel gruppo naïve, nell'ambito del quale la percentuale di risposta è stata soltanto del 19%, cosa che ha portato all'interruzione dello studio. Il trattamento è stato ben tollerato senza alcun incremento di morbidità o morbidità per infezioni. In ognuno dei tre gruppi sono stati inclusi pazienti di età inferiore a 18 anni: in totale sono stati arruolati circa 14 pazienti pediatrici ma risulta impossibile estrapolare i dati dei singoli pazienti.

Gli studi condotti negli ultimi anni dimostrano che Alemtuzumab costituisce un'alternativa al regime immunosoppressivo classico nei pazienti con aplasia midollare. I dati disponibili supportano il concetto che Alemtuzumab presenta un profilo di sicurezza accettabile e attenuano le preoccupazioni circa un elevato

rischio infettivo secondario a trattamento. I dati sull'efficacia dimostrano che è biologicamente attivo come agente immunosoppressore, anche se i risultati ottenuti in piccoli studi andrebbero confermati in trial più ampi ed in setting di pazienti nella stessa fase di malattia (Risitano, Bone Marrow Transplant 2013): infatti Alemtuzumab è stato utilizzato in gruppi non uniformi di pazienti, a dosi diverse, con modalità d'infusione differenti, in monoterapia o in associazione con CsA somministrata pure a diversi dosaggi. Un protocollo comune potrebbe essere utile a comprendere il ruolo di questo farmaco nel panorama più ampio della IST e a ridefinire dosi, modalità di somministrazione e subset di pazienti che potrebbero maggiormente beneficiarne (Risitano, Br J Haematol 2010).

L'utilizzo dell'alemtuzumab può essere preso in considerazione in età pediatrica solo in setting iperselezionati di pazienti come quelli recidivati dopo IST ed ineleggibili a HSCT ovvero, transitoriamente, allo scopo di mantenere adeguate conte ematologiche, in pazienti che richiedono dosi eccessivamente elevate di CsA.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.0; livello del consensus B)

Eltrombopag

Eltrombopag è una molecola sintetica non peptidica, biodisponibile per via orale, appartenente alla classe degli agonisti dei recettori della TPO, il principale regolatore endogeno della produzione piastrinica. Eltrombopag lega selettivamente il dominio trans-membrana del recettore della TPO (cMpl) attivando i pathways JAK-STAT (Janus-associated kinase-signal transducers) e MAPK (mitogen-activated protein kinase) con effetto positivo su proliferazione e differenziazione dei megacariociti a partire dai precursori mieloidi. I recettori di TPO sono presenti sulla superficie cellulare delle cellule staminali e dei progenitori emopoietici ed il signaling TPO/c-Mpl, nell'uomo, partecipa ai meccanismi di regolazione delle cellule staminali quiescenti. L'importanza del recettore c-Mpl per la normale emopoiesi è confermata dal fatto che mutazioni bi-alleliche del gene *c-Mpl* determinano la CAMT, malattia caratterizzata dalla scarsità/assenza di megacariociti nel midollo osseo e da una pressochè inevitabile evoluzione in AA. È stato anche riportato che mutazioni nonsense del gene *c-Mpl* in omozigosi si associano ad anemia aplastica familiare (Townsend DM et al. Int J Hematol. 2013).

Il razionale nell'utilizzo dell'Eltrombopag nella AA, è quello di stimolare la proliferazione delle cellule staminali, incrementando l'emopoiesi. Il riscontro di elevati livelli di TPO endogena non sembra ostacolare il recupero della conta cellulare in questo setting di pazienti (Scheinberg et al Am Soc Hematology 2018). Il principale meccanismo con cui l'Eltrombopag stimola la ripresa midollare è la stimolazione delle cellule staminali emopoietiche. Eltrombopag ha anche azione immunomodulatoria (diminuzione di IFN γ , TNF α e TGF β), di promozione della tolleranza (aumento delle cellule B e T regolatorie) e di mobilitazione del ferro cellulare, tutti effetti che potrebbero concorrere positivamente all'azione di stimolo sulle cellule staminali ematopoietiche.

Di seguito sono riportati gli studi principali sull'uso dell'Eltrombopag nel trattamento di pazienti con AA:

- Nel luglio 2012 è stato pubblicato il primo studio clinico non randomizzato di fase II sull'impiego dell'Eltrombopag in pazienti con AA resistente ad almeno un ciclo di IST (Olnes et al. N Engl J Med 2012). Il 44% dei pazienti (11/25) ha ottenuto una risposta ematologica dopo le prime 12-16 settimane di trattamento con effetti tossici minimi. Nove pazienti non hanno più necessitato di supporto trasfusionale piastrinico; sei pazienti hanno avuto un incremento dei livelli di emoglobina (mediana d'incremento 4.4 gr/dl) e tre di loro non hanno più necessitato di supporto eritrocitario. Nove pazienti hanno presentato incremento della conta dei neutrofili. Le biopsie ossee, eseguite ogni 6 mesi per 30 mesi, hanno mostrato nei pazienti responsivi una normalizzazione trilineare dell'emopoiesi senza incremento della fibrosi midollare.
- A conferma di questi dati, nel 2013 Desmond e collaboratori (Desmond et al. Blood 2014), hanno ampliato la coorte di pazienti con SAA refrattaria ad IST con ATG, aggiungendo ai 25 pazienti iniziali

altri 18 pazienti (differivano unicamente per minore età di arruolamento – 12 anni versus 18). L'Eltrombopag è stato somministrato alla dose iniziale di 50 mg/die incrementata progressivamente fino alla dose massima di 150 mg/die proseguendo la terapia con CsA. Il tasso di risposta complessiva cumulativa delle 2 coorti a 3 mesi è stato del 40%. Il tempo medio di risposta iniziale è stato di 12 settimane (range 8-14). L'Eltrombopag è stato proseguito nei pazienti responsivi per una mediana di 12 mesi con ulteriore miglioramento delle conte ematologiche. Includendo due risposte tardive avvenute dopo la sospensione del farmaco, il 44% dei pazienti ha mostrato una risposta. Gli effetti tossici sono stati minimi. Le biopsie ossee non hanno mostrato aumento della fibrosi. Il 19% dei pazienti (8/43: 6 non responsivi e 2 responsivi), ha sviluppato nuove anomalie citogenetiche a distanza di 3-13 mesi dall'inizio la terapia con Eltrombopag.

Questi studi hanno condotto nel 2014 all'approvazione da parte della FDA dell'Eltrombopag nei pazienti \geq 2 anni con SAA refrattaria alla ITS di prima linea.

- Nel 2017 Townsley e collaboratori (Townsley et al. N Engl J Med 2017) hanno pubblicato il primo studio prospettico non randomizzato di fase 1-2 in cui l'Eltrombopag è stato somministrato in associazione alla IST in prima linea. Nello studio sono stati inclusi 92 pazienti con SAA con età superiore ai 2 anni (19 erano in età pediatrica); il farmaco è stato somministrato al dosaggio di 150 mg/die nei pazienti con età $>$ 12 anni, di 75 mg/die nei pazienti con età compresa tra 6 e 11 anni e di 2.5 mg/kg/die nei pazienti di età compresa tra 2 e 5 anni; la dose è stata dimezzata nei pazienti dell'Est e Sud Est asiatico. La durata e l'inizio del trattamento erano diverse nelle tre coorti di studio: nella coorte 1 (31 casi) il farmaco è stato somministrato dal giorno 14 per 6 mesi; nella coorte 2 (33 casi) dal giorno 14 per 3 mesi; nella coorte 3 (31 casi) dal giorno 1 per 6 mesi. La mediana del follow-up è stata di 703 giorni in tutti i pazienti. Il tasso di risposta completa a 6 mesi è stato del 33% nella coorte 1, del 26% nella coorte 2, e del 58% nella coorte 3; la "overall response rate" - risposta complessiva - (ORR) a 6 mesi è stata rispettivamente dell'80%, 87% e 94%. I tassi di risposta completi e complessivi nelle coorti combinate sono stati più elevati rispetto alla coorte storiche di pazienti trattati con la sola IST. Il tasso di sopravvivenza a 2 anni è stato del 97%. Alterazioni cromosomiche sono state riscontrate in 7 pazienti. L'effetto collaterale più grave è stata la comparsa di rash maculo-papulare (verificatosi in 2 pazienti), che ha portato a interruzione del trattamento e ha richiesto terapia con glucocorticoidi.
- Nel 2018 uno studio nazionale retrospettivo multicentrico francese (Lengline et al. Haematologica 2018) ha raccolto una coorte di 46 pazienti (35 precedentemente trattati con ATG e 11 no) con SAA refrattaria o recidivata, trattati con Eltrombopag al dosaggio mediano di 150 mg/die: nei pazienti dopo ATG, il 74% ha ottenuto recupero in almeno una linea cellulare e il 34% ha ottenuto una risposta trilineare con un FUP mediano di 13 mesi. Gli effetti collaterali sono stati blandi e non si è osservata evoluzione clonale. Nei pazienti non trattati preventivamente con ATG, il 64% ha presentato una risposta almeno in una linea cellulare, il 27% trilineare.
- Sempre nel 2018, Assi e collaboratori (Assi et al. Cancer 2018) hanno pubblicato uno studio di fase II, open label per valutare l'efficacia dell'Eltrombopag in aggiunta alla IST in 38 pazienti adulti: i primi 17 hanno ricevuto solo IST, ai restanti 21 all'IST è stato aggiunto l'Eltrombopag (ma solo 13/21 hanno introdotto l'Eltrombopag entro la prima settimana). La ORR è stata del 71% nel primo gruppo e del 76% nel secondo; a 3 e a 6 mesi si è osservata una risposta completa nel 29% e una risposta parziale nel 42% nel gruppo con sola IST, nel 38% completa e nel 38% parziale nel gruppo con IST+ Eltrombopag. La differenza di risposta tra le due coorti non è risultata statisticamente significativa.
- Nel 2019 Ecsedi e collaboratori (Ecsedi et al. A Hemat 2019) hanno raccolto retrospettivamente i pazienti con SAA trattati nei centri EBMT con Eltrombopag sia in prima linea (30 casi: 7 come monoterapia, 23 in associazione con CsA o CsA ed ATG), sia nelle forme resistenti o ricadute (107

casi). La risposta globale al trattamento, senza differenze significative nella corte in prima linea rispetto alle forme resistenti o ricadute, è stata del 62%; la sopravvivenza globale a un anno dall'inizio del farmaco è stata dell'87.4%. Eventi avversi sono stati riportati nel 40% dei casi: gravi (grado III e IV) nel 12%, prevalentemente come tossicità epatica, condizionanti l'interruzione del farmaco solo nel 2.9%.

- Nel 2019, Winkler e collaboratori (Winkler et al. Blood 2019) hanno condotto uno studio di fase II con Eltrombopag in 40 pazienti SAA refrattari confrontando i risultati con i dati già pubblicati (Olness et al. N Engl J Med 2012, Desmond et al. Blood 2014). Sono stati inclusi tutti i pazienti di età ≥ 2 anni con SAA refrattaria almeno ad un ciclo IST a distanza di almeno 6 mesi dall'inizio del trattamento. L'Eltrombopag è stato somministrato al dosaggio di 150 mg/die nei pazienti di età > 12 anni, 75 mg/die tra 6 e 11 anni e di 2.5 mg/kg/die tra 2 e 5 anni; la dose è stata dimezzata nei pazienti di origini asiatiche. A 24 settimane il 50% dei pazienti, pediatrici e adulti, hanno ottenuto una risposta (45% bilineare, 35% trilineare), a 36 settimane il 79%. Solo un paziente ha perso la risposta in corso di trattamento. Evoluzione clonale è stata osservata nei primi 6 mesi di terapia ed ha riguardato il 18% dei casi (similmente a quanto noto in letteratura nelle SAA trattate con IST): tutti i pazienti erano adulti.
- Si è da poco concluso uno studio dell'EBMT randomizzato prospettico multicentrico che ha messo a confronto pazienti con SAA trattati, come terapia di prima linea, con IST vs. pazienti con SAA trattati con IST + Eltrombopag: i dati sono stati presentati in forma di abstract al congresso EBMT 2020 (Peiffault de Latour et al. Abstract collection Bone Marrow Transpl 2020). L'aggiunta di Eltrombopag alla IST classica ha determinato un aumento significativo della risposta completa (RC) e complessiva (parziale + completa) a 3 e 6 mesi rispetto al braccio trattato con sola IST: i pazienti dello studio erano tutti adulti e solo 8 erano di età compresa tra 15 e 18 anni.
- È in corso uno studio multicentrico internazionale open label di fase II (NCT02998645, studio SOAR), volto ad investigare l'efficacia e la sicurezza dell'associazione Eltrombopag-CsA in pazienti adulti con aplasia moderata come terapia di prima linea.
- Nel setting specificamente pediatrico, nel 2021, Groarke e collaboratori (Groarke et al. BJHematol 2021) hanno pubblicato uno studio clinico non randomizzato con controllo storico (87 casi) analizzando pazienti pediatrici (40 casi) con SAA che hanno ricevuto terapia con Eltrombopag in aggiunta alla IST in prima linea. Non è stata osservata differenza statisticamente significativa in termini di ORR o di RC a 6 mesi tra i due gruppi, a differenza di quanto osservato nell'adulto. Gli autori concludono che, al contrario di quanto succede nell'adulto, in età pediatrica, l'aggiunta dell'Eltrombopag alla IST in prima linea, non migliora l'outcome dei pazienti con SAA.
- Nel 2021 è stato pubblicato uno studio retrospettivo su 57 pazienti in età pediatrica, che ha mostrato come non ci sia differenza statisticamente significativa in termini di risposta a 3 mesi tra un gruppo di pazienti trattati con la sola IST e un gruppo di pazienti trattati con IST+ Eltrombopag; a 6 mesi, però, la RC è stata del 17.9% nel primo gruppo e del 50% nel secondo gruppo (Fang et al. Pediatr Hematol Oncol. 2021).
- È in corso uno studio di fase II, open label, multicentrico (NCT03025698) volto a caratterizzare la farmacocinetica dopo somministrazione di Eltrombopag in aggiunta a IST in pazienti pediatrici con SAA sia in prima linea, sia nelle forme refrattarie o recidivate. Questo trial potrebbe fornire risposte aggiuntive sul ruolo dell'Eltrombopag in età pediatrica.

Nei pazienti pediatrici con aplasia midollare grave refrattaria al trattamento immunosoppressivo o in ricaduta, senza un donatore di cellule staminali o non eleggibili al trapianto, l'Eltrombopag potrebbe rappresentare un'opzione terapeutica, ma sono necessari maggiori dati al riguardo in quanto i pochi studi condotti nei bambini non sembrano confermare i buoni risultati ottenuti nell'adulto: i meccanismi alla base della differente risposta all'Eltrombopag associato all'IST osservata nell'adulto (tassi anche superiori all'80% rispetto ai pregressi 40-50%) rispetto all'età pediatrica, non sono in atto chiariti.

Dose e modalità di somministrazione

Nella maggior parte degli studi l'Eltrombopag è stato somministrato in monosomministrazione giornaliera alla dose di 150 mg/die per i pazienti ≥ 12 anni, 75 mg/die nei pazienti tra 6-11 anni e 2.5 mg/kg/die tra 2-5 anni; è raccomandato il dimezzamento della dose nei pazienti dell'Est asiatico per la loro ridotta capacità di catabolismo del farmaco (dose massima giornaliera 75-100 mg). La dose di partenza di Eltrombopag più utilizzata è di 50 mg con incrementi di 25 mg ogni 2 settimane fino alla dose massima di 150 mg/die.

Il farmaco deve essere assunto almeno due ore prima o quattro ore dopo qualsiasi prodotto come antiacidi e prodotti caseari (o altri prodotti alimentari ricchi in calcio) e cibi ricchi in grassi.

Durata del trattamento

La durata del trattamento con Eltrombopag nei diversi studi è stata in genere di almeno 6 mesi. Se dopo 6 mesi di dosaggio pieno non si è ottenuta alcuna risposta, il trattamento deve essere interrotto. Nei pazienti nei quali si è ottenuta una risposta ematologica stabile e consolidata da almeno 6 mesi, andrebbe considerato il tentativo di riduzione graduale della dose fino alla sospensione.

Tossicità

L'Eltrombopag si è dimostrato un farmaco maneggevole. Gli effetti collaterali più frequentemente riscontrati sono stati rash cutaneo e aumento del livello delle transaminasi e della bilirubina. Parametri clinici, ematochimici e di funzionalità epatica devono essere monitorati regolarmente durante la terapia.

Non ci sono ancora dati conclusivi circa il possibile ruolo dell'Eltrombopag su sviluppo o progressione della fibrosi midollare o sul possibile sviluppo di anomalie citogenetiche nei pazienti con SAA: negli studi finora pubblicati l'incidenza di evoluzione clonale sembra essere simile a quanto atteso nella SAA. È raccomandato nei pazienti in trattamento con Eltrombopag una sorveglianza periodica con aspirato midollare e biopsia osteomidollare.

Prospettive future

Studi con casistiche più ampie e con pazienti omogenei (alcuni dei quali in ancora in corso) permetteranno di fornire risposte chiare rispetto all'uso dell'Eltrombopag in associazione all'immunosoppressione in particolare in età pediatrica.

L'uso dell'Eltrombopag introdotto precocemente in prima linea in associazione alla terapia immunosoppressiva, determina beneficio nell'adulto con SAA. In età pediatrica l'aggiunta di Eltrombopag alla IST classica non sembra invece determinare in modo chiaro una miglior risposta ematologica rispetto alla sola IST, per cui sulla base dei dati disponibili non è possibile fornire una chiara indicazione sull'utilizzo dell'Eltrombopag per i pazienti in età pediatrica.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.3; livello del consensus C)

Altri agonisti del recettore della trombopoietina

Romiplostim

Il Romiplostim è un peptide con attività agonista della c-MPL che agisce direttamente sulle cellule che esprimono cMPL: rispetto all'Eltrombopag - che si lega ad un dominio transmembrana - il Romiplostim si lega ad un dominio più esterno del recettore della trombopoietina e stimola anche la produzione endogena di trombopoietina. Il farmaco promuove la proliferazione e la differenziazione dei megacariociti e delle cellule staminali emopoietiche nel midollo osseo, stimolando principalmente i precursori maturi, mentre Eltrombopag sembra agire più a monte, stimolando le cellule precursori MK e il differenziamento MK (Ghanima W et al. Haematologica. 2019).

Nel 2018 Tomiyama e collaboratori (Tomiyama et al. Blood 2018) hanno pubblicato un trial clinico che ha dimostrato l'efficacia del Romiplostim in circa l'80% dei pazienti con AA non grave (NSAA) o con SAA refrattaria quando somministrato a dosi fino a 20 µg/kg a settimana.

Nel 2019 è stato pubblicato uno studio di fase II, randomizzato (Lee et al. Lancet Haematol 2019) su pazienti di età > 19 anni con AA refrattaria a IST. I pazienti sono stati randomizzati in 4 coorti differenti per dosaggio del farmaco: 1, 3, 6 o 10 µg/kg sottocute, una volta a settimana per 8 settimane. Nell'estensione dello studio, i pazienti hanno continuato con Romiplostim titolato ogni 4 settimane in singoli steps (1, 3, 6, 10, 13, 16 e 20 µg/kg una volta alla settimana), sulla base della conta piastrinica e del profilo di sicurezza, fino a 1 anno. Il 30% (10/33) dei pazienti valutabili ha ottenuto una risposta piastrinica a 9 settimane dall'inizio del trattamento; nell'estensione dello studio, il 55% (18/33) dei pazienti ha ottenuto una risposta piastrinica e ha proseguito il trattamento: di questi, il 30% ha mantenuto una risposta piastrinica a 2 e 3 anni. Una minoranza dei pazienti ha dimostrato risposta anche a livello eritrocitario e dei neutrofili.

Uno studio retrospettivo francese (Zhao LP et al. Bone Marrow Transpl 2019), ha valutato i rischi e i benefici del trattamento con Romiplostim in 14 pazienti con SAA refrattaria (10 pretrattati con ATG, 8 con Eltrombopag): la mediana della dose era di 9.4 µg/kg e solo un paziente ha avuto una risposta trilineare, suggerendo un ruolo limitato del Romiplostim nel trattamento della SAA refrattaria all'Eltrombopag.

Nel 2020 uno studio giapponese (Ise et al. J Hematology 2020) ha valutato l'efficacia e la sicurezza del Romiplostim (al dosaggio di 20 µg/kg) in 10 pazienti non responsivi a Eltrombopag. Ad un FUP mediano di dodici mesi, il 10% ha ottenuto una risposta completa e il 70% un miglioramento della conta dei neutrofili, delle piastrine o del valore di emoglobina.

Un altro studio retrospettivo (Hosokawa et al. Leukemia 2020) su 21 pazienti con AA (tutti trattati con Eltrombopag alla dose di 75-100 mg/die; 6 con almeno un ciclo di IST), trattati con Romiplostim (dose iniziale 10 µg/kg/settimana, incrementata a 15 µg/kg in 2 casi e fino a 20 µg/kg in 18 casi, per 12-40 settimane), ha mostrato che il 76% otteneva una risposta ematologica in almeno una linea cellulare a 3 mesi dall'inizio della terapia. La risposta è stata mantenuta in tutti i 16 pazienti che hanno continuato il farmaco per 3-10 mesi. Non si è osservata evoluzione clonale e nessun paziente ha presentato effetti collaterali severi tali da rendere necessaria la sospensione del trattamento.

L'uso del Romiplostim, per completa mancanza di studi nei bambini, non può essere proposto nelle AA in età pediatrica.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.2; livello del consensus C)

7. TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMPOIETICHE

7.1 TRAPIANTO ALLOGENICO DA DONATORE FAMILIARE HLA IDENTICO

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche rappresenta il trattamento di prima scelta nei bambini e negli adolescenti con aplasia midollare grave o molto grave che dispongano di un familiare HLA compatibile, con probabilità di sopravvivenza a lungo termine del 90-100% (Dufour C et al. Br J Haematol 2015, Dufour C et al. Haematologica 2014, Killick SB et al. Br J Haematol 2016, Sachdev M et al J Pediatr Hematol Oncol. 2020, Yoshida N et al Haematologica 2014).

Il rigetto (inteso come la perdita dell'attecchimento), il graft failure (ovvero il mancato attecchimento) e la GVHD hanno sempre rappresentato i principali ostacoli alla procedura trapiantologica. Pertanto, fin dall'inizio, gli sforzi sono stati rivolti alla ricerca di farmaci e combinazioni terapeutiche che controllassero queste complicanze.

Regime di condizionamento

Il gruppo di Seattle è stato il pioniere sull'impiego del trapianto di midollo osseo allogenico nel trattamento dei pazienti con SAA e vSAA. La prima casistica pubblicata nel 1974 era di 24 pazienti con età mediana di 19 anni (range 3-60) (Storb R et al. Blood 1974): 18 pazienti ricevettero un condizionamento pre-trapianto con CTX alla dose di 50 mg/Kg per 4 giorni e 6 pazienti furono condizionati con 10 Gy di TBI. Dieci dei 18 pazienti trattati con CTX sopravvissero (55%) rispetto ad 1 dei 6 (16%) pazienti che avevano ricevuto TBI.

Considerato questo risultato e la buona tolleranza, il regime CTX venne considerato il trattamento di scelta per i pazienti con AA. La TBI presentava inoltre lo svantaggio di non essere disponibile in tutti i centri trapianto e di essere associata ad effetti collaterali come il ritardo di accrescimento osseo (Storb R, Thomas ED. New York, Academic Press, 1972) e il rischio di sterilità.

L'uso di CTX a 200 mg/Kg è stato riportato in seguito in altri lavori (Storb R et al. Blood 1976; UCLA Bone Marrow Transplant Team. Lancet 1976; Van Bekkum DW et al. JAMA 1976) in cui il rigetto (riportato nel 30-60% dei casi) veniva riportato come una delle cause principali di insuccesso.

Sulla base di studi su modelli animali, che mostravano un effetto sinergico immunosoppressivo di ATG associata ad agenti alchilanti, tra i quali procarbazine e CTX, nei trapianti di cute e di midollo osseo (Storb R et al, J Immunol. 1974), l'ATG è stata introdotta, in associazione alla CTX ed alla procarbazine, nel regime di condizionamento pre-trapianto (Smith BR et al. Transplantation 1985) con risultati contrastanti: solo il 10% di rigetto è stato osservato nell'esperienza pubblicata da Smith et al. (Smith BR et al. Transplantation 1985); nessun vantaggio dell'associazione dei tre farmaci rispetto alla CTX da sola è emerso dallo studio randomizzato condotto dal gruppo di Seattle (Storb R et al. Blood 1976).

L'efficacia immunosoppressiva di ATG (ATGAM 30 mg/Kg x 3 giorni) e CTX è stata dimostrata invece nel secondo trapianto di 16 pazienti affetti da SAA: 12 di questi attecchirono dopo aver rigettato un primo trapianto di midollo osseo (Storb R et al. Blood 1987). In uno studio successivo su 39 pazienti sottoposti a un primo trapianto di midollo osseo allogenico, l'associazione CTX/ATG ha mostrato una sopravvivenza a 3 anni del 92% con soli 2 rigetti. Questo risultato era superiore a quello del gruppo storico di confronto rappresentato da 39 pazienti nei quali la probabilità di sopravvivenza era stata del 72% (Storb R et al. Blood 1994).

In uno studio prospettico, randomizzato su 134 pazienti per valutare l'efficacia dell'ATG (ATGAM 30 mg/Kg/die x 3 giorni) in aggiunta alla CTX (50 mg/kg/die x 4 giorni) rispetto alla CTX da sola, la probabilità di sopravvivenza a 5 anni è stata 74% per il gruppo CTX e 80% per il gruppo CTX/ATG, con nessuna differenza in termini di graft failure e GVHD. La differenza di sopravvivenza non era statisticamente significativa tra i due gruppi (Champlin RE et al. Blood 2007).

Nonostante il risultato di questo ultimo studio, il regime CTX/ATG, associato a un regime di profilassi della GVHD basato su CSA/MTX, è stato, secondo varie linee guida ed esperti, il regime di riferimento nelle ultime 2 decadi, vista l'elevata percentuale di attecchimento, il rischio contenuto di rigetto ed il rischio inferiore di GVHD acuta e cronica, con probabilità di sopravvivenza nel bambino e nell'adolescente del 90-100%. (Hartung HD et al. Pediatr Clin North Am 2013; Barone A et al. Blood Cells Mol Dis 2015; Georges GE et al. Blood Adv 2018; Killick SB et al Br J Haematol. 2016).

In un'analisi del registro USA CIBMTR è stato rilevato che il 77% dei trapianti da donatore familiare HLA identico include l'ATG nel regime di condizionamento e che l'ATG di coniglio (dose media 9 mg/kg, range 6-15) è risultata superiore all'ATG di cavallo (dose media 90 mg/kg, range 60-150) nel prevenire la GVHD acuta, (6% contro 17%) e la GVHD cronica (9% contro 20%) (Kerke et al Haematologica 2017). Questo effetto è legato al maggior potere immunosoppressivo dell'ATG di coniglio.

Un'alternativa al regime CTX/ATG è il regime di condizionamento basato su fludarabina (30 mg/m²/die x 5), ciclofosfamide (30 mg/kg/die x 4 oppure 60 mg/kg/die x 2) e ATG (Tymoglobuline di Genzyme 2.5-3.75 mg/kg/die x 3-4 giorni o prodotto Grafalon di Neovii Biotech GmbH 10 mg/Kg/die per 3 giorni) (regime FCA) o Alemtuzumab/Campath (0.1 mg/kg/die x 3) (regime FCC). Questi regimi, molto immunosoppressivi ma di intensità mieloablativa ridotta, sono stati studiati sia nel paziente pediatrico sia nel paziente adulto per ridurre la tossicità trapiantologica e limitare il rischio di rigetto nel trapianto da donatore non familiare HLA compatibile anche se variava la dose cumulativa di Alemtuzumab e di CTX nell'adulto (Samarasinghe S et al. Br J Haematol 2012; Bacigalupo A. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2018; Maury S et al. Haematologica 2009; Marsh JC et al. Bone Marrow Transplant 2014; Samarasinghe S et al. Br J Haematol 2018)

In un'analisi del registro CIBMTR comprendente 467 pazienti pediatrici o adolescenti di età < 18 anni, sottoposti a trapianto da donatore familiare HLA identico nel periodo 2000-2014, i regimi di

condizionamento per i pazienti in età pediatrica sono stati: CTX/ATG 71%, Bu/CY 7%, Flu/CTX/ATG 10.9% e CTX+Flu 11.1%. Considerando anche gli adulti, la popolazione in studio di 955 pazienti ricevette un regime di condizionamento con CTX/ATG nel 62% e con Flu/CTX/ATG nel 23%. I regimi CTX/ATG e Flu/CTX/ATG sono risultati equivalenti per OS (91%) e probabilità di rigetto, 7% e 8% rispettivamente, mentre i regimi BU/CTX e CTX \pm Flu risultarono avere una OS inferiore, 80% e 84% rispettivamente, e un maggiore rischio di rigetto, 9% e 16% rispettivamente. Inoltre, il regime Flu/CTX/ATG si associava a una riduzione significativa del rischio di GVHD cronica rispetto agli altri regimi: 9% rispetto al 18% del CTX/ATG, 16% del CTX+Flu, e 21% del BU/CY (Bejanyan N et al. Blood Adv 2019).

Concludendo, pur non esistendo studi prospettici randomizzati per il condizionamento pre-trapianto, l'associazione CTX (200 mg/kg)/ATG è sicuramente lo schema più impiegato (Marsh JC et al. Br J Haematol 2009; Korthof ET et al. Bone Marrow Transplant 2013; Storb R et al. Blood 1987; Storb R et al. Blood 1994; Storb R et al. Biol Blood Marrow Transplant 2001; Champlin RE et al. Blood 2007; Kojima S et al. Int J Hematol 2011; Konopacki J et al. Haematologica 2012). Recentemente è stato usato anche nel trapianto da fratello il condizionamento ad intensità ridotta già adottato nel trapianto MUD e cioè la combinazione di Fludarabina 30 mg/m²/die per 5 giorni/ciclofosfamide 300 mg/m²/die per 4 giorni/ATG o Alemtuzumab (Samarasinghe S et al. AJH 2019). Nei diversi studi pubblicati variano sia il tipo sia la dose di siero antilinfocitario, anche in relazione alla disponibilità in commercio dell'uno o dell'altro prodotto: ATG di cavallo alla dose di 30 mg/Kg x 3 giorni (Storb R et al. Blood 1994; Storb R et al. Biol Blood Marrow Transplant 2001; Champlin RE et al. Blood 2007) o per 5 giorni (Korthof ET et al. Bone Marrow Transplant 2013) oppure ATG di coniglio (prodotto di Genzyme) alla dose di 2.5 mg/Kg x 3 giorni (Kojima S et al. Int J Hematol 2011) o per 5 giorni (Konopacki J et al. Haematologica 2012), oppure 3.75 mg/kg per 3 giorni (Marsh JC et al. Br J Haematol 2009).

Profilassi GVHD

La GVHD rappresenta la causa più importante di morbidità e mortalità legate al trapianto, la cui prevenzione è particolarmente importante in una malattia non maligna come la SAA, dove non è ricercato un effetto antileucemico del trapianto. Inizialmente la profilassi della GVHD era basata sull'uso di MTX "long-course" alla dose di 15 mg/m² al g +1 e 10 mg/m² nei giorni g +3, +6, +11 e +18, quindi settimanalmente fino a 102 giorni post trapianto (Storb R et al. Blood 1974). Successivamente, è stata introdotta la combinazione di CSA/MTX dopo osservazioni su modelli sperimentali canini nei quali si era osservato una maggiore efficacia dell'associazione CsA a 3 mg/kg e MTX "short-course", 15 mg/m² al giorno +1 e 10 mg/m² nei giorni +3, +6, +11, rispetto sia al MTX da solo che alla CsA da sola (Deeg HJ et al. Transplantation 1982; Deeg HJ et al. Transplantation 1984).

L'efficacia della combinazione CSA/MTX rispetto al MTX "long course" fu confermata da uno studio randomizzato del gruppo di Seattle, che mostrò una riduzione significativa della GVHD di grado II-IV nei pazienti che avevano ricevuto MTX/CSA, rispetto ai pazienti ricevuti solo MTX (18% vs 53%; $p=0.012$), dopo un regime di condizionamento con CTX 200 mg/Kg (Storb R et al. Blood 1986). Successivamente, in uno studio prospettico randomizzato GITMO/EBMT, la profilassi con CSA/MTX si è associata a una OS superiore rispetto alla sola CSA (94% vs 78%; $p=0.05$) in 71 pazienti con SAA, condizionati prima del trapianto con CTX 200 mg/Kg (Locatelli F et al. Blood 2000). In questo studio lo schema di somministrazione del MTX differiva da quello originale dello "short course" (Deeg HJ et al. Transplantation 1984) per la dose di MTX: 8 mg/m² nei giorni +1, +3, +6, +11. La riduzione del dosaggio del MTX era basata sui dati di uno studio su pazienti con leucemia acuta trapiantati da familiari compatibili, nei quali il MTX "short course" era stato somministrato per accorciare il periodo della neutropenia, la gravità della mucosite e il rischio di infezioni (Zikos P et al. Blood 1998).

Questi risultati furono confermati anche da uno studio multicentrico su 94 pazienti con età mediana di 26 anni (range 2-59), in cui, mediante un condizionamento con CTX 200 mg/kg e una profilassi della GVHD con CSA/MTX, si ottenne una OS dell'88% dopo un follow-up mediano di 6 anni, con una probabilità di rigetto del 4% e di GVHD grado II-IV del 29% (Storb R et al. Biol Blood Marrow Transplant 2001).

Sulla base di questi studi, la combinazione di CSA/MTX rappresenta lo standard di riferimento per i trapianti con condizionamento CTX/ATG o Flu/CTX/ATG, mentre il MTX è omesso nei trapianti con condizionamento Flu/CY/Alemtuzumab-Campath in base a studi condotti soprattutto in Inghilterra (Marsh JC et al. Blood 2011; Marsh JC et al. Bone Marrow Transplant 2014).

Il range terapeutico consigliato per la CSA è 100-200 ng/ml fino a 9 mesi post trapianto, dopo di che si suggerisce di iniziare la riduzione fino alla sospensione, da attuare, in assenza di GVHD, ad un anno dal trapianto (Korthof ET et al. Bone Marrow Transplant 2013).

Infine, in uno studio retrospettivo su 949 pazienti, la combinazione tacrolimus/MTX ha mostrato un'efficacia analoga a quella di CSA/MTX nel trapianto HLA identico familiare (Inamoto Y et al. Biol Blood Marrow Transplant 2015).

In sintesi, studi prospettici randomizzati sono disponibili in letteratura solo per definire la terapia di profilassi della GVHD (Storb R et al. Blood 1986; Locatelli F et al Blood 2000). Tuttavia, questi studi, che hanno mostrato la superiorità dell'associazione MTX/CsA rispetto ai singoli immunosoppressori, non prevedevano l'uso della sieroterapia nel regime di condizionamento, ma solo CTX 50 mg/kg per 4 giorni. Inoltre, benché in entrambi gli studi prospettici lo schema di MTX adottato era quello "short course", le dosi impiegate sono state diverse: 15 mg/m² al giorno +1 seguiti da 10 mg/m² nei giorni +3, +6, +11 nell'esperienza del gruppo di Seattle (Storb R et al. Blood 1986), 8 mg/m² negli stessi giorni nell'esperienza GITMO-EBMT (Locatelli F et al. Blood 2000) e 10 mg/m² nei giorni +1, +3, +6 nelle raccomandazioni EBMT (Korthof ET et al. Bone Marrow Transplant 2013).

ATG

L'importanza della sieroterapia nella prevenzione del rigetto e riduzione della GVHD è stata confermata da vari studi nel corso degli anni, sia in pazienti pediatriche che pazienti adulti. In uno studio retrospettivo di Seattle, la sopravvivenza a 5 anni dei pazienti trapiantati con diverse modalità condizionamento è stata: 66% per 98 pazienti nel periodo 1971-84 con CTX + MTX long course; 95% per 19 pazienti nel periodo 1981-1988 con CTX + MTX short course; 100% per 31 pazienti nel periodo 1989-2010 con CTX/ATG (30 mg/Kg al giorno per 3 giorni) + MTX/CSA. Il rigetto è stato rispettivamente, del 22%, 32% e 7%. La probabilità della GVHD acuta di grado III e IV è stata del 15%, 0%, 3%, mentre quella della GVHD cronica a 2 anni è stata del 21%, 21%, 10% (Burroughs LM et al. Br J Haematol 2012).

In uno studio retrospettivo francese su 61 pazienti di età mediana di 21 anni (range 4-43) la sopravvivenza a 6 anni è stata dell'87%. In questo studio venivano anche riportati gli effetti a lungo termine: il 10% dei pazienti ha avuto una necrosi asettica, 12 pazienti hanno mostrato disfunzioni endocrine e un solo paziente ha sviluppato una neoplasia secondaria (Konopacki J et al. Haematologica 2012).

Queste indicazioni sono confermate dall'EBMT che raccomanda la combinazione di CTX (200 mg/Kg)/ATG (coniglio di Genzyme 2.5 mg/Kg per 4 giorni oppure cavallo 30 mg/Kg per 5 giorni) + CSA + MTX (10 mg/m² nei giorni 1, 3, 6) (Korthof ET et al. Bone Marrow Transplant 2013).

Alemtuzumab

L'Alemtuzumab al dosaggio di 0.2 mg/kg x 5 giorni si è dimostrato una valida alternativa all'ATG per la profilassi della GVHD, associato alla CSA. In uno studio retrospettivo e multicentrico in cui 100 pazienti avevano ricevuto alemtuzumab e 55 l'ATG, la sopravvivenza è risultata del 91% contro 85%, il rigetto del 9% contro l'11% e il rischio di GVHD cronica dell'11% contro 26%. In questo studio i centri potevano usare sia un condizionamento con CTX 200 mg/kg, sia un condizionamento con Fludarabina 30 mg/m² x 4 giorni e CTX 300 mg/m² per 4 giorni (Marsh JC et al. Bone Marrow Transplant 2014).

In uno studio retrospettivo su 1837 pazienti, sia adulti che bambini, sottoposti a trapianto da donatore familiare o donatore non familiare, nel regime di condizionamento, 1283 pazienti hanno ricevuto ATG, 261 pazienti alemtuzumab e 293 pazienti nessuna sieroterapia. L'incidenza della GVHD acuta di II-IV°, è stata del 13.3% nei pazienti che hanno ricevuto l'ATG, del 6.7% in quelli che hanno ricevuto l'Alemtuzumab e del 19.1% in quelli che non hanno ricevuto sieroterapia; l'incidenza di GVHD cronica è stata, rispettivamente

del 22%, 16.9% e 34%. L'OS è stata dell'80.2% in chi ha ricevuto l'ATG, 81.5% nei pazienti trattati con Alemtuzumab e del 72.5% in quelli che non hanno ricevuto sieroterapia. L'uso di ATG o Alemtuzumab nel regime di condizionamento pre-trapianto si associa, quindi, ad una incidenza inferiore di GvHD acuta e cronica e una OS migliore, rispetto al non uso della sieroterapia (Samarasinghe S et al. Am J Hematol 2019).

Fonte di cellule staminali

Il midollo osseo come fonte di cellule staminali si è dimostrato superiore alle staminali raccolte dal sangue periferico mediante stimolazione con G-CSF e leucaferesi in 2 studi retrospettivi europei, in cui i pazienti avevano ricevuto l'ATG come sieroterapia. Infatti, i trapianti eseguiti con le staminali midollari si associano ad un'incidenza significativamente inferiore di GVHD acuta a cronica rispetto a quelli eseguiti con staminali periferiche. Pertanto, l'uso di staminali midollari rappresenta la prima scelta, se disponibili (Killick SB et al. Br J Haematol 2016; Bacigalupo A et al. Haematologica 2012; Schrezenmeier H et al. Blood 2007; Bacigalupo A. Blood 2017).

La terapia di I linea per un paziente di età pediatrica affetto da AA che necessiti di trattamento e che abbia un donatore familiare HLA compatibile è il trapianto da MRD.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 9; livello del consensus A)

Il regime di condizionamento raccomandato per il trapianto da MRD è l'associazione Ciclofosfamide 50 mg/kg per 4 giorni associata ad ATG di coniglio (Prodotto Tymoglobuline di Genzyme a 2.5-3.75 mg/Kg per 3 giorni o prodotto Grafalon di Neovii Biotech GmbH a 10 mg/Kg/die per 3 giorni) oppure alemtuzumab 0.1-0.3 mg/Kg/die per 3-4 giorni (max 1 mg/Kg totale).

(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

Un regime alternativo è la combinazione Fludarabina 30 mg/kg/die per 4 giorni + Ciclofosfamide 300 mg/m²/die per 4 giorni associata ad ATG o Alemtuzumab.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.1; livello del consensus B)

Il regime di profilassi della GVHD raccomandato nei pazienti che hanno ricevuto ATG è MTX/CSA. Le dosi di MTX da utilizzare possono essere 8 mg/m² nei giorni +1, +3, +6, +11 oppure 15 mg/m² al giorno +1 oppure 10 mg/m² nei giorni +3, +6, +11 oppure 10 mg/m² nei giorni +1, +3, +6.

(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.3; livello del consensus B)

Il regime di profilassi della GVHD raccomandato nei pazienti che hanno ricevuto Alemtuzumab è solo CSA.

(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

La dose di CSA raccomandata è 1.5 mg/Kg ogni 12 ore, a partire dal g. -1. Il livello ematico della CSA deve essere mantenuto a 100-250 ng/ml fino a 9-12 mesi dopo il trapianto; successivamente si suggerisce di iniziare la riduzione della dose fino alla sospensione definitiva che, eseguendo un monitoraggio periodico del chimerismo e in assenza di GVHD, deve essere attuata in 3 mesi circa, possibilmente ad un anno circa dalla data del trapianto.

(Livello di evidenza III; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

La fonte di cellule staminali raccomandata è il midollo osseo.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.9; livello del consensus B)

Il tacrolimus in caso di intolleranza, tossicità, allergia alla CSA, costituisce una valida alternativa.

(Livello di evidenza I; Forza del consensus 8.3; livello del consensus B).

Nota*: nei pazienti sovrappeso è consigliato aggiustare la dose di Ciclofosfamide in base alla formula.

- Peso aggiustato: $(\text{peso reale} - \text{peso ideale}) \times 0.4 + \text{peso ideale}$.

Il peso ideale viene calcolato secondo le equazioni proposte da Devine nel 1974 (Griggs JJ et al. J Clin Oncol. 2012):

- Peso ideale (maschio): $45.4 + 0.89 \times (\text{altezza in centimetri} - 152.4) + 4.5$

- Peso ideale (femmine): $45.4 + 0.89 \times (\text{altezza in centimetri} - 152.4)$

7.2 TRAPIANTO ALLOGENICO DA DONATORE NON FAMILIARE

I primi studi sull'impiego del trapianto da donatore volontario nei pazienti con AA risalgono agli anni '80 (Bacigalupo A BMT 1988; Camitta B Blood 1989; Casper JT Am J Pediatr Hematol Oncol 1990; Sandres JE A J Ped hematol Oncol 1994); la graft failure e la GVHD hanno rappresentato, da subito, le maggiori complicanze. Pertanto, sono stati elaborati regimi di condizionamento fortemente immunosoppressivi a tre farmaci, con o meno l'aggiunta della TBI, cercando di adeguare i dosaggi al controllo del rigetto, contenendo i rischi della tossicità sia da farmaco che da radioterapia.

In pazienti pediatriche, con SAA o VSAA, senza un donatore familiare compatibile, non rispondenti o recidivati dopo terapia immunosoppressiva, il trapianto allogenico da donatore non familiare è già da alcuni anni la terapia di scelta (Marsh JC BJH 2009; Samarasinghe S BJH 2018) ma, in tempi più recenti, grazie all'utilizzo di regimi di condizionamento a ridotta intensità, alla maggiore risoluzione della tipizzazione HLA e al miglioramento delle terapie di supporto, vi è stato un notevole miglioramento dei risultati ottenuti con il MUD nelle SAA/VSAA, fino ad ottenere OS a 2 anni intorno al 95%, simili cioè a quelle ottenute con il MRD, in particolare nei pazienti al di sotto dei 20 anni (Bacigalupo, Hematologica 2015; Dufour et al, BJH 2015a). Nel 2005, è stata proposta lo schema di condizionamento pre-trapianto, non mieloablativo ma fortemente immunosoppressivo, Fludarabina+CTX+ATG (FCA), ripreso poi in molte altre esperienze (Bacigalupo A BMT 2005; Tolar J BBMT 2012; Kang HG BBMT 2012; Samarasinghe S BJH 2012). Su questa piattaforma è stata successivamente aggiunta la TBI (Bacigalupo A Haematologica 2010; Tolar J BBMT 2012; Kang HG BBMT 2010). Benché i dosaggi dei vari componenti del regime di condizionamento varino nelle diverse esperienze, sia per quanto riguarda la TBI, sia per quanto riguarda la dose di fludarabina, la maggior parte degli studi sono ancora oggi concordi nel continuare a proporre FCA +/- basse dosi di TBI (200 Gy). In alternativa all'ATG, il gruppo inglese ha proposto l'uso dell'Alemtuzumab, e la sola CsA quale profilassi della GVHD (Samarasinghe S BJH 2012).

Anche nel setting del trapianto da donatore volontario, però, non ci sono studi randomizzati, relativi ai regimi di condizionamento pre-trapianto in pazienti pediatriche. Alcuni recenti studi retrospettivi pediatriche (Dufour et al. BJH 2015a, Choi et al. BMT 2017), oltre a confermare sopravvivenze nei MUD comparabili a quelle del MRD, hanno mostrato come con la IST si ottenga molto spesso una remissione sub-ottimale, con un 50% dei pazienti che risulta refrattario e un maggior rischio di evoluzione clonale (Kulasekararaj et al. Blood 2014). In particolare, uno studio del 2015 (Dufour et al BJH 2015b) ha analizzato l'outcome di 29 pazienti di età mediana 8.6 anni, trattati in prima linea con il MUD e l'ha comparato a pazienti, con simili caratteristiche, trattati in prima linea con MRD ovvero IST o MUD dopo fallimento dell'IST. L'OS a 2 anni è risultata sovrapponibile nei primi 3 gruppi (96% nei MUD, 91% nei MRD e 94% nel gruppo IST), ma l'EFS a 2 anni (intendendosi come eventi la morte, la non risposta, la recidiva, lo sviluppo di clone PNH, le neoplasie secondarie e la necessità di ricorrere al HSCT dopo aver fallito l'IST) è risultato essere: 92% nella coorte MUD, 87% nella coorte MRD e appena 40% per i pazienti sottoposti a IST, dimostrando quindi che outcome e qualità della vita nei pazienti sottoposti a IST sono complessivamente molto inferiori rispetto a quelli dei pazienti sottoposti a trapianto. Nei due grandi studi dell'EBMT la EFS a 3 anni in

bambini con SAA sottoposti a MUD dopo fallimento dell'IST era 81% (Dufour Br J Haematol 2015) e quella in adolescenti (tra i 12 e i 18 anni) 71% (Dufour Haematologica 2014).

Risultati simili sono stati riportati da Choi et al. nel 2017 (Choi et al. BMT 2017). Gli autori hanno retrospettivamente confrontato l'outcome di pazienti pediatriche con SAA sottoposti a IST in prima linea (n=19) con quello di 23 pazienti sottoposti a HSCT da donatore alternativo in prima linea (di cui 19 MUD-HSCT). La FFS (Failure Free Survival) stimata dei pazienti sottoposti a HSCT in prima linea si è rivelata essere largamente maggiore rispetto al gruppo IST in prima linea (rispettivamente 91.3% vs 30.7%, $p<0.001$).

In una recente metanalisi pubblicata nel 2020 Zhu et al (Zhu et al. BMC Immunol 2020) hanno analizzato la letteratura riguardante l'outcome post IST, MSD e MUD, evidenziando quanto già riportato nelle conclusioni dei due studi di Dufour e Choi. Uno studio retrospettivo pubblicato nel 2019 in Brasile, su 106 pazienti in età pediatrica con SAA trattati con trapianto MRD o MUD ha mostrato come non ci sia differenza statisticamente significativa in termini di OS a 4 anni tra MRD e MUD (rispettivamente 82% e 69%) (Darrigo LG et al. Pediatr Transplant 2019). Nel 2015 è stato pubblicato uno studio retrospettivo che ha confermato come non ci sia differenza statisticamente significativa in termini di OS tra pazienti (adulti e bambini) trapiantati con MRD e quelli con MUD (Mortensen BK et al. Bone Marrow Transplantation 2015).

E' stato recentemente concluso negli Stati Uniti un trial clinico prospettico randomizzato il cui end point primario era valutare la fattibilità di uno studio randomizzato prospettico che comparasse l'outcome di pazienti pediatriche con SAA trattati in prima linea con IST o trapianto MUD (Pulsipher MA et al. Pediatr Blood Cancer. 2020). Lo studio ha dimostrato che l'83% (vs l'ipotizzato 60%) dei pazienti randomizzati per il braccio trapianto MUD ha effettivamente ricevuto questo trattamento. Stante questa "randomization rate" e basandosi sul reclutamento atteso nei centri Nord-Americani, lo studio ha raggiunto l'end point primario indicando che è verosimile che 200 pazienti in 3-4 anni possano esser arruolati in un trial prospettico randomizzato dimostrandone dunque la fattibilità. Pur se i pazienti del braccio trapianto MUD hanno avuto maggiori successi terapeutici e meno eventi avversi rispetto a quelli trattati con IST (ATGAM+CsA), la limitatezza del campione non permette secondo gli Autori di trarre conclusioni di outcome.

Complessivamente i dati pubblicati mostrano che nei pazienti pediatriche privi di MRD, il trapianto MUD sembra essere ormai opzione di prima linea soprattutto se effettuato entro 2-3 mesi dalla diagnosi per evitare il rischio di gravi infezioni legato al persistere della neutropenia.

Regime di condizionamento FCA

I dati pubblicati dal gruppo di Seattle nel 2001 (Deeg HJ, et al. Blood 2006; Deeg HJ et al. Biol Blood Marrow Transplant 2001) avevano identificato il regime CTX/ATG di cavallo e basse dosi di TBI come ottimale per la prevenzione del rigetto/graft failure.

Nel 2005 il gruppo europeo ha riportato risultati incoraggianti con l'impiego di un regime di condizionamento ad intensità ridotta con l'associazione FCA (fludarabina 120 mg/m²; CTX 1200 mg/m²; ATG di coniglio (prodotto di Genzyme a 3.75 mg/Kg x 4 giorni o prodotto Grafalon a 10 mg/Kg/die per 3 giorni) (Bacigalupo A et al. Bone Marrow Transplant 2005). Questo regime era traslato dall'esperienza di Houston (Khouri IF et al. J Clin Oncol 1998), che prevedeva l'associazione di fludarabina+CTX+ATG (FCA) per ridurre il rischio di GVHD. Questo regime, considerando l'incremento dei secondi tumori con l'uso della radioterapia (Pierga JY et al. Radiother Oncol 1994), non includeva la TBI. I pazienti inclusi nello studio erano 38 ed avevano un'età mediana di 14 anni (range 3-37). L'incidenza della GVHD acuta e cronica era, rispettivamente, dell'11% e del 27% e l'incidenza della graft failure del 18%. Globalmente la sopravvivenza a due anni era il 73%. Veniva osservato un vantaggio, nella riduzione della graft failure, per i pazienti con età uguale o inferiore a 14 anni: 5% vs 32% con la popolazione dei pazienti più giovani che mostrava anche una migliore sopravvivenza (84% vs 61%).

Nel 2015 Anderlini et al hanno riportato i dati di uno studio prospettico dose-finding sulla CTX in combinazione con fludarabina e mini-TBI (2Gy) (Anderlini et al Lancet Haematol 2015) nel contesto MUD in SAA. In tale studio, la dose di 150 mg/kg di CTX era stata esclusa perché troppo tossica e nei pazienti che hanno ricevuto dosi di 50 e 100 mg/kg (di cui rispettivamente 11/38 e 21/42 al di sotto dei 18 anni di età) si è osservata un'incidenza cumulativa di graft failure simile a 12 mesi (11.7% vs 14.6%); simile era anche la sopravvivenza al giorno 100 (92% vs 85%), con tossicità maggiore nel 22% dei pazienti che avevano ricevuto CTX 100 mg/kg e nell'11% dei pazienti che avevano ricevuto CTX 50 mg/kg, facendo concludere agli autori che queste dosi potessero essere prese come riferimento per i regimi di condizionamento associato a TBI nel MUD.

Il gruppo giapponese ha pure valutato la possibilità di ridurre la dose di CTX da 200 mg/kg a 100 mg/kg nel regime FCA senza TBI, ottenendo però nel 15% dei casi poor graft function in presenza di chimerismo full donor, cosa che non avevano osservato nei pazienti che avevano ricevuto CTX a 200 mg/kg (Yoshida et al, Blood 2012). Lo stesso gruppo ha riportato di recente buoni risultati in pazienti pediatriche con l'utilizzo dello schema Fludarabina-Melphalan (Yoshida et al, Blood 2014).

TBI

Agli inizi degli anni 2000 furono pubblicate due importanti esperienze (Deeg HJ et al. Biol Blood Marrow Transplant 2001; Kojima S et al. Blood 2002) sull'impiego della TBI. Nella prima (Deeg HJ et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2001) il gruppo americano disegnò uno studio prospettico, multicentrico per definire la minima dose di TBI sufficiente per ottenere l'attecchimento in pazienti sottoposti a trapianto da donatore non familiare HLA compatibile. La dose individuata efficace, in combinazione con CTX/ATG fu 200 cGy. Nella seconda esperienza retrospettiva del gruppo giapponese (Kojima S et al. Blood 2002), che includeva 154 pazienti, la TBI risultò essere un fattore favorevole per ridurre il rigetto e l'ATG per ridurre la GVHD acuta di grado III-IV.

Per analizzare il ruolo della TBI con un regime di condizionamento composto da FCA (fludarabina 120 mg/m²; CTX 1200 mg/m²; ATG di coniglio 3.75 mg/Kg x 4 giorni) nel 2010 il gruppo europeo ha condotto uno studio su 100 pazienti, identificati nel data base dell'EBMT, che avevano ricevuto trapianto da un donatore volontario o da un familiare incompatibile per un locus, trattati o con FCA o con FCA più una dose di TBI (2 Gy) al giorno -1 dal trapianto (Bacigalupo A et al. Haematologica 2010). Nello schema con TBI la dose di ATG fu ridotta a 3.75 mg/Kg per 2 giorni. Il gruppo dei pazienti che aveva ricevuto radioterapia aveva un'età mediana statisticamente più elevata rispetto al gruppo che aveva ricevuto solo FCA: 27 anni (7-53) verso 13 anni (3-51) ($p<0.001$). Tutti i pazienti ricevettero, per la profilassi della GVHD, CsA/MTX (MTX alla dose di 10 mg/m² al giorno +1 e 8 mg/m² ai giorni +3, +6 post-trapianto). Con una mediana di FUP di 1665 e 765 giorni, la sopravvivenza attuariale a 5 anni fu 73% per il gruppo FCA e 79% per il gruppo FCA/TBI. Non furono osservate differenze nell'incidenza della GVHD acuta tra i due gruppi. Il gruppo FCA/TBI mostrò un'aumentata incidenza di GVHD cronica, anche se la differenza non raggiungeva la significatività statistica (27% vs 50%; $p=0.06$). L'incidenza cumulativa della graft failure fu 17%. L'effetto dell'età fu piuttosto forte nel gruppo FCA, ma non significativo nel gruppo FCA/TBI. Inoltre, l'effetto di una migliore compatibilità tra donatore e ricevente fu più evidente nella popolazione dei pazienti che aveva ricevuto FCA, rispetto all'altro gruppo. Pertanto, il regime di condizionamento senza radioterapia sembrava più adatto nei pazienti più giovani, HLA compatibili con il loro donatore; per gli altri pazienti l'aggiunta della TBI offriva migliori risultati.

Altre esperienze hanno impiegato l'associazione CTX, ATG, Fludarabina con o senza TBI; tuttavia, i dosaggi dei vari componenti del regime di condizionamento variano nelle diverse esperienze (Tolar J et al. Biol Blood Marrow Transplant 2012; Kang HJ et al. Biol Blood Marrow Transplant 2010; Kang et al BBMT 2016) sia per quanto riguarda la TBI sia per quanto riguarda la fludarabina.

Infine, c'è da sottolineare come nelle revisioni della letteratura e in alcune delle linee guida più recenti (Iftikhar et al, Blood Rev 2020) sulla base dei lavori citati, venga suggerito di associare la TBI al regime

FCA nei pazienti > 14 anni, per il maggior rischio di rigetto, così come nei politrasfusi (>20 trasfusioni) o se presente incompatibilità HLA.

Tipo di ATG

L'utilizzo di ATG è associato a migliori sopravvivenze sia nei MRD che nei MUD (Bacigalupo et al. Hematologica 2015).

Uno studio recente del CIBMTR (Kekre et al, Hematologica 2017) ha valutato l'outcome di 833 pazienti sottoposti a MUD (287) o MRD (546) che avevano ricevuto ATG di cavallo o di coniglio, rilevando che nei pazienti MUD che avevano ricevuto ATG di coniglio la sopravvivenza a 3 anni era maggiore (83% versus 75%, $p=0.02$). Inoltre, nei pazienti MUD che avevano ricevuto ATG di cavallo si era osservato maggiore aGVHD, (42% versus 23%, $p<0.001$), mentre non c'erano differenze per la cGVHD.

Questi dati supportano dunque nel contesto trapiantologico per la SAA l'uso dell'ATG di coniglio.

Regime di condizionamento FCC

Nel 2012 il gruppo pediatrico inglese ha condotto uno studio retrospettivo su 44 soggetti di età pediatrica che nella stragrande maggioranza avevano fallito l'IST ed erano stati sottoposti a trapianto MUD impiegando l'Alemtuzumab al posto dell'ATG, in associazione a fludarabina/CTX (FCC). I risultati sono stati ottimi: graft failure 0%, GVHD acuta 38%, GVHD cronica 11%, OS a 5 anni 92% (Samarasinghe S et al. Br J Haematol 2012). Lo stesso gruppo, pertanto suggerisce l'FCC quale condizionamento di scelta pre-trapianto nei pazienti pediatrici con AA (Samarasinghe S, Webb DK. Br J Haematol 2012).

Fra i vantaggi del regime FCC c'è il fatto che si tratta di regime radiation free e che è inoltre associato a una minore incidenza di cGVHD. Per contro, è da considerare che in genere questo regime si associa ad una maggiore incidenza di chimerismo misto, che può persistere anche a lungo.

Uno studio retrospettivo che ha comparato FCA e FCC in MUD (Marsh et al BMT 2014) ha mostrato simili percentuali di graft failure (11% vs 9%), ma un minor rischio di GvHD cronica in FCC (11% vs 26% in FCA, $p=0.03$). L'OS a 5 anni era migliore in FCC (88% versus 57%, $p=0.026$), ma pochi pazienti sottoposti a MUD avevano ricevuto FCA (Samarasinghe S et al. Br J Haematol 2012; Samarasinghe S, Webb DK. Br J Haematol 2012). In analisi multivariata, l'uso del midollo come fonte di CS e l'età più giovane erano predittori di migliore sopravvivenza.

Profilassi GVHD

Nella maggior parte degli studi per la profilassi della GvHD è stata impiegata l'associazione MTX "short course" e CsA, tuttavia la dose di MTX, per ciascuna somministrazione, varia nelle diverse esperienze. Fino al 2015 era stato pubblicato un solo studio di confronto tra due regimi di profilassi della GVHD: CsA/MTX verso MTX/tacrolimus e nell'analisi si dimostrava un vantaggio con l'impiego del tacrolimus (Yagasaki et al BBMT 2009).

Nel 2015 Inamoto (Inamoto et al BBMT 2015) ha comparato l'outcome post trapianto utilizzando CsA + MTX o Tacrolimus + MTX in uno studio retrospettivo in cui erano inclusi 949 pazienti, di cui 214 sottoposti a MUD e ha rilevato in questa categoria di pazienti una minore mortalità nei pazienti che avevano ricevuto Tacrolimus + MTX, senza differenze negli altri endpoints dello studio, inclusi l'incidenza di cGvHD e aGvHD, ribadendo comunque la necessità di studi prospettici per confermare il vantaggio dell'impiego del tacrolimus.

Fonte di cellule staminali

Riguardo la fonte di HSC, è stato dimostrato da più lavori il vantaggio del midollo osseo rispetto alle cellule staminali periferiche, che sono associate a maggiore cGvHD in tutte le fasce di età (Eapen M et al, Blood 2011).

Review, Consensus e Linee guida

Sulla base delle varie esperienze si viene a delineare una serie di raccomandazioni in parte differenti.

Le linee guida inglesi (Killick et al, BJH 2016; Samarasinghe et al, BJH 2018) raccomandano per i pazienti pediatrici l'utilizzo del regime FCC se donatore MUD HLA identico 10/10: Fludarabina 30 mg/m²/die per 5 giorni: da g -7 a g -3 (150 mg/m²), CTX 60 mg/kg/die per 2 giorni, da g -3 a g -2 (120 mg/kg), Alemtuzumab 0.3 mg/kg/die per 3 giorni, da g -6 a g -4 (0.9 mg/kg), e CsA come profilassi della GVHD. La fonte preferibile di cellule staminali è il midollo osseo. Nei pazienti con donatore MUD HLA mismatched 9/10 si raccomanda il regime FCC + TBI (3 Gy) e CSA + MMF come profilassi della GVHD. In alternativa al regime FCC è raccomandato il regime FCA con miniTBI per i pazienti adulti e profilassi della GVHD con CsA e MTX alla dose di 10 mg/m² al giorno +1 ed 8 mg al giorno +3 e +6.

Nella terza consensus (Kojima S et al. Int J Hematol 2011) del 2011 un gruppo internazionale raccomanda quale regime di condizionamento pre-trapianto, in età pediatrica, l'associazione Fludarabina (120 mg/kg), CTX (120 mg/Kg) e ATG (7.5 mg/kg, se prodotto Genzyme o 10 mg/kg/die per 3 giorni, se prodotto Grafalon). In considerazione dell'elevato rischio della sindrome linfoproliferativa correlata alla riattivazione dell'EBV, viene consigliato l'uso del Rituximab.

La medesima consensus riporta i dati di uno studio giapponese su 301 pazienti che ha mostrato la superiorità dell'associazione FCA/TBI rispetto a CTX/ATG/TBI (Yagasaki H et al. Biol Blood Marrow Transplant 2009).

Nell'aggiornamento del 2018 delle linee guida giapponesi viene raccomandato il regime Fluda-Melphalan + mini-TBI nei pazienti pediatrici (Yoshida et al Current Oncology Reports 2108).

Nel lavoro di review dell'EBMT (Korthof ET et al. Bone Marrow Transplant 2013) lo schema suggerito per il regime di condizionamento pre-trapianto in età pediatrica conferma l'uso della fludarabina (150 mg/m²) con CTX (150 mg/Kg) e ATG di coniglio alla dose di 2.5 mg/kg (prodotto di Genzyme) o di cavallo alla dose di 30 mg/Kg per 4 giorni. Per la profilassi della GVHD è suggerita l'associazione di CsA e MTX (10 mg/m² giorno +1, +3, +6).

In conclusione, anche nel setting del trapianto da donatore volontario, non ci sono studi randomizzati, relativi ai regimi di condizionamento pre-trapianto in pazienti pediatrici.

La terapia di I linea per un paziente di età pediatrica affetto da AA che necessita di trattamento e che non abbia un donatore familiare HLA compatibile è il trapianto da MUD, se effettuabile da donatore HLA matched almeno 9/10 ed entro 2-3 mesi dalla diagnosi.

(Livello di evidenza III, IV; Forza del consensus 8.8; livello del consensus B)

Il regime di condizionamento consigliato, nei pazienti affetti da SAA che devono essere sottoposti a trapianto allogenico da MUD prevede l'utilizzo di fludarabina 120 mg/m² (30 mg/m²/die x 4) in associazione a ciclofosfamide 120 mg/Kg (30 mg/kg/die x 4) e ATG 2.5 mg/Kg/die per 3 giorni, se prodotto di Genzyme o ATG 10 mg/Kg/die per 3 giorni, se prodotto Grafalon di Neovii Biotech GmbG. Nel caso il paziente abbia più di 14 anni o sia politrasfuso (> 20 trasfusioni) o in caso di parziale incompatibilità HLA (1 o 2 Ag MM), va considerata l'aggiunta di una dose di 2 Gy di TBI. In caso di utilizzo della TBI, la dose di ciclofosfamide si può ridurre a 100 mg/kg.

(Livello di evidenza IV, II; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)

Un valido regime alternativo è rappresentato dall'associazione di Fludarabina, Ciclofosfamide e Alemtuzumab (FCC).

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.1; livello del consensus B)

Per la prevenzione della GVHD in caso di utilizzo del regime FCA è indicato l'utilizzo di MTX/CSA. La dose di CSA consigliata è 1.5 mg/Kg ogni 12 ore (V), mantenendo un livello ematico "trough" di 150-250 ng/ml, fino a 9-12 mesi dopo il trapianto; successivamente la dose va ridotta lentamente in

almeno 3 mesi ed in assenza di GVHD, eseguendo inoltre un monitoraggio periodico del chimerismo. Le dosi di MTX più usate sono 10 mg/m² giorno +1, oppure 8 mg/m² giorni +3, +6, oppure 10 mg/m² per ciascuna di tre dosi.

(Livello di evidenza V, EO; Forza del consensus 8.2; livello del consensus B)

Se si utilizza il regime FCC, si raccomanda l'utilizzo della sola CsA come profilassi della GvHD.

(Livello di evidenza III; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

7.3 TRAPIANTO ALLOGENICO DA DONATORE ALTERNATIVO

In assenza di un donatore familiare HLA identico e di un donatore da banca almeno 8/8 antigeni compatibile la scelta di un donatore alternativo rimane ad oggi controversa.

Trapianto con sangue di cordone da banca

Dati precedenti della letteratura riportavano la fattibilità del trapianto da cordone da banca in pazienti pediatrici con AA (Yoshimi A Biol Blood Marrow Transplant 2008; Chan KW Bone Marrow Transplant 2008; Liu HL Bone Marrow Transplant 2012).

Kuwatsuka et al. nel 2016 (Kuwatsuka et al. Biology of Blood and Marrow Transplantation 2016) hanno analizzato i dati del registro del trapianto di cellule ematopoietiche della Società Giapponese; hanno comparato i dati di pazienti adulti affetti da AA sottoposti a trapianto da cordone da banca con quelli trapiantati con MUD HLA compatibile 8/8, 7/8 e 6/8 antigeni. In analisi multivariata, il rischio di mortalità era inferiore nei pazienti trapiantati con donatore HLA compatibile 8/8 rispetto al trapianto da cordone, aggiustato per età e per profilassi della GvHD. Il rischio di mortalità dei trapianti con donatore HLA compatibile 7/8 e 6/8 non era diverso dal rischio di mortalità del trapianto da cordone. I rischi di GvHD acuta di III e IV grado e della GvHD cronica erano sovrapponibili nei 4 gruppi. La causa di morte prevalente nel gruppo dei trapianti da cordone e da MUD HLA compatibile 6/8 è il rigetto, mentre nei gruppi sottoposti a trapianto da donatore HLA compatibile 8/8 e 7/8 sono le infezioni. Sotto i 40 anni di età, la sopravvivenza a 3 anni dei pazienti sottoposti a trapianto da cordone (76%) risulta simile ai soggetti sottoposti a trapianto da banca.

Recentemente Peffault de Latour R et al. (Blood 2018) hanno condotto uno studio prospettico di fase 2 per valutare l'efficacia e la sicurezza del trapianto da cordone da banca in 26 pazienti con AA (età mediana 16 anni, range 9.3-23.4), refrattari, dopo 6 mesi, alla IST (ATG e CSA), in assenza di MUD. I criteri di eleggibilità erano la disponibilità di una o due unità cordonali contenenti insieme o separatamente NCT > 4x10⁷/Kg e con non più di 2/6 disparità antigeniche dell'HLA di ciascuna unità rispetto al paziente, in assenza di anticorpi anti HLA donatore specifici. Il regime di condizionamento prevedeva fludarabina, CTX, ATG e TBI 2 Gy. L'attecchimento si è verificato in 23 pazienti (88%); l'incidenza cumulativa di GvHD acuta di II-IV grado è stata del 45.8% e di GvHD cronica del 36%. La sopravvivenza a 1 anno è risultata dell'88.5% e dell'84% a due anni.

Shengnan et al. (Bone Marrow Transplantation 2020) hanno condotto uno studio retrospettivo su 15 pazienti con AA refrattari ad una prima linea di terapia (età mediana 7 anni, range 3-20) sottoposti a trapianto da cordone da banca (regime di condizionamento FLU +CY +/- BU). L'attecchimento è stato ottenuto in 15 pazienti (86.7%); 5 pazienti (33.3%) hanno sviluppato GvHD acuta grado II-III e 3 pazienti (27.3%) GvHD cronica limitata; 12 pazienti su 15 sono vivi ad un FUP mediano di 33.8 mesi (range 3.0-64.5). La sopravvivenza a 2 anni è dell'80%.

Come emerge anche dai recenti dati della letteratura, il trapianto da cordone da banca potrebbe essere considerato un'opzione di cura nei pazienti con AA refrattari alla prima linea immunosoppressiva che non dispongono di un donatore familiare HLA identico né di un donatore HLA compatibile non familiare. Nonostante l'evidenza sia limitata dall'esiguo numero di studi riportati in età pediatrica (uno solo di fase 2,

altri retrospettivi), le indicazioni più importanti sono: l'uso di un condizionamento a intensità ridotta comprendente fludarabina, una quota cellulare superiore a $4 \times 10^7/\text{Kg}$ e non più di 2 disparità antigeniche su 6.

Trapianto allogenico da donatore aploidentico

Il TCSE da donatore familiare HLA-aploidentico deve essere considerato soprattutto nei bambini che non hanno né un donatore familiare, né un donatore volontario non consanguineo compatibile, e che non hanno risposto al trattamento immunosoppressivo di prima linea, ovvero, ancora, nei pazienti che hanno rigettato un precedente trapianto da donatore volontario non consanguineo (Bacigalupo Blood 2017, Bacigalupo and Sica Semin Hematol 2016).

Negli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi reports relativi a pazienti pediatrici (Bertaina et al. Blood 2014, Fang et al. Pediatr Transplant 2009, Im et al. Biol Blood Marrow Transplant 2013b, Lunet al Biol Blood Marrow Transplant 2018, Wang et al. Am J Hematol 2010, Xu et al. Bone Marrow Transplant 2017, Yang et al. Biol Blood Marrow Transplant 2019, Zhang et al. Am J Ther 2017) e adulti (Clay et al. Biol Blood Marrow Transplant 2014, Dezern et al. Bone Marrow Transplant 2011, Dezern et al. Blood Advances 2020, Esteves et al. Bone Marrow Transplant 2015, Li et al. Bone Marrow Transplan 2017, DeZern et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2017) affetti da AA grave e sottoposti a TCSE da donatore familiare HLA-aploidentico. Spesso, il numero di pazienti riportati in ciascuno di questi studi è limitato e sia il regime di condizionamento sia la profilassi della GVHD impiegati sono eterogenei. Ciononostante, l'EFS media riportata dai diversi studi è superiore al 75%.

Tra gli studi di maggiori dimensioni, Lu et al. hanno pubblicato un'analisi retrospettiva monocentrica analizzando 89 pazienti sottoposti a TCSE da donatore familiare aploidentico ($n = 41$), o da donatore volontario non consanguineo ($n = 48$), dopo il fallimento della terapia immunosoppressiva di prima linea (Lu et al. Biol Blood Marrow Transplant 2018). I risultati ottenuti nei 2 gruppi di pazienti sono stati molto simili, con una sopravvivenza complessiva a 3 anni dell'80.3% vs 89.6% rispettivamente per i trapianti da donatore aploidentico e da MUD, una sopravvivenza libera da malattia del 76.4% vs. 89.4% ed una GVHD-free failure-free survival del 79% vs 71.6% rispettivamente ($P = \text{N.S.}$).

Per quanto riguarda invece il possibile impiego del TCSE da donatore familiare HLA aploidentico come terapia di prima linea, ad oggi sono state pubblicate solo pochissime analisi, prevalentemente di natura retrospettiva. Zhang et al. hanno confrontato, in uno studio retrospettivo monocentrico, 10 pazienti sottoposti a trattamento di prima linea con IST e 18 pazienti sottoposti a TCSE aploidentico in prima linea, dimostrando una sopravvivenza sovrapponibile (70% vs. 67%) (Zhang et al. Am J Ther 2017). Xu et al. hanno descritto 52 pazienti pediatrici sottoposti a TCSE da donatore HLA aploidentico, di cui 23 in prima linea, con una OS dell'84.5% ed una FFS pari all'82.7%, una cGVHD del 34.2% ed un FUP mediano di circa 2 anni (Xu et al. Bone Marrow Transplant 2017). Cheng et al. hanno invece condotto uno studio retrospettivo per valutare se il TCSE aploidentico possa essere utilizzato come prima linea di terapia, confrontando 24 pazienti trattati con IST e 28 che avevano ricevuto un TCSE aploidentico. La sopravvivenza a 10 anni è risultata superiore per i pazienti sottoposti a trapianto (89.3 ± 5.8 vs $73.4 \pm 12.6\%$ - $p = 0.806$), così come la FFS (89.3 ± 5.8 vs $52.6 \pm 10.5\%$, $P = 0.008$) (Cheng et al. Clin Transplant 2018a). Gli autori suggeriscono che il TCSE aploidentico possa essere considerato come trattamento di prima linea, soprattutto in Centri con comprovata esperienza. Un ulteriore studio retrospettivo pediatrico pubblicato da Yang et al. ha confrontato l'outcome di 20 pazienti sottoposti, in prima linea, a TCSE aploidentico T-repleto, con quello di 29 pazienti sottoposti a terapia immunosoppressiva. La sopravvivenza a 3 anni è risultata sovrapponibile per il gruppo TCSE e per il gruppo terapia immunosoppressiva ($85 \pm 8.0\%$ vs. $79.3 \pm 7.5\%$; $P = 0.740$). La FFS a 3 anni è risultata invece migliore per il gruppo TCSE ($80.0 \pm 8.9\%$) rispetto al gruppo terapia immunosoppressiva ($35.9 \pm 10.9\%$; $P = 0.043$) (Yang et al. Biol Blood Marrow Transplant 2019). Uno studio prospettico multicentrico ha confrontato l'outcome di pazienti con

SAA, in cui era fallita l'IST, sottoposti a trapianto aploidentico (101 pz, di cui 48 bambini, età mediana 19 anni) con pazienti sottoposti a trapianto MRD (48, di cui 11 bambini, età mediana 28 anni): l'incidenza di aGvHD di II-IV° grado è stata del 33.7% e 4.2%, rispettivamente; l'incidenza di quella cronica del 22.4% e 6.6%, rispettivamente; l'OS a 3 anni è stata dell'89% vs 91% e la FFS dell'86.8% vs 80.3%, non statisticamente significative (Xu et al. Br J Haematol 2016). Uno studio dell'EMT, pubblicato nel 2020, ha analizzato i dati di 33 pazienti (il 39.4% erano bambini) sottoposti a trapianto aploidentico, il 97% dei quali aveva AA refrattaria: l'incidenza cumulativa di aGvHD di II e III° grado è stata del 23% al giorno + 100 (nessun caso di aGvHD di IV° grado) e quella della cronica del 10% a 2 anni (nessun caso di GvHD cronica estesa); l'OS a 2 anni è stata del 78% e la graft versus host disease free survival a 2 anni del 63%; la mediana dell'età dei pazienti al momento del trapianto era 20.4 anni e del follow up di 35.9 mesi (Prata et al for SAAWP EBMT Bone Marrow Transplant 2020). Gli autori suggeriscono che il TCSE aploidentico in prima linea potrebbe essere più efficace rispetto alla terapia immunosoppressiva per bambini e adolescenti affetti da AA grave. Infine, DeZern et al. hanno pubblicato un recente studio che ha incluso 37 pazienti con un'età media di 25 anni (range 4-65) (Dezern et al. Blood Advances 2020): 17 pazienti sono stati trapiantati in prima linea, e 20 dopo fallimento della terapia immunosoppressiva. Il regime di condizionamento non mieloablato si è basato sulla combinazione di ATG (4.5 mg/kg), Fludarabina (150 mg/m²), CTX (29 mg/kg) e TBI (2 Gy). La sopravvivenza globale a 2 anni dal trapianto è risultata pari al 94% (95% CI, 88-100). L'incidenza cumulativa di GVHD acuta è risultata pari all'11% e quella della GVHD cronica pari all'8%. Nei pazienti trapiantati in prima linea la dose di TBI è stata aumentata da 2 a 4 Gy per prevenire il rigetto del trapianto.

I dati finora disponibili non consentono di formulare forti raccomandazioni riguardanti la scelta del donatore, il miglior regime di condizionamento, la fonte di cellule staminali emopoietiche e la migliore strategia di profilassi GVHD.

- Per quanto riguarda il donatore, alcuni autori suggeriscono l'impiego di un donatore di sesso maschile, mismatched per gli antigeni HLA non ereditati di origine materna (Wang et al. Blood 2014). Altri studi suggeriscono l'importanza dell'allorreattività NK o del DR (Solomon et al. Biol Blood Marrow Transplant 2018). In generale, si ritiene appropriato l'impiego di un donatore giovane, preferibilmente di sesso maschile e compatibile per emogruppo e sierologia per il CMV (Bacigalupo and Giammarco Semin Hematol 2019).
- Relativamente al regime di condizionamento, Xu et al. hanno riportato ottimi risultati con l'impiego di un regime di condizionamento mieloablato (Busulfano 3.2 mg/kg/die per 2 giorni e CTX 50 mg/kg/die per 4 giorni), in una popolazione pediatrica con SAA/VSAA refrattaria che ha ricevuto cellule staminali sia da BM che da sangue periferico, dopo stimolazione con G-CSF (Xu et al. Bone Marrow Transplant 2017). Altri gruppi hanno invece impiegato con successo un condizionamento ad intensità ridotta basato sull'impiego di ATG, Fludarabina (30 mg/m²/die per 5 giorni), CTX a basse dosi (14.5 mg/kg/die per 2 giorni) e TBI (2 – 4 Gy) (Dezern et al. Blood Advances 2020).
- La scelta della fonte di cellule staminali emopoietiche è invece in parte condizionata dalla strategia per la profilassi della GVHD. Sono stati descritti sia trapianti di midollo osseo o di cellule staminali periferiche T-repleti (Cheng et al. Clinical Transplantation 2018b), sia trapianti effettuati dopo procedura di T-deplezione *ex vivo* (Bertaina et al Blood 2014, Im et al Biology of Blood and Marrow Transplantation 2013a). Tuttavia, a causa dell'elevato rischio di rigetto e della maggior maneggevolezza, la scelta di un trapianto T-repleto è stata più frequente, generalmente in associazione con l'impiego di CTX post-TCSE (Dezern et al. Bone Marrow Transplant 2011, Dezern et al. Blood Advances 2020, Esteves et al. Bone Marrow Transplant 2015), oppure di ATG, inibitori della calcineurina, micofenolato e methotrexate (Lu et al. Biol Blood Marrow Transplant 2018, Xu et al. Bone Marrow Transplant 2017). Tuttavia, in caso di T-deplezione *ex vivo* sono state preferibilmente impiegate le cellule staminali da sangue periferico (Bertaina et al. Blood 2014, Im et al. Biol Blood Marrow Transplant 2013b).

- Per quanto riguarda infine la profilassi della GVHD, sono state esplorate sia strategie di T-deplezione *ex vivo* sia strategie di trapianto T-repleto; i risultati mostrano un'efficacia simile e tossicità accettabili di entrambi questi approcci (Bacigalupo Blood 2017, Bacigalupo and Giammarco Semin Hematol 2019, Bertaina et al. Blood 2014, Ciceri et al. Bone Marrow Transplant 2013, Georges and Storb Curr Opin Hematol 2016).

In conclusione, l'ottimizzazione dei regimi di condizionamento, il miglioramento delle strategie di profilassi della GVHD (soprattutto tramite l'adozione della CTX ad alte dosi post-TCSE) hanno condotto ad un significativo miglioramento dei risultati del trapianto aploidentico, soprattutto in termini di riduzione dell'incidenza di GvHD, rigetto e infezioni. Attualmente non sono disponibili studi di elevato livello di evidenza che permettano di collocare nell'algoritmo terapeutico il trapianto aploidentico come opzione alternativa al MUD in prima linea. È in corso un trial prospettico che compara queste due opzioni NCT02833805 in soggetti di nuova diagnosi. Pertanto, al momento nell'attesa dei risultati di tale studio, il TCSE da donatore aploidentico va considerato nei soggetti che falliscono l'IST in prima linea e che non dispongono di un donatore non consanguineo in tempi ragionevoli (2-3 mesi).

Dati i vantaggi del trapianto aploidentico, quali la potenzialmente sicura e, soprattutto, immediata disponibilità del donatore, tale opzione potrebbe realisticamente prospettarsi come prima linea di trattamento nel prossimo futuro, soprattutto per i pazienti con le forme più gravi di malattia, maggior fabbisogno trasfusionale o complicanze infettive in atto.

Per i pazienti privi di un donatore familiare HLA identico e di un donatore non familiare HLA identico (inteso come con al massimo 1 antigene mismatched/10) che non hanno risposto ad un primo ciclo di IST, deve essere considerato il trapianto aploidentico ovvero, ove questo non fosse possibile, il trapianto da cordone da banca.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)

Un eventuale TCSE aploidentico, quale trattamento di prima linea, andrebbe preso in considerazione nel contesto di trials clinici prospettici controllati o, eventualmente dovrebbe essere riservato a pazienti selezionati, con complicanze infettive in atto o con quadri clinici particolarmente gravi.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)

Per i pazienti privi di un donatore non familiare HLA identico (inteso come con al massimo 1 antigene mismatched/10) e che sono refrattari o sono recidivati o non hanno risposto ad un secondo ciclo di IST considerare sempre il TCSE da donatore aploidentico rispetto ad un terzo ciclo di IST.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.9; livello del consensus B)

Preferire un donatore giovane, possibilmente di sesso maschile e compatibile per emogruppo e sierologia per il CMV.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.6; livello del consensus B)

Per il trapianto aploidentico, sulla base delle evidenze disponibili non è possibile fornire raccomandazioni né riguardo il regime di condizionamento né riguardo la fonte di cellule staminali preferibile.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 7.8; livello del consensus C)

7.4 SECONDO TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMPOIETICHE IN SAA

Il rigetto e la graft failure (GF) sono tra le complicanze più gravi per i pazienti pediatrici affetti da aplasia midollare sottoposti a TCSE e il recupero autologo è riportato in solo il 4.2% dei pazienti (Piccin A, BMT 2010). Benché un secondo trapianto sia considerato una procedura ad alto rischio di mortalità, per

complicanze infettive e tossicità d'organo, tale opzione rappresenta un trattamento con probabilità di lunga sopravvivenza > 60-70%.

Nel 2015 Kudo K et al. riportano uno studio retrospettivo, condotto su 55 pazienti di età inferiore a 15 anni, sottoposti a secondo trapianto, registrati nel database del Transplant Registry Unified Management Program (TRUMP) della Società Giapponese di Trapianto di Cellule Ematopoietiche (Kudo K et al. Bone Marrow Transplant 2015). Dopo il secondo trapianto, l'OS a 5 anni è del 82.9% (95% CI 69.7-90.8%) e la FFS dell'81.2% (95% CI 67.8-89.4%). Sia in analisi univariata che multivariate, l'OS e la FFS non sono influenzate dall'età, dal tipo di donatore, dal regime di condizionamento e profilassi della GVHD. Solo l'intervallo > 60 giorni tra il primo ed il secondo trapianto ha migliorato la FFS (88.9% contro 61.4%; P = 0.036). Gli autori suggeriscono l'associazione FLU+MEL+ATG+low-dose TBI quale regime di condizionamento efficace per offrire un attecchimento stabile e buoni risultati in termini di sopravvivenza. Sempre nello stesso anno, Cesaro et al. riportano uno studio EBMT condotto su 162 pazienti, di età mediana 22 anni (range 1.5-64.6), sottoposti a secondo trapianto per mancato attecchimento (graft failure primaria) o rigetto (graft failure secondaria) (Cesaro et al. Br J Haematol 2015). Nel 32% dei casi il donatore era non familiare e nel 68% un familiare, fratello/sorella, HLA compatibile; nell'81% dei casi è stato utilizzato lo stesso donatore del primo trapianto. La sorgente di CSE era prevalentemente sangue periferico (69%) mentre il regime di condizionamento era per lo più non mieloablativo, con mini-TBI nel 20% dei casi, alla dose mediana 3 Gy. La GVHD acuta grado II-IV si è verificata nel 21% dei pazienti, la GVHD cronica nel 37%. Si è osservato un rigetto nel 26% dei pazienti e l'OS a 5 anni è del 60.7%. L'outcome risulta migliore per i pazienti con un buon performance status pre-trapianto (Lansky/Karnofski \geq 80) e non viene influenzato dalla fonte di cellule staminali (midollo osseo contro sangue periferico). Nel 2018 Seu-Ah Yahng et al. riportano uno studio retrospettivo di 24 pazienti adulti, sottoposti a secondo trapianto dallo stesso donatore familiare HLA identico, utilizzando come fonte di cellule staminali il sangue periferico, e come regime di condizionamento TBI 750 cGy e ATG (Seu-Ah Yahng et al. Bone Marrow Transplant 2018). Benché la popolazione in analisi sia rappresentata da pazienti adulti, sono di particolare interesse i risultati di questo studio, che mostrano una OS a 5 anni del 95% (95% CI 87.7-100%) con FFS dell'87.5% (95% CI 75.2-100%) ed incidenza cumulativa di GVHD cronica del 23.5% (95% CI 8.1-43.5%).

In base ai dati pubblicati, si evidenzia che nei pazienti con SAA che presentano un fallimento dell'attecchimento o la perdita dell'attecchimento dopo un primo trapianto, il secondo trapianto rappresenta una procedura efficace. Nei diversi studi, tutti retrospettivi, non emerge il regime di condizionamento ottimale. Tuttavia, la scelta delle CSE da sangue periferico per accelerare l'attecchimento, l'impiego dello stesso donatore, i regimi di condizionamento non mieloablativi "fludarabina based" e low dose di TBI vengono riportati nelle diverse esperienze.

Il secondo trapianto allogenico dallo stesso donatore o da un donatore diverso è opzione valida in caso di non attecchimento o di perdita dell'attecchimento dopo un primo trapianto allogenico.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.2; livello del consensus C)

In caso di mancato attecchimento e in assenza di ricostituzione autologa, qualora si scelga di effettuare un secondo trapianto, è opportuno procedere con urgenza per ridurre il periodo di aplasia e i rischi infettivi.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.6; livello del consensus B)

Nel paziente aplastico, al fine di ridurre la durata dell'aplasia, in caso di secondo trapianto allogenico, la fonte preferibile di cellule staminali è il sangue periferico del donatore dopo stimolazione con G-CSF.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 7.9; livello del consensus D)

L'uso di un condizionamento non mieloablativo, contenente fludarabina e ciclofosfamide a dosi moderate e mini-TBI (2-4 Gy) è raccomandato per ridurre la tossicità correlata a una seconda procedura trapiantologica.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.1; livello del consensus D)

8. FOLLOW-UP

Evoluzione clonale nelle AA

Per ematopoiesi clonale si intende il progressivo ampliamento di un clone cellulare originatosi da una singola cellula staminale o da una cellula progenitrice pluripotente. Il sempre maggior impiego di tecniche genomiche in grado di rilevare mutazioni acquisite in soggetti con AA sta ponendo le basi per una più precisa definizione di questa condizione (che si basa anche sull'esclusione di insufficienze midollari costituzionali), sul ruolo predittivo di tali anomalie nei confronti di una possibile evoluzione verso MDS/LMA, su una possibile azione di terapie come il G-CSF o Eltrombopag nel favorire l'evoluzione clonale e su eventuali indicazioni terapeutiche (es. ricorso o meno al trapianto in caso di comparsa di clonalità). Nello specifico, tali tecniche comprendono la citogenetica classica, i SNP-As (single nucleotide polymorphism array), pannelli NGS (next-generation sequencing), WES (whole exome sequencing) o tipizzazione HLA basata su tecniche NGS. Nell'ambito dei vari marcatori di clonalità riscontrati in soggetti con AA si riconoscono: perdita di eterozigotà (Copy Number-Loss of Function, CN-LOH) prevalentemente a carico del Locus HLA sul braccio corto del cromosoma 6 (6pCN-LOH), acquisizioni di mutazioni somatiche che coinvolgono particolarmente alcuni geni, tra i quali PIGA, ASXL1, BCOR e DNMT3A (Yoshizato T et al. N Engl J Med 2015) e franche alterazioni citogenetiche.

La stretta correlazione iniziale tra AA ed evoluzione clonale risiede in un possibile vantaggio selettivo nei confronti di cellule HPSC le quali, proprio attraverso l'acquisizione di mutazioni, possono sviluppare una resistenza nei confronti dei linfociti autoreattivi o di citochine in grado di generare soppressione midollare. Durante la fase di recupero secondaria alla terapia immunosoppressiva il vantaggio selettivo iniziale di questi cloni nei confronti di linfociti autoreattivi o di citochine in grado di generare soppressione midollare può anche portare all'espansione di tali cloni (Stanley et al. Br J Haematol 2017). Occorre dunque differenziare la oligoclonalità insita nell'esordio e nella emopoiesi di una AA, dove esistono pochi cloni residui attivi, dalla clonalità indicativa di una possibile evoluzione verso MDS/LA. Ovviamente è possibile che le due forme in qualche modo si sovrappongano e che mutazioni associate al rischio di evoluzione "maligna" (è il caso di alcune mutazioni somatiche nonché di alcune alterazioni citogenetiche come la monosomia del cr 7) si verifichino nei cloni emopoietici inizialmente sopravvissuti all'attacco autoimmune. Benché l'acquisizione di mutazioni somatiche incrementi con l'età anche in condizioni fisiologiche, esse sono presenti in più del 60% dei pazienti pediatrici con AA (Babushok DV et al. Blood Advances 2017).

La 6pCN-LOH è stata identificata come variante somatica ricorrente in soggetti affetti da AA, facendo ipotizzare quindi un ruolo di mutazioni a carico dell'HLA di classe I nel generare cloni che resistono all'attacco autoimmune (Immune escape). Un recente lavoro su una corte di 66 soggetti con AA (età mediana alla diagnosi 11.2 anni, range 1.5-65.6), ha evidenziato la perdita di eterozigotà dell'HLA nel 17% dei soggetti, sia per CN-LOH, sia per mutazioni somatiche loss of function a carico dei geni HLA-A e HLA-B. Inoltre, le varianti somatiche riguardavano 4 aplotipi: HLA-A*33:03, HLA-A*68:01, HLA-B*14:02 e HLAB*40:02, con gli ultimi due molto rappresentati nella popolazione AA (Babushok DV et al. Blood Adv 2017). Il sottogruppo con tali aplotipi ha presentato, in modo statisticamente significativo, un decorso clinico peggiore in termini di mortalità patologia-correlata, refrattarietà, ricaduta o necessità di terapie aggiuntive e una maggiore predisposizione a sviluppare anomalie cromosomiche rispetto al sottogruppo senza tali aplotipi; inoltre, 4 pazienti (su 18 valutabili) del primo gruppo hanno presentato un'evoluzione mielodisplastica (nessuna evoluzione nel gruppo di controllo).

La presenza di cloni EPN secondaria a mutazioni somatiche del gene PIGA (phosphatidyl-inositol glycan class A), è descritta fino al 60% circa dei soggetti affetti da AA e può risultare utile nella diagnosi

differenziale tra AA e insufficienze midollari su base genetica dove tali cloni sono virtualmente assenti (Peslak SA et al. *Curr Treat Options Oncol* 2018; Nakao et al. *Int J Hematol* 2006). Essa rappresenta la più frequente acquisizione clonale in pazienti con AA. Il valore prognostico e predittivo della presenza di tali cloni nei confronti della risposta alla terapia immunosoppressiva è stato valutato retrospettivamente in una coorte pediatrica monocentrica relativa a 301 soggetti con AA, età mediana 13 aa (range 5-17), con fenotipo da non grave a molto grave, con una prevalenza globale di cloni EPN pari al 30% (7.6% con cloni > 10%). (Rahman K et al. *Int J Lab Hem* 2018). Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra la presenza di cloni EPN (indipendentemente dall'ampiezza del clone) ed età, sesso o gravità dell'AA. Tre pazienti con clone EPN > 10% avevano presentato segni di emolisi. Inoltre, la presenza di cloni EPN non ha dimostrato alcun valore predittivo di risposta all'IST, confermando precedenti studi (Timeus et al. *PLoS One* 2014). In uno studio italiano monocentrico e nel successivo studio multicentrico, la comparsa e l'espansione di cloni EPN in pazienti pediatrici trattati con IST, precedentemente negativi, è risultata associata allo scalo della CSA o alla recidiva di malattia (Timeus et al. *Br J Haematol* 2010). La sintomatologia clinica, nella forma conclamata di EPN, è caratterizzata da episodi di emolisi, eventi trombotici a carico soprattutto del circolo venoso profondo (sistema venoso profondo addominale, vene epatiche e seni cerebrali) e ripresa della citopenia. Recenti linee guida dell'adulto raccomandano il monitoraggio dei cloni EPN (se non presenti all'esordio) ogni 6 mesi per 2 anni e poi annualmente, ogni 3 mesi se positivi all'esordio (o se compare positività) per i primi 2 anni allungando l'intervallo se stabili (Killick et al. *Br J Haematol* 2016). Benché la ricorrenza di cloni EPN in soggetti sottoposti a TMO sia un evento raro, la loro ricomparsa EPN è tuttavia riportata anche a distanza di tempo, pur in presenza di un chimerismo stabile (Oved et al. *Pediatr Transplant* 2019); tale riscontro suggerisce quindi l'opportunità di valutare la presenza di cloni EPN anche nel post trapianto, in caso di chimerismo misto.

Le più frequenti alterazioni citogenetiche in corso di AA sono quelle del cromosoma 7 (-7/del(7q), la trisomia 8, la trisomia 6, la trisomia 15 e la trisomia 21: meno frequenti sono quelle a carico del cromosoma 5 (del5q) e del 20 (del20q), più tipiche delle neoplasie mieloidi (Stanley et al. *Br J Haematol* 2017). Va inoltre considerato che alterazioni citogenetiche si riscontrano all'esordio in circa 1- 4% dei soggetti affetti da AA e che tale dato è probabilmente sottostimato, data la difficoltà tecnica di eseguire un cariotipo con tecniche convenzionali per la scarsa crescita cellulare legata alla malattia (Maciejewski et al. *Blood* 2002). Il rischio di evoluzione verso MDS/LMA, del quale l'acquisizione di alterazioni cromosomiche strutturali è un possibile marcatore, è stato valutato in diversi studi (Maciejewski et al. *Blood* 2002; Yoshizato et al. *NEJM* 2015) ed è pari al 15% a 5 anni e del 20% a 10 anni. In uno studio retrospettivo esclusivamente pediatrico, il rischio cumulativo di evoluzione verso MDS/LMA è stato pari all'8% a 10 anni (Saracco et al. *Br J Haematol* 2007). Per la sorveglianza di una possibile evoluzione clonale maligna, viene suggerita una valutazione seriata del cariotipo su midollo dopo IST a 6 e 12 mesi dal termine del trattamento e poi annualmente per almeno 5 anni (in seguito, con intervalli più lunghi, se conte periferiche stabili e non comparsa di alterazioni strutturali al cariotipo); in caso di peggioramento delle conte periferiche, durante o successivamente al trattamento (Maciejewski et al. *Blood* 2002; Scheinberg P et al. *Blood* 2012), i controlli andranno fatti in modo più ravvicinato. In merito poi al significato prognostico relativamente al tipo di alterazione cromosomica riscontrata, la comparsa di monosomia 7 a 6 mesi dal trattamento si è confermata predittiva di ridotta sopravvivenza ed evoluzione verso MDS, con forte indicazione a valutare per un TMO (Yoshizato et al. *NEJM* 2015, Scheinberg et al. *Blood* 2012). Un recente studio retrospettivo su una popolazione esclusivamente pediatrica (314 soggetti) sottoposta a IST ha dimostrato una sopravvivenza globale pari al 93% a 5 anni ma una sopravvivenza libera da eventi senza ulteriori trattamenti del 64%; il 7% dei soggetti aveva acquisito anomalie citogenetiche dopo la diagnosi con un intervallo mediano di 25 mesi (range 4.3-71) e un'evoluzione verso MDS/LM pari a 1.9% (6 pazienti) (Rogers et al. *Haematologica* 2019). Nello stesso studio, il trapianto di cellule staminali ematopoietiche, nei casi refrattari o ricaduti, ha dimostrato un EFS migliore rispetto a trattamenti di seconda linea ($p=0.003$). La lunghezza dei telomeri non si è dimostrata invece correlata alla prognosi.

Per quanto concerne la relazione tra stimolatori della emopoiesi midollare (G-CSF ed Eltrombopag) e l'insorgenza di clonalità, essa non è stata confermata per il G-CSF in uno studio prospettico, randomizzato (ATG + CsA vs ATG+CsA + G-CSF) con un periodo di osservazione mediano di 11.7 anni, nel quale gli eventi clonali e l'evoluzione verso MDS/LMA sono risultati sovrapponibili nei due bracci (Tichelli A et al. Haematologica 2020); per l'Eltrombopag, un recente studio longitudinale di coorte pediatrica non ha evidenziato fibrosi o comparsa di clonalità (tempo di osservazione fino a 36 mesi) (Filippidou et al. Br J Haematol 2020).

I pazienti con AA, specie se trattati con IST, devono dunque essere sottoposti a controlli clinici ed ematologici periodici, al fine di monitorare il rischio di evoluzione clonale maligna nonché il manifestarsi di effetti tossici a medio e lungo termine, legati al trattamento. Riguardo all'evoluzione clonale maligna va però ricordato anche che il rischio di tumore secondario soprattutto nei pazienti trattati con IST, tende ad aumentare negli anni, pertanto il paziente aplastico va monitorato per tutta la vita. Concludendo, appare necessario che i pazienti con AA, specie se trattati con IST, vengano inseriti in un programma di FUP multidisciplinare che preveda la valutazione ematologica, la sorveglianza oncologica, la prevenzione primaria del rischio vascolare ed il monitoraggio degli effetti tossici a distanza. Tale programma di FUP e screening dovrà accompagnare il paziente per tutta la vita, pertanto i controlli andranno concordati con il pediatra di libera scelta prima e con i medici di medicina generale poi.

Nei pazienti con AA responsivi all'IST si raccomanda l'esecuzione di una biopsia ossea con cariotipo (citogenetica classica o FISH o array) a 6 e 12 mesi dall'inizio dell'IST e poi 1 volta all'anno per 5 anni dopo aver ottenuto una risposta stabile; dopo i primi cinque anni l'intervallo può essere prolungato se conte periferiche stabili e non comparsa di alterazioni strutturali al cariotipo.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.2; livello del consensus C)

Si raccomanda il monitoraggio dei cloni PNH, tramite test citofluorimetrico, ogni sei mesi (se negativi all'esordio) per 2 anni e poi annualmente; ogni 3 mesi (se positivi all'esordio o se compare positività) per i primi 2 anni, allungando l'intervallo se stabili.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

La ricorrenza di cloni EPN è un evento raro, e la ricomparsa di cloni EPN in soggetti sottoposti a TMO è riportata anche a distanza, pur in presenza di un chimerismo stabile. Si raccomanda di valutare la presenza di cloni EPN anche nel post trapianto, in caso di chimerismo misto ed in caso di ricomparsa di testare i parametri di emolisi.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

Secondi tumori nella AA

La possibilità di sviluppare un tumore a distanza dal trattamento dell'AA è correlata sia all'uso di farmaci immunosoppressivi nei pazienti trattati con IST che alla terapia di condizionamento o alla TBI, quando usata, in coloro che vengono sottoposti a HSCT.

Nel lavoro di Socié del 1993 viene riportata un'incidenza cumulativa, per tutti i tipi di tumore, del 18.8% nei pazienti sottoposti ad IST e del 3.1% nei pazienti trapiantati. L'incidenza cumulativa dei soli tumori solidi risultava rispettivamente del 2.2% nei pazienti trattati con IST e del 2.9% in quelli trapiantati (Socié G et al. New Engl J Med 1993).

I tumori di più frequente riscontro sono risultati i carcinomi squamocellulari del distretto testa-collo, notoriamente correlati all'immunodepressione da farmaci, a seguire adenocarcinomi dello stomaco, epatocarcinomi e tumori del seno. Due fattori risultavano significativamente associati ad un aumento del rischio di sviluppare un tumore solido nei pazienti trapiantati ovvero l'età alla diagnosi, con un aumento del rischio all'aumentare dell'età e l'impiego di regimi di condizionamento basati sulla TBI.

Il rischio di tumore secondario tende ad aumentare negli anni: in un recente studio EBMT su più di 500 adolescenti l'incidenza di secondi tumori è del 7% a 5 anni e 21% a 7 anni (Dufour et al. Haematologica 2014).

8.1 FOLLOW UP NEI PAZIENTI TRATTATI CON TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA

Recidiva

Non vi è consenso sulla definizione di recidiva. Pragmaticamente si può definire recidiva la condizione che si verifica quando, dopo una risposta completa o parziale, sia necessario reintrodurre il trattamento immunosoppressivo a causa della riduzione dei valori ematologici tale da richiedere, ma non sempre, la ripresa del supporto trasfusionale. Naturalmente non è sufficiente un unico riscontro laboratoristico ma la persistente tendenza al peggioramento della crasi ematica. Viene descritta una maggior incidenza di recidive nei pazienti con risposta precoce e in quelli con maggior intervallo tra diagnosi ed inizio del trattamento (Schrezenmeier H, BJ of Haematology 1993). La ricaduta può avvenire anche allo scalo della CSA, dopo infezioni virali e durante la gravidanza (Meletis Haematologica 1998) a causa del trigger immunogeno.

Nella maggior parte dei casi la recidiva ematologica avviene entro 1-4 anni dall'esordio (Scheinberg P BJ of Haematology 2009, Lan Y et al. Ann Hematol 2021, Zora R Rogers et al. Haematologia 2019).

Su 43 pazienti (adulti e bambini) trattati con ATG e CsA con un FUP di 11 anni la recidiva veniva registrata nel 45% dei casi (da 2 a 49 mesi dopo l'avvio dello scalo della CSA), e la dipendenza da CsA era presente nel 14% dei casi (Frickhofen N Blood 2003).

L'analisi retrospettiva di 42 casi pediatrici trattati con IST (nella quasi totalità ATG/CsA/G-CSF) ha mostrato una percentuale di recidiva del 16% a 10 anni ed una correlazione tra recidiva e rapidità con cui era stata scalata la CsA (60% di recidive nei pazienti sottoposti a rapido scalo di CsA, pari a 0.8 mg/kg/mese) (Saracco P Br J Haematol 2008).

Uno studio multicentrico pediatrico (Kamio T Haematologia 2011) riporta un'incidenza di recidiva del 16% in 264 pazienti responsivi a IST standard con maggiore incidenza nelle forme NSAA rispetto alle SAA e VSAA. Il fattore significativamente correlato al rischio di recidiva è risultato l'uso di androgeni (danazolo). Gli autori ipotizzano che alcune forme costituzionali misconosciute e responsive all'androgeno abbiano presentato una ricaduta dopo la sospensione del farmaco.

Uno studio retrospettivo su 172 pazienti (età mediana 5 anni, range 1-14 anni) con nuova diagnosi di SAA riporta tasso di remissione a sei mesi del 61% e una incidenza cumulativa di recidive del 5.8% con un FUP mediano di 49 mesi (40-98 mesi) (Lan Y Ann Hematol 2021).

Si ritiene che anche le vaccinazioni possano costituire un trigger immunogeno in grado di determinare l'insorgenza o la recidiva di una AA; nonostante in letteratura siano segnalati soltanto casi aneddotici (Hendry CL Br J Haematol 2002, Shah C Am J Hematol 2004; Donnini I Ann Hematol 2012, Angelini P Pediatric Infect Dis 2009), alcune Società Scientifiche sulla base di tali segnalazioni si sono espresse contro la vaccinazione dei pazienti trattati con IST per AA (Killick SB Br J Haematol 2016) (vedi paragrafo 9.6). Caitlin R et al. hanno recentemente descritto una recidiva di AA dopo vaccinazione antipneumococcica ed antiinfluenzale anche in un paziente sottoposto a trapianto di midollo sei mesi prima.

Nelle ragazze in età fertile un evento che può indurre la recidiva è la gravidanza. In uno studio retrospettivo (Tichelli Ann Intern Med 2002) la recidiva di malattia è stata osservata nel 18% delle donne in remissione completa prima della gravidanza, nel 19% delle donne in remissione parziale e nel 25% delle donne con PNH.

Esistono poi diversi fattori che correlano con il rischio di recidiva, tra questi la cellularità periferica ma non quella midollare; pertanto, un programma di sorveglianza della risposta ematologica e della recidiva non può prescindere dal controllo periodico dell'emocromo e della conta reticolocitaria.

In uno studio prospettico monocentrico è stato dimostrato che la valutazione periodica, mediante analisi citofluorimetrica, del numero assoluto e del grado di apoptosi delle cellule CD34+ circolanti (Timeus F Exp Hematol. 2005) è un test valido per il monitoraggio della risposta al trattamento; infatti, è stata osservata una riduzione dell'apoptosi delle cellule C34+ circolanti nei pazienti responsivi e un nuovo incremento in caso di recidiva o sviluppo di dipendenza da CsA (Timeus F Br J Haematol 2010). Anche la misurazione della lunghezza dei telomeri dei leucociti nel sangue periferico potrebbe costituire un valido strumento predittivo sia di recidiva che di evoluzione clonale. Scheinberg et al. (Scheinberg P JAMA 2010, Scheinberg P Int J Hematol 2013) hanno dimostrato che la lunghezza ridotta dei telomeri pretrattamento, insieme ad un ridotto numero di reticolociti si associa ad un rischio aumentato di 2 volte di avere una recidiva. Tuttavia, un recente studio retrospettivo condotto dal North American Pediatric Aplastic Anemia Consortium (NAPAAC) non ha confermato la presenza di una correlazione tra il tasso di risposta al trattamento, la lunghezza dei telomeri, la presenza di un clone EPN o la macrocitosi dell'emazie all'esordio (Zora R Haematologia 2019). Probabilmente altri studi saranno necessari prima che il test di misurazione della lunghezza dei telomeri possa, in futuro, essere utilizzato non solo in fase diagnostica ma anche durante il follow-up per valutare la potenziale durata della risposta ematologica ed il rischio di recidiva.

Altri markers biologici o altri indicatori potrebbero emergere dalla valutazione globale della risposta immunitaria e da misurazioni più accurate della riserva e della funzionalità delle cellule staminali. (Narita A, Kojima S Int J Hematol. 2016).

Esami per la valutazione della recidiva

Emocromo con reticolociti, aspirato midollare, BOM, cariotipo, ricerca cloni PNH.

Trattamento della recidiva

La recidiva, se si verifica durante il tapering della CSA, va inizialmente trattata con la reintroduzione della CSA o l'aumento della dose allo scopo di tornare al dosaggio terapeutico (5 mg/Kg/die) per 2-3 mesi; in caso di risposta si prosegue la CSA sino alla stabilizzazione ematologica, con successivo lento e graduale tapering mantenendo la dose minima efficace necessaria per garantire una adeguata crasi ematica. Se non si ottiene risposta con la sola CSA o se la recidiva consiste nella ripresa di grave citopenia è necessario, se vi è disponibilità, avviare il paziente a trapianto nel più breve tempo possibile (Kosaka Y Blood 2008; Dufour C Br J Hematol 2015; Dufour C Hematologia 2014).

Per i pazienti che non dispongono di un donatore HLA identico non familiare le opzioni terapeutiche possono essere un trapianto da donatore alternativo (donatore aploidentico familiare, sangue da cordone ombelicale) o un secondo ciclo di IST (Peffault de Latour R Blood 2018; Bacigalupo A Blood 2016; Dufour C Expert Review of Hematology 2019; Bacigalupo A Semin Hematol 2019; Xu LP Bone Marrow Transplant 2017)

Se la ricaduta si manifesta con un lento decremento dei valori ematologici va inizialmente trattata con la reintroduzione o l'aumento della dose di CSA per os a dosaggio terapeutico (5 mg/Kg/die) per 2-3 mesi; in caso di risposta si prosegue la CSA a dosaggio terapeutico sino alla stabilizzazione ematologica; seguirà un lento e graduale tapering, utilizzando la dose minima efficace al fine di mantenere conteggi ematologici adeguati. Il tapering andrà stoppato se i valori scendono di nuovo.

(Livello di evidenza II; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)

In caso di ricaduta caratterizzata dalla comparsa di una grave pancitopenia è necessario avviare il paziente a trapianto di midollo, anche alternativo, o in subordine ripetere un secondo ciclo di IST (non esiste una chiara evidenza se sia più adeguato ripetere ATG di cavallo o eventualmente utilizzare ATG di coniglio).

(Livello di evidenza, III; Forza del consensus 8.0; livello del consensus D)

8.2 FOLLOW UP NEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

Rigetto e recidiva

Nei pazienti con AA sottoposti a trapianto di CSE il programma di sorveglianza deve tener conto anche del rischio di rigetto, che nei 2 studi dell'EBMT è del 2% nei bambini sottoposti a trapianto MRD (Dufour et al. Br J Haematol. 2015) e dell'8% negli adolescenti (tra i 12 e i 18 anni) (Dufour et al. Haematologica 2014).

Il rigetto di trapianto allogenico di CSE non seguito da ricostituzione ematologica autologa è stato osservato in percentuali variabili a seconda degli studi. Da un'analisi retrospettiva su 1.205 allotrapianti è emerso che il rigetto si è verificato con prognosi sfavorevole nell'11.2% dei casi (Piccin A et al. Bone Marrow Transplant 2010), mentre in un 4.2% dei casi al rigetto del trapianto ha fatto seguito la ricostituzione ematologica autologa, con prognosi buona e possibile risposta a successiva IST. La presenza di chimerismo instabile progressivo è stata riscontrata nel 15% di 91 pazienti allotrapiantati, da 2 a 32 mesi dal trapianto, e in questo gruppo di pazienti vi era stato rigetto del trapianto nel 50% dei casi (Lawler M et al. Br J Haematol 2009). La presenza di chimerismo instabile progressivo (già dopo il primo mese dal trapianto) è stato correlato ad un rischio di rigetto del 50% e la somministrazione di linfociti da donatore ha arrestato il processo e possibilmente prevenuto il rigetto in due successivi pazienti in cui l'evento era stato riscontrato (Hoelle W et al. Bone Marrow Transplant 2004).

Si può assistere ad una perdita della risposta anche dopo i 5 anni di osservazione (Dufour C et al. Bone Marrow Transplant 1999, Eapen M et al. Br J Haematol 1999).

Come per tutti i soggetti trapiantati è importante il monitoraggio delle complicanze a medio e lungo termine legate alla procedura trapiantologica.

Si raccomanda il monitoraggio del chimerismo, dopo HSCT in pazienti con AA, una volta al mese durante il primo anno dal trapianto; ogni tre mesi nel secondo anno; ogni dodici mesi dal terzo anno in poi.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)

8.3 IL FOLLOW UP DELLA AA NON SEVERA (NSAA)

Le forme non severe (NSAA) possono mantenersi stabili, evolvere o risolversi spontaneamente. Il FUP della NSAA ha lo scopo di monitorare una malattia pauci o asintomatica per cogliere eventuali modificazioni (evoluzione in SAA, AML, PNH). Inoltre, laddove viene scelta una opzione terapeutica della NSAA (derivati degli androgeni, Eltrombopag, CSA ecc), in luogo della semplice osservazione, il FUP prevede anche monitoraggio degli effetti collaterali a lungo termine del trattamento.

I diversi lavori che descrivono la evoluzione della NSAA non sono spesso omogenei per criteri classificativi, per presenza o meno di trattamento farmacologico e per la limitatezza di casistiche specificamente pediatriche (Hartung HD Pediatr Clin North Am 2013; Marsh JC Br J Haematol 2009; Killick SB Br J Haematol 2016).

Il FUP permette di definire le forme transitorie (risoluzione spontanea entro 6 settimane) dalle forme non transitorie o NSAA propriamente dette, di cui trattiamo ora.

Uno studio recente in una popolazione NSAA di 88 bambini e adulti (età mediana 43 anni, range 6-88 anni) in un periodo di osservazione mediano di 49 mesi (range 1-278 mesi) ha mostrato evoluzione da NSAA a forme severe (SAA) nel 16% dei casi, evoluzione a PNH nell'11% dei casi e a AML nell'1% dei casi. La

mortalità della popolazione NSAA era simile a quella SAA. Il tempo mediano di progressione da NSAA a SAA era di 41 mesi (Patel BJ Br J Haematol 2020). Tuttavia, studi specificamente pediatrici evidenziano differenti probabilità e modalità di progressione della malattia. Lo studio più ampio pubblicato (284 pazienti NSAA trasfusione indipendente, età mediana 9 anni, range 1-18 anni) identificava come criterio di AA cellularità midollare < 50%, ANC < 1500/mmc, ARC < 40.000/mmc, PLT < 100.000/mmc. Il limite maggiore dello studio è che non considera la storia naturale della NSAA: tutti i casi erano trattati con CsA e/o stanazolo. In questa casistica il 69% si manteneva in NSAA trasfusione indipendente, il 17% andava verso risoluzione completa (mediana 13.5 mesi range 3-115 mesi), il 13% andava in progressione a trasfusione-dipendenza (mediana 38 mesi, range 2-196 mesi), con il 9% che progrediva in SAA (mediana 26.5 mesi range: 5-135 mesi). Nessun caso di AML o PNH. La progression free survival (intesa come assenza di progressione verso trasfusione-dipendenza) a 60 mesi era 86% (\pm 2.7%) (Wang S Int J Hematol 2013).-In questo studio gli stessi autori sospettano che la bassa incidenza di progressioni sia dovuta al trattamento farmacologico.

Due studi, con casistiche più limitate, si concentrano sulla storia naturale della NSAA. Il primo è uno studio del St. Jude su 24 casi NSAA (età mediana 8 anni, range 2-18 anni). I criteri per identificare la NSAA erano i medesimi del precedente. Il 67% dei casi andava in progressione a SAA (mediana 9,5 mesi, range 2-290 mesi), il 21% rimaneva "persistent NSAA" (mediana 32 mesi range 25-118 mesi), il 12% andava a completa remissione (mediana 7 mesi range 2-11 mesi). La progression free survival a 3 anni era 43% (\pm 24%). Non era segnalata una peggior prognosi dei casi progrediti a SAA e poi trattati rispetto ai casi SAA trattati all'esordio. Inoltre, vi erano stati 1 caso di AML in NSAA persistente a 23 anni dalla diagnosi e 2 casi di PNH a 1 e 8 anni dalla diagnosi (Howard SC Pediatr Blood Cancer 2004). Il secondo studio è su 22 casi NSAA (età 3-15 anni). In questo caso i criteri diagnostici sono diversi per ANC < 2500/mmc e PLT < 120.000/mmc. Il 45% dei casi manteneva la trasfusione indipendenza (mediana del FUP 35.5 mesi, range 11-105 mesi) e il 55% andava in progressione a trasfusione-dipendenza (mediana 51.5 mesi, range 9-175 mesi). Progression free survival (intesa come assenza di progressione alla trasfusione dipendenza) a 60 mesi: 62 \pm 12% (Nishio N. Int J Hematol. 2009)

Non è possibile definire un tempo-limite nella probabilità di progressione della NSAA. I FUP riportati registrano mediane di progressione a trasfusione dipendenza o a SAA da 9 a 51 mesi con range da 2 mesi a 290 mesi (24 anni) dalla diagnosi. Le due casistiche di "natural history" di NSAA (Howard SC Pediatr Blood Cancer 2004; Nishio N Int J Hematol 2009) riportano una progression free survival variabile pari al 43% a 3 anni e al 60% a 5 anni (22% a 10 anni) rispettivamente. Le casistiche sono troppo esigue per avere dati certi. Le forme che regrediscono spontaneamente hanno un timing più precoce, con mediane di 7 e 13 mesi (range da 2 a 115 mesi). Il FUP delle NSAA deve quindi contemplare anche l'informazione al paziente sulla necessità di proseguire i controlli anche in caso di trasferimento e di transizione all'età adulta. Visto il lungo periodo di FUP tra le possibili cause di recidiva o di progressione va ricordata anche la gravidanza (vedi paragrafo 8.7).

Riguardo i fattori prognostici di progressione Howard e coll e Nishio e coll (Howard SC Pediatr Blood Cancer 2004; Nishio N Int J Hematol 2009) ritenevano non significativi per la progressione il sesso, e i dati alla diagnosi di età, ANC, PLT, ARC, Hb, MCV. Wang e coll invece ritengono significativi, per la progressione da trasfusione indipendenza a trasfusione-dipendenza e da NSAA a SAA, i parametri ematologici all'esordio: ARC < 60.000/mmc e ANC < 1000/mmc (Wang S Int J Hematol 2013). Brock e coll ritengono che la bi o tricitopenia rispetto alla monocitopenia sia un fattore favorente la progressione (Brock K J Pediatr Hematol Oncol 2013)

Non è possibile indicare un protocollo della frequenza dei controlli, anche quelli di sorveglianza di evoluzione clonale, che devono essere valutati sulla base del paziente, della stabilità dei parametri ematochimici e della clinica.

La letteratura è discorde sul trattamento delle forme NSAA, con una propensione per la sola osservazione. Altri autori suggeriscono l'uso di terapia (IST o alternativa) (Wang S Int J Hematol 2013; Brock K J Pediatr Hematol Oncol 2013). Le terapie alternative (per es CSA, androgeni o eltrombopag) e i loro effetti collaterali vanno considerati nel FUP delle forme NSAA in trattamento.

In considerazione del potenzialmente lungo FUP delle forme NSAA è consigliato valutare i pazienti per profilassi contro pneumocystis Jirovecii con cotrimoxazolo per os o pentamidina per aerosol in presenza di valori di CD4+ < 400/mmc o di linfociti < 1000/mmc.

Osservazioni aneddotiche hanno sospettato il ruolo di fattore scatenante di progressione o di recidiva in AA delle vaccinazioni (vedi paragrafo 8.6) per tale motivo vengono sconsigliate le vaccinazioni (anche antiinfluenzale negli adulti) nei soggetti SAA trattati con IST (Killick SB. Br J Haematol. 2016).

Il follow up di NSAA dura tutta la vita o fino a progressione (SAA, forme trasfusione dipendenti).

(Livello di evidenza IV, EO; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)

Il follow up delle forme a regressione spontanea dopo remissione dovrebbe essere prolungato per la possibilità sporadica di recidive per almeno 3 anni.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.7; livello del consensus B)

Il rischio di evoluzione clonale è possibile anche nelle NSAA per cui è opportuno prevedere l'esecuzione periodica di una biopsia ossea con cariotipo (citogenetica classica o FISH o array): sulla base dei dati disponibili non è possibile indicare la frequenza delle rivalutazioni.

(Livello di evidenza IV, EO; Forza del consensus 8.0; livello del consensus C)

In linea di principio e sulla base dei dati disponibili, le vaccinazioni non sono sconsigliate per timore degli effetti collaterali. Nei pazienti pediatrici NSAA in follow up, l'indicazione alla vaccinazione deve valutare il potenziale rapporto rischio-beneficio in rapporto all'epidemiologia, morbilità e mortalità di malattie prevenibili con la vaccinazione e allo stato immunologico del paziente.

(Livello di evidenza IV, EO; Forza del consensus 7.9; livello del consensus C)

9. TERAPIA DI SUPPORTO

9.1 TRASFUSIONE DI EMOCOMPONENTI

Premessa

Il supporto trasfusionale è parte integrante della cura del paziente con AA e ha l'obiettivo di garantire una crasi ematica al di sopra dei livelli di sicurezza, mitigare i sintomi conseguenti alla pancitopenia, e migliorare nel complesso la qualità di vita dei pazienti. Il timore dei possibili effetti collaterali/complicazioni non deve ostacolare il supporto trasfusionale che va assicurato in base alle esigenze cliniche (Killick et al. Br J Haematol 2016).

Leucodeplezione

La leucodeplezione mediante appositi filtri elimina i leucociti presenti nel concentrato eritrocitario o piastrinico. Scopo della leucodeplezione è:

1. Ridurre l'incidenza di alloimmunizzazione, evento frequente nei pazienti con AA (Killick et al. British Journal of Haematology 1997; Laundry et al. Transfusion 2004), che si può realizzare come conseguenza all'esposizione di antigeni presenti sui leucociti ovvero di antigeni che possono esercitare la loro azione sensibilizzante solo in presenza dei leucociti. L'alloimmunizzazione può essere alla base della refrattarietà alle trasfusioni di concentrati piastrinici, cioè la mancanza di

incremento della conta piastrinica in seguito alla trasfusione, e può anche aumentare il rischio di rigetto (Kaminsky et al. British Journal of Haematology 1990). Effettivamente ci sono evidenze che l'uso della leucodeplezione abbia ridotto il fenomeno e l'incidenza sia dell'alloimmunizzazione che della refrattarietà alle trasfusioni di piastrine (Killick et al. British Journal of Haematology 1997; The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997; Vamvakas, Transfus Med Rev 1998), anche se dati specifici sull'AA non sono disponibili.

2. Prevenire la GVHD post-trasfusionale: sono stati segnalati 13 casi in UK tra il 1996 e il 2005 e di questi 11 si sono verificati dopo trasfusioni di prodotti non leucodepleti; inoltre, dal 2000, dopo l'introduzione della leucodeplezione in UK, non sono stati più riportati casi di GVHD post-trasfusionale (Vamvakas, Transfus Med Rev 1998).
3. Prevenire la trasmissione di CMV (SHOT Annual report 2006; Pamphilon et al. Transfusion Medicine 1999): ci sono evidenze che dimostrano che la leucodeplezione diminuisca di più del 90% la possibilità di trasmissione del CMV (Bilgin et al. Neth J Med 2011); tuttavia i dati disponibili ad oggi indicano che la leucodeplezione non elimina totalmente la trasmissione del CMV (Vamvakas, Transfus Med Rev 2005) e che la selezione del donatore (CMV negativo per il paziente CMV negativo), è più efficace (Bilgin et al. Neth J Med 2011).

I concentrati eritrocitari e piastrinici devono essere leucodepleti mediante filtri.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 9; livello del consensus A)

Irradiazione

Il razionale di utilizzare emoderivati irradiati nei pazienti con AA è di:

1. prevenire la GVHD post-trasfusionale, una rara, ma grave complicazione conseguente all'azione dei linfociti reattivi del donatore sul soggetto ricevente immunodepresso. (Treleaven et al. British Journal of Haematology 2011)
2. ridurre l'alloimmunizzazione che si verifica frequentemente in AA (Killik et al, British Journal of Haematology 1997; Laundry et al. Transfusion 2004): si sono infatti evidenze che l'irradiazione di GRC e PLT prima di una procedura di HSCT riduce il rischio di sensibilizzazione verso antigeni minori di istocompatibilità e di rigetto nei cani (Bean et al. Transplantation 1994).

L'indicazione all'irradiazione degli emoderivati è consolidata in alcune categorie di pazienti ematologici (HSCT, immunodeficienze congenite, linfoma di Hodgkin, trattamento con analoghi purinici tipo fludarabina, clofarabina etc) ed è meno codificata nei pazienti con linfoma non-Hodgkin, in trattamento con ATG e alemtuzumab (Treleaven et al. British Journal of Haematology 2011).

Pertanto, nei pazienti con AA si pone l'indicazione all'irradiazione degli emocomponenti cellulari nei pazienti sottoposti a HSCT, nei pazienti candidati a HSCT, nei pazienti in trattamento con alemtuzumab (Killick et al. Br J Haematol 2016, Treleaven et al. British Journal of Haematology 2011); è ragionevole estendere l'indicazione anche ai pazienti sottoposti a IST, tanto più se si somministra siero antilinfocitario di coniglio, in grado di indurre una immunodepressione più profonda del siero di cavallo.

I concentrati cellulari preparati per i pazienti con Anemia Aplastica sottoposti o candidati a HSCT e sottoposti a IST devono essere irradiati.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 9; livello del consensus A)

Tale necessità andrebbe protratta fino a quando il paziente è immunodepresso (Killick et al. Br J Haematol 2016, Treleaven et al. British Journal of Haematology 2011; Marsh et al. Br J Haematol 2010).

L'irradiazione degli emoderivati cellulari è indicata fino a quando il paziente è immunodepresso, cioè fino a quando i linfociti sono < 1.500/mmc (ovvero 1.000/mmc) o fino a quando assume ciclosporina o altro immunosoppressore.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.7; livello del consensus B)

Prevenzione della trasmissione di infezione da CMV

La leucodeplezione, seppur efficace nel ridurre il rischio di trasmissione di CMV, non elimina totalmente la trasmissione del CMV (Vamvakas, Transfus Med Rev 2005) e la selezione del donatore (CMV negativo per i pazienti CMV negativo), è più efficace (Vamvakas, Transfus Med Rev 1998).

Tutti gli emoderivati destinati a pazienti CMV-negativi candidati a HSCT dovrebbero essere CMV-negativi.

(Livello di evidenza V; Forza del consensus 8.3; livello del consensus C)

In assenza di disponibilità di emoderivati CMV-negativi, una valida alternativa è costituita da emocomponenti in cui la leucodeplezione venga eseguita con filtri prestorage.

(Livello di evidenza V; Forza del consensus 8.7; livello del consensus B)

Indicazioni alla trasfusione di GRC

In letteratura sono riportati dei criteri variabili come “soglia” per la trasfusione di GRC: Hb < 8 g/dl (Marsh et al. Br J Haematol 2009); Hb < 8.5 g/dl (Di Bona et al. British Journal of Haematology 1999); anemia sintomatica o Hb < 9 g/dl in pz con malattia cardio-polmonare (Atta et al, Ann Hematol 2010); mantenere Ht > 25% (Brodsky et al. Experimental Hematology 2004); le più recenti Linee guida britanniche per il paziente adulto non specificano una soglia (Killick et al. Br J Haematol 2016).

L’indicazione alla trasfusione di GRC viene posta dal medico curante secondo le condizioni del singolo paziente e le diverse variabili che solitamente vengono considerate (comorbidità, fase di aplasia, previsione di evoluzione clinica etc): In linea molto generale, i criteri per la trasfusione di GRC sono:

- anemia con Hb < 8 g/dl nel paziente asintomatico
- anemia sintomatica (senza soglia).

Il rischio di alloimmunizzazione per i pazienti con AA è descritto con prevalenze variabili dal 2.3 al 17.1% (Moncharmont et al. Vox Sang. 2019; Cohen et al. Transfusion 2016); l’incidenza sembra più bassa che per pazienti politrasfusi per altre patologie, forse in relazione ad un minore carico trasfusionale, o alla concomitante terapia immunosoppressiva (Cohen et al. Transfusion 2016); pertanto, seppure al momento, non ci sia indicazione per uno screening di gruppo sanguigno esteso, è consigliabile utilizzare unità di GRC isogruppo per Rh e Kell (Killick et al. Br J Haematol 2016).

È raccomandato utilizzare unità di GRC compatibili anche per Rh e Kell.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.6; livello del consensus B)

Indicazioni alla trasfusione di concentrato piastrinico

Non è possibile, sulla base dei dati disponibili, stabilire se è più opportuna una strategia “profilattica” di trasfusione nei pazienti asintomatici solo sulla base del valore piastrinico, oppure una strategia “terapeutica” volta a trasfondere i pazienti con sintomi emorragici in atto. I pochi dati disponibili non sono di univoca interpretazione e si riferiscono comunque a pazienti adulti con altre patologie ematologiche (Wandt et al. Lancet 2012). In letteratura sono riportati dei criteri variabili come “soglia” per la trasfusione di concentrato piastrinico, nessuno dei quali selezionato in base ad evidenze di elevato valore statistico.

Le linee guida britanniche per i pazienti adulti con AA raccomandano l’uso profilattico delle trasfusioni piastriniche nei pazienti in trattamento, utilizzando la soglia di 10.000/mmc PLT; tale soglia viene innalzata a 20.000/mmc se ci sono criteri di rischio aggiuntivi, quale sepsi e/o febbre (Killick et al. Br J Haematol 2016). Viceversa, la trasfusione profilattica di piastrine non è raccomandata da altri studi nei pazienti clinicamente stabili che non fanno trattamento (Killick et al. Br J Haematol 2016). Pertanto, l’indicazione

alla trasfusione di concentrato piastrinico deve esser posta posta tenendo conto delle condizioni del singolo paziente e delle diverse variabili: comorbidità, fase di aplasia, previsione di evoluzione clinica.

I criteri per la trasfusione di PLT più utilizzati sono: paziente con emorragie in atto senza riferimento ad un valore soglia e a scopo profilattico nel paziente senza sintomi emorragici con PLT < 10.000/mmc se non ha febbre e con PLT < 20.000 se febbrile/settico.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

Fonte del concentrato piastrinico

Il concentrato piastrinico da unico donatore ottenuto mediante piastrinoafèresi assicura una resa, in termini di conta piastrinica, superiore rispetto ai concentrati ottenuti da pool di sangue intero, anche se non ci sono evidenze che questo assicuri una efficacia superiore sul piano clinico (Heddle et al. Transfusion 2008).

La compatibilità ABO, di solito preferita per prevenire fenomeni emolitici, sembra anche assicurare una maggiore resa in termini di incremento della conta piastrinica e un minor rischio di insorgenza di refrattarietà (Shehata et al. Transfusion 2009).

Il concentrato piastrinico da unico donatore ottenuto mediante piastrino-afèresi è da preferire ai concentrati random ottenuti da pool di buffy coat, allo scopo di ottenere una “resa” trasfusionale migliore limitando al minimo l’esposizione ai donatori.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.6; livello del consensus B)

È preferibile che il concentrato piastrinico sia AB0 compatibile per prevenire l’emolisi, aumentare la resa e diminuire l’incidenza di refrattarietà.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)

L’uso regolare di trasfusioni piastriniche espone i pazienti al rischio di alloimmunizzazione verso antigeni HLA, con la conseguenza di scarsa o nulla resa con la trasfusione (refrattarietà). La leucodeplezione riduce il rischio di alloimmunizzazione (Killick et al. British Journal of Haematology 1997). Nuove evidenze suggeriscono la possibilità di utilizzare, per la selezione dei donatori HLA compatibili, metodologie basate sull’analisi degli epitopi (HLAMatchMaker epitope-matching program), piuttosto che sulla ricerca degli antigeni HLA, (Kallon et al, Transfus Med 2020, Marsh et al, Blood 2020), con un vantaggio pratico in termini di accuratezza, costo, tempo di analisi, impegno di risorse nel laboratorio (Livello I).

I pazienti che divengono refrattari alla somministrazione di concentrato piastrinico devono essere sottoposti alla ricerca di anticorpi anti HLA, e, se positivi, sottoposti a successive trasfusioni con concentrati piastrinici HLA-compatibili.

(Livello di evidenza V; Forza del consensus 8.8; livello del consensus B)

Indicazioni alla trasfusione di concentrato granulocitario

Nonostante la possibile disponibilità di questo emoderivato, i dati sulla sua efficacia sono molto limitati, e il suo uso correlato a gravi effetti avversi (reazioni, alloimmunizzazione e Transfusion-related acute lung injury) (Wang et al. PLoS One 2014; Killick et al. Br J Haematol 2016, Quillen et al Haematologica 2009).

L’uso del concentrato granulocitario può trovare indicazione solo nei casi di infezione in neutropenia a rischio di vita ed in vista di una prossima risalita dei neutrofili e va riservato a quei casi in cui i potenziali benefici bilancino i rischi.

(Livello di evidenza V; Forza del consensus 8.1; livello del consensus C)

L'uso di emoderivati prelevati da familiari è controindicato per evitare la possibile sensibilizzazione del paziente verso antigeni HLA minori o antigeni leucocitari del donatore, potenziale donatore di HSC.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.8; livello del consensus B)

9.2 TERAPIA FERROCHELANTE

Sovraccarico marziale e indicazione alla terapia ferrochelante

Il sovraccarico marziale rappresenta un evento che impatta negativamente sulla mortalità e sulla mobilità dei pazienti con AA trasfusione dipendenti per lungo tempo (Lee Int. J. Hematol 2008, Takatoku et al. Eur. J. Haematol 2007, Pawelec et al. Adv Exp Med Biol 2015, Isidori et al. Blood Rev 2018, Lee et al. Bone Marrow Transplant 2016). L'indicazione ad avviare il trattamento ferrochelante viene posta tenendo conto dei diversi fattori elencati nella tabella 1.

Tabella 1. Fattori che indicano l'uso della terapia ferrochelante

- Carico trasfusionale
 - 2 unità di GRC/mese per > 1 anno
 - 20–40 unità di GRC, cumulativamente
- Sovraccarico di ferro
 - Ferritina > 1000 µg/l
- Fattori correlati al paziente
 - Assenza di comorbidità che pongano una prognosi sfavorevole a breve termine
 - Candidato a trapianto allogenico
 - Danno d'organo correlato al sovraccarico di ferro

La ferritina sierica non sempre correla fedelmente con il contenuto parenchimale di ferro, anche per il suo noto aumento come indice di fase acuta; per la valutazione del contenuto di ferro dei parenchimi, esistono metodiche più attendibili, quali la LIC (liver iron concentration), oggi misurabile attraverso metodiche non invasive come la RM (T2* o R2*) (Du et al. Acta Haematol. 2017) o la SQUID (Superconducting quantum interference device). Tuttavia, la semplicità di esecuzione, la ripetibilità, la disponibilità presso tutti i laboratori, il basso costo condizionano l'uso prevalente della ferritina come parametro di riferimento.

Sebbene non esistano studi specifici che suggeriscano un livello soglia per il trattamento dei pazienti con AA, in base ad evidenze ottenute anche in altre patologie, quali mielodisplasie o Malattia Drepanocitica, la soglia indicata è quella di 1000 ng/ml (Gattermann Leuk. Res 2007, Gattermann Int. J. Hematol 2008, Cohen 2008) e livelli di ferritina > 1000 ng/ml dovrebbero rappresentare un'indicazione alla terapia nei pazienti che non rispondono al trattamento immunosoppressivo e che rimangono trasfusione dipendenti (Passweg et al. Hematology 2010, Marsh et al. Br. J. Haematol 2009). Nei pazienti con AA tale livello viene raggiunto dopo alcuni mesi dalla diagnosi, per cui prima di iniziare un eventuale trattamento ferrochelante è opportuno attendere l'effetto della terapia immunosoppressiva di prima linea per 4-6 mesi.

La raccomandazione ad iniziare la terapia ferrochelante è particolarmente indicata nei pazienti candidati al trapianto di cellule staminali in cui il sovraccarico marziale è correlato ad una maggiore mortalità correlata al trapianto e una peggiore sopravvivenza (tabella I). (Armand et al. Blood 2007, Pullarkat Bone Marrow Transplant 2008, Koreth Haematologica 2010, Deeg Leuk. Lymphoma 2009). In ogni caso una valutazione sul rischio di complicazioni correlate al sovraccarico marziale, sui potenziali effetti collaterali dei farmaci ferrochelanti in rapporto al periodo atteso di trasfusione dipendenza dovrebbe essere eseguita in ogni paziente con AA.

Nei pazienti con livelli di ferritina superiori a 1000 ng/ml esiste l'indicazione ad avviare il trattamento ferrochelante.

(Livello di evidenza IV, EO; Forza del consensus 8.2; livello del consensus C)

Terapia ferrochelante

Il deferiprone non è indicato nei pazienti aplastici per la nota alta incidenza di agranulocitosi. Gli unici studi sull'utilizzo di ferrochelanti in pazienti con AA riguardano l'uso della desferossamina, farmaco sempre meno usato per motivi legati alla tossicità e alla insoddisfacente compliance, e del deferasirox. Quest'ultimo è stato studiato nell'EPIC trial (Cappellini et al. Haematologica 2010) in cui, in particolare, sono stati analizzati 116 pazienti con AA e sovraccarico marziale. In questo gruppo di pazienti è stata dimostrata una riduzione significativa dei livelli di ferritina durante il primo anno di trattamento in assenza di citopenia indotta dal farmaco. Tale riduzione è stata osservata sia in pazienti mai trattati sia in pazienti precedentemente chelati. Tale studio ha inoltre rilevato che i pazienti in terapia con CsA e deferasirox hanno manifestato una significativa compromissione della funzionalità renale. È pertanto raccomandato uno stretto monitoraggio della funzione renale durante tale trattamento (Lee et al. Blood 2010). Altri studi più recenti confermano l'efficacia del deferasirox nel contrastare il sovraccarico marziale, misurato con la ferritina e/o la LIC (Cheong IV et al. Transfusion 2010; Khogo et al. Acta Haematol 2015). Alcune segnalazioni suggeriscono inoltre un potenziale ruolo del deferasirox nel miglioramento dell'ematopoiesi in una percentuale variabile tra 40 e 48% (Du et al Acta Haematol. 2017, Lee Int. J. Hematol. 2008; Isidori et al. Blood Rev. 2018, Lee et al. Blood. 2011, Ko et al. Hematology 2019). Gli effetti collaterali descritti del deferasirox sono principalmente gastro-intestinali (10-15%), cutanei (8-10%) e renali (15-20%), sono limitati al grado 1-2 e di solito non impediscono la prosecuzione della terapia con il farmaco (Cheong et al. Transfusion 2014; Du et al Acta Haematol. 2017; Kim et al Transfusion. 2015; Khogo et al. Acta Haematol 2015). Per i pazienti non più trasfusione-dipendenti, quali i pazienti già trapiantati, pertanto, è consigliabile evitare l'approccio farmacologico e ricorrere ai salassi ripetuti per ridurre il sovraccarico marziale (Clucas et al Intern Med J 2019; Killik et al. Br J Haematol 2016).

Il deferasirox è da considerarsi il ferrochelante di prima scelta.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)

Il salasso è una valida opzione terapeutica nel paziente trapiantato che abbia un sovraccarico marziale.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.1; livello del consensus C)

9.3 SUPPORTO PSICOLOGICO

Negli ultimi anni sono fortemente cresciuti l'attenzione e l'interesse per lo studio della qualità di vita dei pazienti con AA e l'impatto che su di essa hanno i vari protocolli di cura della malattia. Questionari specifici disegnati per la valutazione delle aree psicosociale, relazionale, emotiva, fisica e mentale dei pazienti con AA e dei sintomi e delle complicanze peculiari della malattia, sono in fase di sviluppo e di validazione (Groth M et al. Ann Hematol 2017; K et al. Orphanet J Rare Dis 2020). Uno studio cinese ha dimostrato un miglioramento degli score relativi alle aree della salute mentale e fisica in 52 pazienti con AA dopo trattamento con CsA rispetto all'esordio della malattia, ma più bassi rispetto ai dati normativi della popolazione generale (Chen FF et al. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 2020). Un altro studio ha valutato la QoL di 146 pazienti con AA sottoposti ad aplo-TCSE e infusione di sangue cordonale da donatore non correlato, comparandola con quella di 219 pazienti trattati con sola terapia immunosoppressiva. Gli score della QoL in tutte le aree indagate risultavano migliori per i soggetti appartenenti al primo gruppo (Liu L et al. Leukemia 2020).

Si raccomanda lo studio della QoL dei pazienti in tutte le fasi della malattia e l'implementazione di questionari di valutazione specifici per la AA.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

9.4 G- CSF

Sin dal 1990, il G-CSF è stato utilizzato in associazione alla terapia con ATG e CsA con lo scopo di ridurre la mortalità correlata alle infezioni (Locasciulli A et al. Haematologica 2007). Il rischio di patologia clonale indotta da G-CSF è stato a lungo indagato nel corso degli anni attraverso studi retrospettivi su coorti di pazienti, ma con risultati controversi e non conclusivi (Socie G et al. Blood 2007; Ohara A et al. Blood 1997; Saracco P et al. Br J Haematol 2008; Teramura M et al. Blood 2007; Gluckman E et al. Br J Haematol 2002).

Un ampio studio randomizzato prospettico del SAA Working Party EBMT (Tichelli A et al. Blood. 2011) ha evidenziato come l'uso del G-CSF in pazienti affetti da SAA e vSAA durante i primi trenta giorni di IST non modifichi significativamente la OS, la EFS, la risposta alla terapia, la mortalità e il rischio di sviluppare malattia clonale e recidiva, mentre riduce le infezioni e i giorni di ospedalizzazione nei primi 3 mesi di trattamento, rispetto al gruppo controllo. Inoltre, l'uso del G-CSF si è dimostrato utile per identificare i pazienti responders: infatti i soggetti che al giorno +30 di G-CSF raggiungono i 500/mmc neutrofili hanno maggiori probabilità di ottenere una remissione completa. Più di recente il follow up di uno studio multicentrico, randomizzato e prospettico del SAA Working Party EBMT condotto su 192 pazienti con SAA trattati con ATG+CSA con o senza G-CSF, ha dimostrato che l'uso del G-CSF in associazione non impatta sull'outcome a lungo termine: OS, EFS, mancata risposta e rischio di recidiva non presentavano differenze significative nei due gruppi di pazienti (Tichelli A et al. Haematologica. 2020). L'impiego del G-CSF durante la IST nella AA, trova quindi il suo razionale nella possibilità di ridurre gli episodi infettivi e i giorni di ospedalizzazione nei primi 3 mesi di terapia (Helge D et al. Pediatr Clin North Am 2013).

L'efficacia della terapia "on demand" con G-CSF durante gli episodi febbrili è dimostrata da studi in pazienti affetti da neutropenia cronica di varia eziologia, in cui l'introduzione del G-CSF all'esordio dell'episodio febbrile, riduceva in maniera significativa la severità degli episodi stessi, la mortalità da sepsi, il numero e la durata delle ospedalizzazioni. L'efficacia era maggiore, in relazione alla precocità del trattamento con G-CSF (Mehta HM et al. J Immunol. 2015; Fioredda F et al. Blood Adv 2020).

È raccomandato l'uso continuativo di G-CSF nelle SAA e VSAA per quanto non sia possibile definire la durata del trattamento né, in caso di risposta, il cut-off minimo di neutrofili da raggiungere per quanto sembri che un numero di neutrofili > 500/mmc al giorno +30 si associ a migliore possibilità di risposta.

(Livello di evidenza II, III; Forza del consensus 7.8; livello del consensus D)

È raccomandato l'uso "on demand" di G-CSF in caso di neutropenia febbrile, durante la IST, per tutta la durata della febbre.

(Livello di evidenza V, EO; Forza del consensus 8.9; livello del consensus B)

9.5 SUPPORTO ANTI-INFETTIVO

Terapia

Le infezioni rappresentano la causa principale di morte nel paziente con SAA. La mortalità precoce, entro i 90 giorni dalla diagnosi, varia dall'1.9% al 16.3% e dipende da vari fattori come la gravità della SAA (maggiore per le forme molto gravi all'esordio con PMN < 200), l'età del paziente (maggiore nei pazienti > 20 anni) e dall'intervallo tra la diagnosi e l'inizio del trattamento (< 0 > 30 giorni). Dopo 90 giorni dalla diagnosi la mortalità può rimanere fra il 3 e il 10% ed è in relazione al tipo di risposta alla terapia immunosoppressiva e alla necessità di effettuare un trapianto di CSE con i connessi rischi di complicanze e mortalità. In uno studio randomizzato dell'EBMT in cui è stato valutato l'uso del G-CSF associato o meno alla terapia immunosoppressiva (ATG e CSA), il 55% (24/44) dei decessi riportati nello studio era dovuto ad infezioni batteriche o fungine. (Tichelli A Blood. 2011; Bacigalupo A Am J Hematol. 2018. Erratum in: Am J Hematol. 2019; Atta EH. Ann Hematol. 2017).

In uno studio retrospettivo pediatrico su 78 pazienti con diagnosi di AA il 54% dei pazienti ha presentato un episodio infettivo, classificato come FUO (febbre di origine sconosciuta) nel 46% e come infezione documentata nel 54%. In questo secondo gruppo, le infezioni microbiologicamente documentate con batteriemia erano il 38%, le infezioni microbiologicamente documentate senza batteriemia erano il 12%, le infezioni clinicamente documentate erano il 42% e le fungemie l'8%. La mortalità attribuibile ad infezione era il 9%. Il fattore di rischio predittivo di comparsa di infezione era il grado di aplasia (Quarello P Eur J Haematol 2012). Il rischio infettivo nell'aplasia midollare dipende dalla compromissione dell'immunità innata dovuta alla neutropenia che compromette la sua capacità di difesa nei confronti di batteri e funghi, dalla terapia immunosoppressiva che induce una profonda T-deplezione e dall'uso frequente di CVC che favoriscono l'ingresso di germi a partenza cutanea. L'uso di antibiotici per trattare infezioni ricorrenti può favorire la colonizzazione intestinale da parte di germi resistenti agli antibiotici che possono rappresentare una causa di batteriemie e sepsi.

Nel paziente con SAA ($PMN \leq 500/mm^3$) il trattamento della febbre segue le indicazioni della terapia antibiotica empirica adottate per i pazienti onco-ematologici, basato sull'inizio immediato di una terapia antibiotica a largo spettro dopo aver effettuato gli esami ematologici e microbiologici di inquadramento. La copertura a largo spettro può essere ottenuta con un singolo antibiotico (monoterapia con una cefalosporina di 3°- 4° generazione, oppure con piperacillina/tazobactam o con meropenem) o con più antibiotici (combinazione con uno dei precedenti antibiotici associato ad un aminoglicoside e/o a un glicopeptide). La decisione è modulabile sulla base della conoscenza dell'epidemiologia locale prevalente, della diffusione dei germi resistenti agli antibiotici, della colonizzazione del paziente da parte di germi resistenti, del grado di aplasia del paziente e della sua stabilità o instabilità clinica. In caso di non risposta alla terapia antibiotica a largo spettro è indicata la ripetizione degli esami ematologici, microbiologici o eseguire gli esami strumentali (es. TC polmonare) per identificare la causa della febbre e, in attesa della conclusione diagnostica, aggiungere una copertura antifungina empirica con anfotericina liposomiale oppure un'echinocandina o un triazolo come il voriconazolo (Averbuch D Haematologica 2013; Verlinden A Bone Marrow Transplant 2020; Groll AH Lancet Oncol 2014).

La durata della terapia antibiotica dipende dalla risposta clinica e dalla severità dell'aplasia midollare e varia da un minimo di 7 giorni per una FUO a pronta risoluzione, a 14 giorni ed oltre per le batteriemie/fungemie con o senza interessamento d'organo.

La terapia antibiotica iniziale di un paziente pediatrico con anemia aplastica e febbrile deve seguire i principi della terapia empirica nel paziente oncoematologico: inizio precoce, ampio spettro, rivalutazione clinica e strumentale dopo 72-96 ore di terapia.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.9; livello del consensus B)

La conoscenza dell'epidemiologia prevalente del centro è fondamentale per la scelta del regime antibiotico empirico.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.8; livello del consensus B)

Nei pazienti con SAA o vSAA, lo studio, mediante tampone rettale, della colonizzazione intestinale da parte di germi portatori di resistenza antibiotica, può permettere di instaurare una terapia antibiotica empirica più appropriata in caso di febbre.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.6; livello del consensus B)

La modifica della terapia antibiotica empirica come l'aggiunta di antibiotici (escalation), la riduzione degli antibiotici (deescalation), il cambio di molecola, è da effettuarsi dopo 72-96 ore di trattamento previa valutazione della risposta clinica, oppure anticipatamente in base a dati microbiologici o di peggioramento clinico.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.7; livello del consensus B)

La terapia antifungina empirica va iniziata nei pazienti con SAA/VSAA e febbre persistente nonostante 96 ore di terapia antibiotica adeguata a largo spettro.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

Profilassi

L'uso della profilassi antibiotica è dibattuto per l'emergere di germi resistenti o multiresistenti. I farmaci più studiati in profilassi sono i chinoloni, che possono avere in età pediatrica degli effetti potenziali negativi sulla cartilagine di accrescimento osseo. Inoltre, non vi sono evidenze specifiche che la profilassi antibatterica o antifungina sia efficace nei pazienti con aplasia midollare.

Tuttavia, l'incidenza di infezioni batteriche e fungine nei pazienti con aplasia midollare gravissima (PMN < 200/mmc), soprattutto nei primi 30-90 giorni dalla diagnosi, suggerisce una strategia di profilassi simile a quella adottata a volte per le leucemie acute. Inoltre, la linfopenia indotta dalla terapia immunosoppressiva basata su CSA, ATG e steroide espone il paziente con SAA al rischio di polmonite da *Pneumocystis jirovecii*.

La profilassi antibiotica è un'opzione nei pazienti con VSAA (PMN < 200/mmc) nei primi 30-90 giorni dopo il siero antilinfocitario.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 7.3; livello del consensus D)

La profilassi antifungina è un'opzione nei pazienti con VSAA (PMN < 200/mmc) nei primi 30-90 giorni dopo il siero antilinfocitario.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.1; livello del consensus B)

È indicata la profilassi contro *Pneumocystis jirovecii* con cotrimoxazolo per os o pentamidina per aerosol in presenza di valori di CD4+ < 400/mmc o di linfociti < 1000/mmc.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.4; livello del consensus B)

La profilassi anti Herpes simplex è un'opzione nei pazienti sieropositivi nei primi 30-90 giorni dopo il siero antilinfocitario.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.1; livello del consensus B)

9.6 VACCINAZIONI

Uno dei principali effetti collaterali della immunosoppressione in corso di AA è la profonda deplezione linfocitaria con conseguente scomparsa dell'immunità vaccinale. Ad oggi non ci sono dati conclusivi riguardo il timing della immunoricostruzione dopo IST e molti dei dati presenti in letteratura fanno riferimento ai pazienti sottoposti a chemioterapia per malattia linfoproliferativa. La maggior parte degli autori concorda che un intervallo di 6-12 mesi dal termine della terapia è adeguato per ottenere un sufficiente recupero immunologico (Cesaro S et al. Biomed Res Int 2014). L'incidenza di titoli anticorpali non protettivi, misurata 6-12 mesi dopo la chemioterapia varia secondo l'antigene vaccinale: la non protezione è maggiore per HBV (circa il 50% dei pazienti), mentre è inferiore per morbillo, parotite, rosolia (tra 20% e 40%) e difterite-tetano-polio (tra il 10% e il 30%). Inoltre, i livelli di immunoglobuline si normalizzano entro poche settimane dalla fine della chemioterapia, mentre la risposta funzionale delle cellule T contro antigeni come CMV, HSV 1, Varicella-Zoster, Candida, Tetano e Diffterite si ripristina in circa un anno o più dopo il trattamento. La ricostituzione di nuove cellule B transizionali e linfociti B e T naive si verifica rapidamente, mentre quella delle cellule B e T di memoria è più lenta e può essere incompleta fino a 5 anni dopo la fine del trattamento, specialmente nel caso di regimi di chemioterapia ad elevata intensità (Van Tilburg CM et al. Br J Haematol 2011; Top KA et al. Clin Infect Dis 2020). La rivaccinazione o la somministrazione di una dose di richiamo a 6 mesi dalla fine della chemioterapia per vaccini con proteine purificate o ottenuti da DNA ricombinante o dopo 6-12 mesi per vaccini vivi attenuati si

è dimostrata efficace nel raggiungere valori protettivi di titolo anticorpale in quasi tutti i pazienti, senza significativi effetti collaterali (De la Fuente Garcia I et al. *Pediatr Blood Cancer* 2017).

Vaccinazione dopo TCSE

La perdita dell'immunità vaccinale che si verifica dopo trapianto di cellule staminali ematopoietiche dipende da diversi fattori: le caratteristiche dell'immunità pre-trapianto del ricevente e lo stato immunitario del donatore, l'età del paziente al momento del trapianto, la combinazione di regimi chemioterapici pre-trapianto e/o radioterapia, la presenza di malattia di trapianto verso l'ospite (GVHD), la terapia immunosoppressiva dopo il trapianto. I dati ad oggi disponibili, seppure limitati, indicano che la risposta immunitaria al vaccino è solitamente bassa nei primi 6 mesi dopo TCSE e il numero dei linfociti B torna ai valori normali entro 3-12 mesi. Inoltre, le cellule B di recente generazione spesso mostrano una risposta antigene-specifica ridotta durante il primo anno dopo il trapianto, a causa della ridotta capacità di queste cellule di andare incontro a switch isotipico e mutazioni somatiche (Hilgendorf I et al. *Vaccine* 2011). La maggior parte delle cellule T circolanti nel corso del primo anno, è costituita da cellule T memoria/effettrici, derivate dal trapianto stesso, in grado di rispondere agli antigeni verso i quali il donatore era immune. Al contrario, i linfociti T naive capaci di rispondere ai nuovi antigeni vengono generati solo 6-12 mesi dopo il trapianto e questo si verifica più precocemente nei bambini più piccoli (Kennedy LB et al. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017; Olkinuora H et al. *Acta Paediatr* 2012). I vaccini contenenti microrganismi inattivati o antigeni purificati hanno un buon profilo di sicurezza e non sono associati ad aumentato rischio di effetti collaterali rispetto ai soggetti immunocompetenti, per cui devono essere considerati in ogni singolo caso ed essere somministrati 6 mesi dopo l'interruzione di qualsiasi terapia immunosoppressiva. I vaccini contenenti organismi vivi possono causare una malattia vaccinale grave nei pazienti immunocompromessi e sono controindicati entro 24 mesi dal TCSE o in pazienti con GVHD o terapia immunosoppressiva in corso (Cordonnier C et al. *Lancet Infect Dis* 2019). Appropriate strategie di vaccinazione possono ridurre le complicazioni derivanti da infezioni prevenibili con i vaccini, tuttavia, in relazione allo stato di compromissione immunologica del paziente con AA, dovrebbero essere adottate alcune precauzioni. In particolare, per ogni vaccino devono essere considerati il rapporto rischio/beneficio ed il giusto timing, al fine di evitare l'insorgenza di malattie vaccinali e di consentire una adeguata risposta anticorpale. La rivaccinazione con antigeni purificati/inattivati può essere considerata anche in corso di trattamento con CsA se a dosi < a 2.5 mg/kg/die (dose considerata immunosoppressiva da European Alliance of Associations for Rheumatology "EULAR"), pur a fronte di una possibile risposta immune subottimale (Guida alle Controindicazioni alle Vaccinazioni 2018 http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2759_allegato.pdf (accessed December 14, 2019; Martire B et al. *Vaccine*. 2018).

Le vaccinazioni dovrebbero essere effettuate durante la fase di remissione della malattia. Si raccomanda laddove possibile di completare il calendario vaccinale prima dell'inizio della IST o del TCSE.

Ad oggi non esistono dati relativi alla sicurezza e all'efficacia della vaccinazione anti SARS CoV2, nei pazienti con AA; per questo si rimanda alle indicazioni ad interim IPINET/SIAIP per i soggetti immunocompromessi (Martire B et al, Indicazioni ad interim su "Vaccinazione anti SARS-CoV-2 nei soggetti con disordini congeniti dell'immunità " Rete Italiana delle Immunodeficienze Primitive (IPINET) Società Italiana di Allergologia e Immunologia Pediatrica (SIAIP) <https://www.aip-it.org/index.php/vaccino-anti-covid-19-le-indicazioni-del-comitato-scientifico-aip-odv>) e della Associazione Europea di Ematologia (EHA) <https://ehaweb.org/covid-19/eha-statement-on-covid-19-vaccines/recommendations-for-covid-19-vaccination-in-patients-with-non-malignant-hematologic-diseases/>

Nei pazienti in trattamento con IST (ATG) non è raccomandata la somministrazione di alcun vaccino, anche in considerazione del rischio di recidiva di AA post vaccino descritto in alcuni casi. (Livello di evidenza V, EO; Forza del consensus 8.0; livello del consensus D)

Per i pazienti trattati con TCSE, in merito alle vaccinazioni, possono essere adottate le stesse indicazioni presenti nei protocolli adottati per i soggetti sottoposti a TCSE a causa di altre malattie ematologiche.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.6; livello del consensus B)

I soggetti con remissione stabile della AA (risposta parziale consolidata) che abbiano eseguito la IST (ATG) da più di sei mesi e siano in terapia con dosi di CsA < 2.5 mg/kg/die possono eseguire le vaccinazioni con antigeni inattivati/purificati dopo attenta valutazione del rischio/beneficio pur a fronte di una possibile risposta immunitaria subottimale.

(Livello di evidenza V, EO; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)

La valutazione del titolo anticorpale specifico e dell'assetto T linfocitario (conta linfocitaria, CD4.CD8, test funzionali) pur non raccomandato di routine, può essere eseguito in casi particolari prima della vaccinazione.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 7.9; livello del consensus C)

9.7 GRAVIDANZA

Non esiste una chiara correlazione fisiopatologica tra gravidanza e AA. Studi retrospettivi indicano una frequenza di AA durante la gravidanza non significativamente maggiore rispetto alla popolazione generale (Oosterkamp HM et al. Br J Haematol. 1998; Riveros-Perez E. Int J Womens Health. 2018): il primo caso fu descritto da Ehrlich nel 1888 in una donna gravida, con esito fatale per emorragia post-partum. L'esordio di AA durante la gravidanza correla con una maggiore incidenza di complicanze ostetriche e neonatali in un range compreso tra il 12 e il 33%: ritardo di crescita intrauterino, prematurità, sepsi neonatali, rottura prematura di membrane e preeclampsia (Li B et al. J Matern Fetal Neonatal Med 2016).

È descritta anche, soprattutto nei casi di esordio in gravidanza, la possibilità di remissione clinica con il termine della stessa. In questi casi la gravità della piastrinopenia, la paucità dei precursori emopoietici midollari e l'insorgenza dell'AA in epoca gestazionale più avanzata sono fattori di rischio per l'insorgenza di più gravi complicanze materne e fetali (Chen KJ Taiwan J Obstet Gynecol 2017). Alcuni autori, in considerazione della aumentata frequenza di remissione della AA dopo il parto, ne hanno suggerito l'induzione per le pazienti con forma severa (Riveros-Perez E et al. International Journal of Women's Health 2018).

C'è un alto rischio di recidiva di AA durante la gravidanza: 20% in gestanti con risposta parziale o completa all'IST (Tichelli A et al. Annals of Internal Medicine 2002). In uno studio retrospettivo monocentrico condotto su 15 gestanti, la conta piastrinica < 20.000/mmc, l'ipocellularità midollare (<25%) e l'esordio della AA in epoca gestazionale avanzata (>34 settimane) sono risultati in analisi univariata, fattori prognostici negativi in termini di risposta alla terapia e di sopravvivenza (Shin JE et al. PLoS One. 2014; Chen, K.J The Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology 2017).

Trasfusioni

Il supporto trasfusionale rappresenta la terapia di elezione della citopenia nella gestante con AA con l'indicazione di mantenere livelli di piastrine > 20.000/mmc e di Hb > 8 g/dl. In merito alle modalità del parto si considera sufficientemente sicura una conta piastrinica > 20.000/mmc per il parto vaginale e > 50.000/mmc per il TC. Non c'è una soglia unanimemente accettata per eseguire l'anestesia neurassiale (Harde M et al. J Anaesthesiol Clin Pharmacol. 2013; Ruppen W et al. Anesthesiology. 2006; Moen V et al. Anesthesiology. 2004)

IST e TCSE

La terapia immunosoppressiva con ATG e il TCSE non sono raccomandati in gravidanza a causa della potenziale teratogenicità e della tossicità fetale. Rari e aneddotici sono i casi trattati con ATG durante la gravidanza, riportati in letteratura (Kulkarni S et al. J Assoc Physicians India 1997).

L'uso della CsA sembra essere associato a parto prematuro e basso peso alla nascita. I dati in letteratura riguardanti l'uso di CsA in gestanti con patologia autoimmune non sono conclusivi e non consentono di definire se il rischio sia legato alla esposizione al farmaco o a comorbidità materne preesistenti. Per quanto esistano anche studi più favorevoli (Tichelli A. Ann Intern Med. 2002) il suo uso dovrebbe essere valutato attentamente nel singolo paziente in caso di refrattarietà alla terapia di supporto trasfusionale (Paziana K et al. Drug Saf. 2013; Hermans B.C.M. et al. The Netherlands Journal of Medicine 2019).

Farmaci agonisti del recettore della trombopoietina

In uno studio retrospettivo osservazionale multicentrico, 17 gestanti con ITP (2 con ITP secondaria) sono state trattate con eltrombopag (n = 8) o romiplostim (n = 7), con un tempo mediano di esposizione di 4 settimane (range, 1-39). Indicazioni: preparazione al parto (10), ITP refrattaria (4), tre hanno ricevuto eltrombopag all'inizio della gravidanza. Nessun evento tromboembolico materno, né complicanze neonatali (18 neonati) sono stati rilevati in associazione al trattamento; 1 caso di trombocitosi neonatale. La risposta al Tpo-RA è stata ottenuta nel 77% dei casi. Il trattamento con agonisti della trombopoietina sembra essere sicuro nella ITP severa/refrattaria per il neonato e la madre e potrebbe essere utile specie prima del parto (Michel M et al, Blood 2020).

G-CSF

Uno studio retrospettivo multicentrico ha valutato l'uso del G-CSF in 21 gestanti con SCN (10 con neutropenia congenita, 6 con neutropenia ciclica e 5 con forma idiopatica) per un totale di 38 gravidanze. Il G-CSF è stato somministrato per tutta la durata della gravidanza in 16 donne e per almeno un trimestre nelle altre 5. Nessuna differenza significativa è stata osservata fra le donne trattate e un gruppo controllo di donne con varie forme di SCN non trattate, in termini di outcome della gravidanza, complicanze materne e neonatali e infezioni (Zeidler C et al. Haematologica. 2014). Gli AA concludono che il G-CSF è sicuro ed efficace in gravidanza e ne suggeriscono l'utilizzo.

Terapia ferrochelante

L'uso di farmaci chelanti il ferro non è raccomandato in gravidanza per la mancanza di dati circa il loro effetto sullo sviluppo fetale e la possibile teratogenicità osservata in studi in vivo su animali da esperimento. Il deferasirox in particolare è indicato dalla FDA tra i farmaci di categoria C cioè quelli per i quali non ci sono studi controllati sull'uomo ma i cui potenziali benefici potrebbero suggerirne l'uso in gravidanza malgrado i potenziali rischi (FDA/CDER SBIA Chronicles. Drugs in pregnancy and lactation: improved benefit-risk information. 2015). Due studi retrospettivi hanno valutato l'uso non intenzionale di ferrochelanti con deferasirox e deferoxamina rispettivamente in 6 e 9 gestanti talassemiche, nel primo trimestre di gravidanza, non rilevando alcuna complicanza ostetrica e fetale e suggerendo di poter considerarne l'uso dopo attenta valutazione dei rischi /benefici (Diamantidis MD et al. Int J Hematol 2016; Piccioni MG et al. Journal of Obstetrics & Gynecology 2020)

Criopreservazione nei pazienti sottoposti a TMO

Il trapianto di midollo osseo è associato a tassi relativamente alti di infertilità sia nell'uomo che nella donna (Lee et al. J Clin Oncol. 2006, Borgmann-Staudt A et al. Bone Marrow Transplant 2012), correlati al regime di condizionamento, soprattutto quello basato sull'utilizzo della TBI e del busulfano (Borgmann-Staudt A et al. Bone Marrow Transplant 2012). Uno studio retrospettivo pubblicato nel 2012 su 344 pazienti in età pediatrica sottoposti a TMO, ha mostrato un tasso di infertilità nel 75% dei casi: 83% nelle femmine e 69% nei maschi (Borgmann-Staudt A et al. Bone Marrow Transplant 2012). In alcuni casi è possibile un recupero della fertilità, dopo una condizione di apparente sterilità (Pfister C et al. J Cancer Res Clin Oncol. 2015). Nei pazienti che devono essere sottoposti a TMO, le procedure di criopreservazione dovrebbero, quindi, essere prese in considerazione.

Il supporto trasfusionale rappresenta la terapia di elezione della citopenia nella gestante con AA. La IST e il TCSE non sono raccomandati in gravidanza mentre l'uso della CsA può essere considerato in casi eccezionali, dopo attenta valutazione dei rischi/benefici, e solo in presenza di refrattarietà alla terapia di supporto trasfusionale.

(Livello di evidenza V, EO; Forza del consensus 8.1; livello del consensus C)

L'uso del G-CSF in gravidanza può essere raccomandato in caso di neutropenia severa.

(Livello di evidenza IV; Forza del consensus 8.2; livello del consensus C)

In gravidanza, l'uso di farmaci agonisti del recettore della trombopoietina può essere considerato dopo attenta valutazione dei rischi/benefici, solo in presenza di refrattarietà alla terapia di supporto trasfusionale.

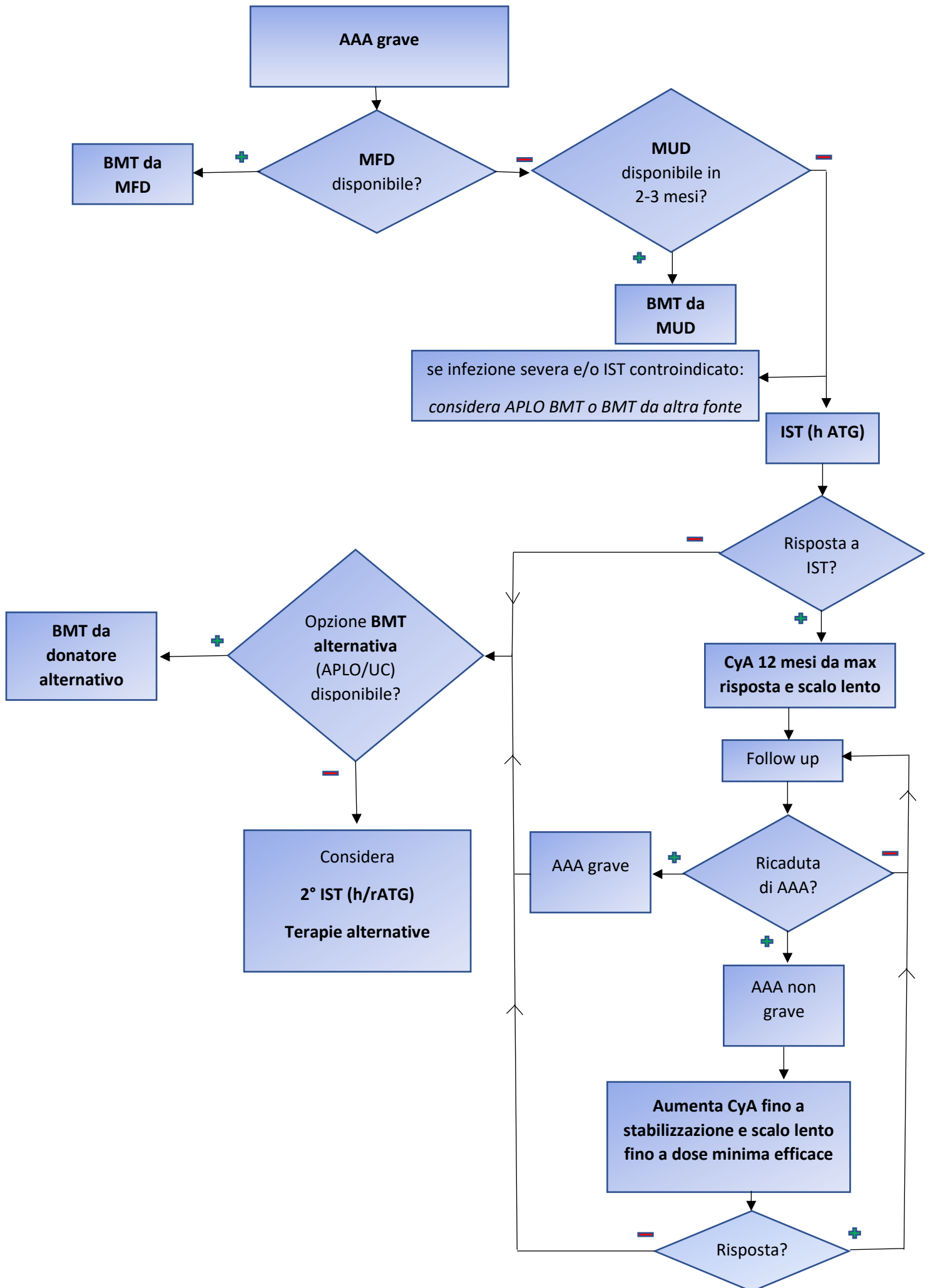
(Livello di evidenza V, EO; Forza del consensus 7.8; livello del consensus D)

In gravidanza non è raccomandato l'uso di farmaci ferro-chelanti.

(Livello di evidenza V, EO; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)

La criopreservazione del liquido seminale e degli ovociti deve essere presa in considerazione per i pazienti da sottoporre a TCSE per l'anemia aplastica.

(Livello di evidenza EO; Forza del consensus 8.5; livello del consensus B)



BIBLIOGRAFIA

- A Phase II Dose-escalation Study Characterizing the PK of Eltrombopag in Pediatric Patients With Previously Untreated or Relapsed Severe Aplastic Anemia or Recurrent Aplastic Anemia (NCT03025698).
- A Prospective Randomized Multicenter Study Comparing Horse Antithymocyte Globuline (hATG) + Cyclosporine A (CsA) With or Without Eltrombopag as Front-line Therapy for Severe Aplastic Anemia Patients (NCT02099747).
- Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 1996;14:483-510.
- Al-Ghazaly J, Al-Dubai W, Al-Jahafi AK, Abdullah M, Al-Hashdi A. Cyclosporine monotherapy for severe aplastic anemia: a developing country experience. *Ann Saudi Med*. 2005;25:375-9.
- Allenspach EJ, Bellodi C, Jeong D, et al. Common variable immunodeficiency as the initial presentation of dyskeratosis congenita. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(1):223-226.
- Alshaibani A, Dufour C, Risitano A, de Latour R, Aljurf M. Hepatitis-associated aplastic anemia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2020
- Alter BP. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes: Hematology Am Soc HEmatol Educ program 2007; 29-39
- Alter B.P, Giri N, Savage S.A, Rosenberg P.S. Telomere length in inherited bone marrow failure syndromes. *Haematologica*, 2015, 201.100, 49– 54.
- Anderlini P, Wu J, Gersten I, et al. Cyclophosphamide conditioning in patients with severe aplastic anaemia given unrelated marrow transplantation: a phase 1-2 dose de-escalation study. *Lancet Haematol*. 2015 Sep;2(9):e367-75.
- Angelini P, Kavadas F, Sharma N, et al. Aplastic anemia following varicella vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(8):746-748.
- Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:5209-14.
- Armand P, Kim HT, Cutler CS, Ho VT, Koreth J, Alyea EP et al. Prognostic impact of elevated pretransplantation serum ferritin in patients undergoing myeloablative stem cell transplantation. *Blood*. 2007; 109: 4586-4588.
- Aspesi A, Vallero S, Rocci A, Pavesi E, Lanciotti M, Ramenghi U, Dianzani I. Compound heterozygosity for two new TERT mutations in a patient with aplastic anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55:550-3.
- Assi R, Garcia-Manero G, Ravandi F, Borthakur G, Daver N, Jabbour E, Burger J, Estrov Z, Dinardo C, Alvarado Y, Hendrickson S, Ferrajoli A, Wierda W, Cortes J, Kantarjian H, Kadia T. Addition of Eltrombopag to Immunosuppressive Therapy in Patients with Newly Diagnosed Aplastic Anemia, *Cancer* 2018 November 01; 124(21): 4192–4201.
- Atta EH, Dias DS, Marra VL, de Azevedo AM. Comparison between horse and rabbit antithymocyte globulin as first-line treatment for patients with severe aplastic anemia: a single-center retrospective study. *Ann Hematol*. 2010;89:851-9.
- Atta EH, Lima CBL, Dias DSP, Clé DV, Bonduel MM, Sciuccati GB, Medeiros LA, Oliveira MM, Salvino MA, Garanito MP, Blum Fonseca PB, Saad STO, Calado RT, Scheinberg P. Predictors of early mortality after rabbit antithymocyte globulin as first-line treatment in severe aplastic anemia. *Ann Hematol*. 2017 Nov;96(11):1907-1914.

Atta, E. H., D. S. Dias, V. L. Marra, and A. M. de Azevedo. 'Comparison between Horse and Rabbit Antithymocyte Globulin as First-Line Treatment for Patients with Severe Aplastic Anemia: A Single-Center Retrospective Study.', *Ann Hematol* 2010, Vol. 89, No. 9, 851-9.

Averbuch D, Cordonnier C, Livermore DM, Mikulska M, Orasch C, Viscoli C, Gyssens IC, Kern WV, Klyasova G, Marchetti O, Engelhard D, Akova M; ECIL4, a joint venture of EBMT, EORTC, ICHS, ESGICH/ESCMID and ELN. Targeted therapy against multi-resistant bacteria in leukemic and hematopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the 4th European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-4, 2011). *Haematologica*. 2013 Dec;98(12):1836-47.

Babushok DV, Duke JL, Xie HM, Stanley N, Atienza J, Perdignes N, Nicholas P, Ferriola D, Li Y, Huang H, Ye W, Morrisette JJD, Kearns J, Porter DL, Podsakoff GM, Eisenlohr LC, Biegel JA, Chou ST, Monos DS, Bessler M, Olson TS. Somatic HLA mutations expose the role of class I-mediated autoimmunity in aplastic anemia and its clonal complications. *Blood Adv*. 2017 Oct 10; 1(22): 1900–1910. Published online 2017 Sep 28.

Babushok DV, Perdignes N et al. Emergence of Clonal Hematopoiesis in the Majority of Patients with Acquired Aplastic Anemia. *Cancer Genet*. 2015 April; 208(4): 115–128).

Babushok DV. A brief, but comprehensive, guide to clonal evolution in aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2018.

Bacigalupo A How I treat acquired aplastic anemia. *Blood* 2016.

Bacigalupo A, Brand R, Oneto R, Bruno B, Socié G, Passweg J, Locasciulli A, Van Lint MT, Tichelli A, McCann S, Marsh J, Ljungman P, Hows J, Marin P, Schrezenmeier H. Treatment of acquired severe aplastic anemia: bone marrow transplantation compared with immunosuppressive therapy--The European Group for Blood and Marrow Transplantation experience. *Semin Hematol*. 2000;37:69-80.

Bacigalupo A, Bruno B, Saracco P, Di Bona E, Locasciulli A, Locatelli F, Gabbas A, Dufour C, Arcese W, Testi G, Broccia G, Carotenuto M, Coser P, Barbui T, Leoni P, Ferster A. Antilymphocyte globulin, cyclosporine, prednisolone, and granulocyte colony-stimulating factor for severe aplastic anemia: an update of the GITMO/EBMT study on 100 patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Working Party on Severe Aplastic Anemia and the Gruppo Italiano Trapianti di Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 2000;95:1931-4.

Bacigalupo A, Chaple M, Hows J, Van Lint MT, McCann S, Milligan D, Chessells J, Goldstone AH, Ottolander J, van't Veer ET, et al. Treatment of aplastic anaemia (AA) with antilymphocyte globulin (ALG) and methylprednisolone (MPred) with or without androgens: a randomized trial from the EBMT SAA working party. *Br J Haematol*. 1993;83:145-51.

Bacigalupo A, Giammarco S. Haploidentical donor transplants for severe aplastic anemia. *Semin Hematol* 2019 Jul;56(3):190-193.

Bacigalupo A, Hows J, Gordon-Smith EC, Gluckman E, Van Lint MT, Congiu M, James DC, Barrett AJ, Gmur J, De Planque MM, et al. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia from donors other than HLA identical siblings: a report of the BMT Working Party. *Bone Marrow Transplant*. 1988;3: 531-5.

Bacigalupo A, Locatelli F, Lanino E, Marsh J, Socié G, Maury S, Prete A, Locasciulli A, Cesaro S, Passweg J; Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Fludarabine, cyclophosphamide and anti-thymocyte globulin for alternative donor transplants in acquired severe aplastic anemia: a report from the EBMT-SAA Working Party. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36:947-50.

Bacigalupo A, Oneto R, Schrezenmeier H, Hochsmann B, Dufour C, Kojima S, Zhu X, Chen X, Issaragrisil S, Chuncharunee S, Jeong DC, Giammarco S, Van Lint MT, Zheng Y, Vallejo C. First line treatment of aplastic anemia with thymoglobuline in Europe and Asia: Outcome of 955 patients treated 2001-2012. *Am J Hematol*. 2018 May;93(5):643-648. Erratum in: *Am J Hematol*. 2019 Jan;94(1):165.

Bacigalupo A, Socie G, Hamladji RM, et al. Current outcome of HLA identical sibling vs. unrelated donor transplants in severe aplastic anemia: an EBMT analysis. *Haematologica*. 2015; 100:696–702.

Bacigalupo A, Socie' G, Lanino E, Prete A, Locatelli F, Locasciulli A, Cesaro S, Shimoni A, Marsh J, Brune M, Van Lint MT, Oneto R, Passweg J. Fludarabine, cyclophosphamide, antithymocyte globulin, with or without low dose total body irradiation, for alternative donor transplants, in acquired severe aplastic anemia: a retrospective study from the EBMT-SAA Working Party. Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2010;95:976-82.

Bacigalupo A, Socié G, Schrezenmeier H, Tichelli A, Locasciulli A, Fuehrer M, Risitano AM, Dufour C, Passweg JR, Oneto R, Aljurf M, Flynn C, Mialou V, Hamladji RM, Marsh JC; Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (WPSAA-EBMT). Bone marrow versus peripheral blood as the stem cell source for sibling transplants in acquired aplastic anemia: survival advantage for bone marrow in all age groups. *Haematologica*. 2012;97(8):1142-8.

Bacigalupo A, Hows J, Gluckman E, Nissen C, Marsh J, Van Lint MT, Congiu M, De Planque MM, Ernst P, McCann S, et al. Bone marrow transplantation (BMT) versus immunosuppression for the treatment of severe aplastic anaemia (SAA): a report of the EBMT SAA working party. *Br J Haematol*. 1988; 2:177-82.

Bacigalupo A. & Giammarco, S. Haploidentical donor transplants for severe aplastic anemia. *Semin Hematol*, 2019, 56, 190-193.

Bacigalupo A. & Sica, S. Alternative donor transplants for severe aplastic anemia: current experience. *Semin Hematol*, 2016, 53, 115-119.

Bacigalupo A. Alternative donor transplants for severe aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2018;2018(1):467-473.

Bacigalupo A. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood*. 2017; 129(11): 1428- 1436.

Bär C, Huber N, Beier F, et al. Therapeutic effect of androgen therapy in a mouse model of aplastic anemia produced by short telomeres. *Haematologica*. 2015 Oct;100(10):1267–1274.

Barone A, Lucarelli A, Onofrillo D, Verzegnassi F, Bonanomi S, Cesaro S, Fioredda F, Iori AP, Ladogana S, Locasciulli A, Longoni D, Lanciotti M, Macaluso A, Mandaglio R, Marra N, Martire B, Maruzzi M, Menna G, Notarangelo LD, Palazzi G, Pillon M, Ramenghi U, Russo G, Svahn J, Timeus F, Tucci F, Cugno C, Zecca M, Farruggia P, Dufour C, Saracco P; Marrow Failure Study Group of the Pediatric Haemato-Oncology Italian Association. Diagnosis and management of acquired aplastic anemia in childhood. Guidelines from the Marrow Failure Study Group of the Pediatric Haemato-Oncology Italian Association (AIEOP). *Blood Cells Mol Dis*. 2015 Jun;55(1):40-7.

Baumann I, Führer M, Behrendt S, Campr V, Csomor J, Furlan I, de Haas V, Kerndrup G, Leguit RJ, De Paepe P, Noellke P, Niemeyer C, Schwarz S. Morphological differentiation of severe aplastic anaemia from hypocellular refractory cytopenia of childhood: reproducibility of histopathological diagnostic criteria. *Histopathology*. 2012 Jul;61(1):10-7.

Bean, M.A., Graham, T., Appelbaum, F.R., Deeg, H.J., Scheuning, F., Sale, G.E. & Storb, R. Gamma-irradiation of pretransplant blood transfusions from unrelated donors prevents sensitization to minor histocompatibility antigens on dog leukocyte antigen-identical canine marrow grafts. *Transplantation*, 1994. 57, 423–426.

Bejanyan N, Kim S, Hebert KM, Kekre N, Abdel-Azim H, Ahmed I, Aljurf M, Badawy SM, Beitinjaneh A, Boelens JJ, Diaz MA, Dvorak CC, Gadalla S, Gajewski J, Gale RP, Ganguly S, Gennery AR, George B, Gergis U, Gómez-Almaguer D, Vicent MG, Hashem H, Kamble RT, Kasow KA, Lazarus HM, Mathews V, Orchard PJ, Pulsipher M, Ringden O, Schultz K, Teira P, Woolfrey AE, Saldaña BD, Savani B, Winiarski J, Yared J, Weisdorf DJ, Antin JH, Eapen M. Choice of conditioning regimens for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. *Blood Adv*. 2019 Oct 22;3(20):3123-3131.

Bennett JM, Orazi A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. *Haematologica*. 2009;94:264–68.

Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo Bacigalupo A. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood*, 2017;129, 1428-1436.

Bertaina A, Merli P, Rutella S, Pagliara D, Bernardo M.E, Masetti R, Pende D, Falco M, Handgretinger R, Moretta F, Lucarelli B, Brescia L.P, Li Pira G, Testi M, Cancrini C, Kabbara N, Carsetti R, Finocchi A, Moretta A, Moretta L, Locatelli F. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta^+$ T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood*, 2014, 124, 822-826.

Bessler M, Mason P, Link D et al. Inherited bone marrow failure syndromes. In: DGN, SHO; DG, et al. Editors. *Nathans and Oski's Hematology of infancy and childhood*. 8. Philadelphia: W.B.Saunders Co; 2014.

Betensky M, Babushok D, Roth JJ, Mason PJ, Biegel JA, Busse TM, Li Y, Lind C, Papazoglou A, Monos D, Podsakoff G, Bessler M, Olson TS. Clonal evolution and clinical significance of copy number neutral loss of heterozygosity of chromosome arm 6p in acquired aplastic anemia. *Cancer Genet*. 2016 Jan-Feb;209(1-2).

Bilgin Y.M, van de Watering L.M.G, Brand A. Clinical effects of leucoreduction of blood transfusions. *Neth J Med* 2011, 69:441-450.

Blombery P, Fox L, Ryland GL, Thompson ER, Lickiss J, McBean M, Yerneni S, Hughes D, Greenway A, Mechinaud F, Wood EM, Lieschke GJ, Szer J, Barbaro P, Roy J, Wight J, Lynch E, Martyn M, Gaff C, Ritchie D. Utility of clinical comprehensive genomic characterization for diagnostic categorization in patients presenting with hypocellular bone marrow failure syndromes. *Haematologica*. 2021 Jan 1;106(1):64-73.

Bluteau O, Sebert M, Leblanc T, Peffault de Latour R, Quentin S, Lainey E, Hernandez L, Dalle JH, Sicre de Fontbrune F, Lengline E, Itzykson R, Clappier E, Boissel N, Vasquez N, Da Costa M, Masliah-Planchon J, Cuccuini W, Raimbault A, De Jaegere L, Adès L, Fenaux P, Maury S, Schmitt C, Muller M, Domenech C, Blin N, Bruno B, Pellier I, Hunault M, Blanche S, Petit A, Leverger G, Michel G, Bertrand Y, Baruchel A, Socié G, Soulier J. A landscape of germ line mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. *Blood*. 2018 Feb 15;131(7):717-732.

Borgmann-Staudt A, Rendtorff R, Reinmuth S, Hohmann C, Keil T, Schuster FR, Holter W, Ehlert K, Keslova P, Lawitschka A, Jarisch A, Strauss G. Fertility after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in childhood and adolescence. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Feb; 47(2):271-6.

Borowitz MJ, Craig FE, Diguseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, Wittwer CT, Richards SJ; Clinical Cytometry Society. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78:211-30.

Brock K, Goldenberg N, Graham DK, Liang X, Hays T. Moderate aplastic anemia in children: preliminary outcomes for treatment versus observation from a single-institutional experience. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013 Mar;35(2):148-52.

Brodsky RA, Chen AR, Dorr D, Fuchs EJ, Huff CA, Luznik L, Smith BD, Matsui WH, Goodman SN, Ambinder RF, Jones RJ. High-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia: long-term follow-up. *Blood*. 2010;115:2136-41

Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, Nelson KL, Chiurazzi PL, Buckley JT, Borowitz MJ. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol*. 2000;114:459-66.

Brodsky RA, Petri M, Smith BD, Seifter EJ, Spivak JL, Styler M, Dang CV, Brodsky I, Jones RJ. Immunoablative high-dose cyclophosphamide without stem-cell rescue for refractory, severe autoimmune disease. *Ann Intern Med*. 1998;129:1031-5.

Brodsky RA, Sensenbrenner LL, Jones RJ. Complete remission in severe aplastic anemia after high-dose cyclophosphamide without bone marrow transplantation. *Blood*. 1996;87:491-4.

Brodsky R, Chen A., Brodsky I, Jones R. High-dose cyclophosphamide as salvage therapy for severe aplastic anaemia. *Experimental Hematology* 2004, 32, 435–440.

Brown KE, Tisdale J, Barrett AJ, Dunbar CE, Young NS. Hepatitis-associated aplastic anemia. *N Engl J Med* 1997; 336: 1059–64.

Brummendorf T.H, Rufer N, Holyoake T.L, Maciejewski J, Barnett M.J, Eaves C.J, Eaves A.C, Young N, Lansdorp P.M. (2001) Telomere length dynamics in normal individuals and in patients with hematopoietic stem cell-associated disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 938, 293– 303, discussion 303–294.

Burroughs LM, Woolfrey AE, Storer BE, Deeg HJ, Flowers ME, Martin PJ, Carpenter PA, Doney K, Appelbaum FR, Sanders JE, Storb R. Success of allogeneic marrow transplantation for children with severe aplastic anemia. *Br J Haematol*. 2012;158:120- 8.

Cabannes-Hamy A, Boissel N, Peffault De Latour R, Lengliné E, Leblanc T, de Fontbrune FS, Raffoux E, Robin M, Xhaard A, Baruchel A, Socié G, Dhédin N. The effect of age in patients with acquired aplastic anaemia treated with immunosuppressive therapy: comparison of Adolescents and Young Adults with children and older adults. *Br J Haematol*. 2018 Dec;183(5):766-774.

Caitlin R et al Postvaccination graft dysfunction/aplastic anemia relapse with massive clonal expansion of autologous CD8+ lymphocytes *Blood Adv* 2020 Apr 14;4(7):1378-1382.

Calado RT, Cooper JN, Padilla-Nash HM, Sloand EM, Wu CO, Scheinberg P, Ried T, Young NS. Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia. *Leukemia*. 2012 Apr;26(4):700-7.

Calado RT, Regal JA, Yewdell WT, et al. Constitutional loss-of-function mutations in telomerase are genetic risk factors for acute myeloid leukemia. *Blood* 2015; 110(11):16.

Camitta B, Ash R, Menitove J, Murray K, Lawton C, Hunter J, Casper J. Bone marrow transplantation for children with severe aplastic anemia: use of donors other than HLA-identical siblings. *Blood*. 1989;74: 1852-7.

Camitta BM, Rapoport JM, Parkman R, Nathan DG. Selection of patients for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. *Blood*. 1975; 45(3): 355- 363.

Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Santos G, Gordon-Smith EC, Gale RP, Rapoport JM, Storb R. Severe Aplastic Anemia: A Prospective Study of the Effect of Early Marrow Transplantation on Acute Mortality. *Blood*. 1976;1:63-70.

CAMMS223 Trial Investigators, Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, Norris K, Tandon PK. Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1786-801.

Cappellini MD, Porter J, El-Beshlawy A, Li CK, Seymour JF, Elalfy M et al. Tailoring iron chelation by iron intake and serum ferritin: the prospective EPIC study of deferasirox in 1744 patients with transfusion-dependent anemias. *Haematologica*. 2010; 95: 557-566.

Casper JT, Truitt RR, Baxter-Lowe LA, Ash RC. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia in children. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990;12: 434–448.

Cesaro S, Giacchino M, Fioredda F, et al. Guidelines on vaccinations in paediatric haematology and oncology patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-10.

Cesaro S, Peffault de Latour R, Tridello G, Pillon M, Carlson Kr, Fagioli F et al. Second allogeneic stem cell transplant for aplastic anaemia: a retrospective study by the severe aplastic anaemia working party of the European society for blood and marrow transplantation. *Br J Haematol* 2015; 171: 606–614.

Champlin RE, Perez WS, Passweg JR, Klein JP, Camitta BM, Gluckman E, Bredeson CN, Eapen M, Horowitz MM. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: a randomized controlled study of conditioning regimens. *Blood*. 2007;109:4582-5.

Chan KW, McDonald L, Lim D, Grimley MS, Grayson G, Wall DA. Unrelated cord blood transplantation in children with idiopathic severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 42:589-595.

Chen FF, Guo ZW, Zhang LN, Yang C, Chen M, Ye F, Han B. The change of quality of life in 52 patients with non-severe aplastic anemia after cyclosporine A therapy *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2020 Oct 14;41(10):806-810.

Chen, K.J., Chang, Y.L., Chang, H., Su, S.Y., Peng, H.H., Chang, S.D. & Chao, A.S. (2017) Longterm outcome of pregnancy complicating with severe aplastic anemia under supportive care. *The Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56, 632–635.

Cheng Y, Xu Z, Zhang Y, Wu J, Wang F, Mo X, Chen Y, Han W, Jia J, Wang Y, Zhang X, Huang X, Zhang L, Xu L. First-line choice for severe aplastic anemia in children: Transplantation from a haploidentical donor vs immunosuppressive therapy. *Clinical Transplantation*, 2018b, 32, e13179.

Cheong JW, Kim HJ, Lee KH, Yoon SS, Lee JH, Park HS, Kim HY, Shim H, Seong CM, Kim CH, Chung J, Hyun M, Jo DY, Jung CW, Sohn SK, Yoon HJ, Kim BS, Yoo YD, Park CY, Min YH, Korean Society of Hematology Acute Myeloid Leukemia/Myelodysplastic Syndrome Working Party. Deferasirox improves hematologic and hepatic function with effective reduction of serum ferritin and liver iron concentration in transfusional iron overload patients with myelodysplastic syndrome or aplastic anemia. *Transfusion*. 2014 Jun;54(6):1542-51.

Choi YB, Yi ES, Lee JW, Sung KW, Koo HH, Yoo KH. Immunosuppressive therapy versus alternative donor hematopoietic stem cell transplantation for children with severe aplastic anemia who lack an HLA-matched familial donor. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(1):47-52.

Chrzanowska KH, Gregorek H, Dembowska-Bagińska B, Kalina MA, Digweed M. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7(1):13.

Chuhjo T, Yamazaki H, Omine M, Nakao S. Danazol therapy for aplastic anemia refractory to immunosuppressive therapy. *Am J Hematol*. 2008;83:387-9.

Ciceri F, Lupo-Stanghellini M.T, Korthof E.T. Haploidentical transplantation in patients with acquired aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*, 2013, 48, 183-185.

Clay J, Kulasekararaj A.G, Potter V, Grimaldi F, McLornan D, Raj K, de Lavallade H, Kenyon M, Pagliuca A, Mufti G.J, Marsh J.C. Nonmyeloablative peripheral blood haploidentical stem cell transplantation for refractory severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014, 20, 1711-1716.

Clucas DB, Fox LC, Wood EM, Hong FS, Gibson J, Bajel A, et al. Australian Aplastic Anaemia Registry Steering Committee. Revisiting acquired aplastic anaemia: current concepts in diagnosis and management. *Intern Med J*. 2019 Feb;49(2):152-159

Cohen AR, Glimm E, Porter JB. Effect of transfusional iron intake on response to chelation therapy in beta-thalassemia major. *Blood*. 2008 Jan 15;111(2):583-7.

Cohen D, Hartung H, Evans P, Friedman DF, Chou ST. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with bone marrow failure syndromes. *Transfusion*. 2016 Jun;56(6):1314-9. doi: 10.1111/trf.13608. Epub 2016 Apr 15.

Cooper JN, Young NS. Clonality in context: hematopoietic clones in their marrow environment. *Blood* 2017; 130:2363-72.

Cordonnier C, Einarsdottir S, Cesaro S, Di Blasi R, Mikulska M, Rieger C, de Lavallade H, Gallo G, Lehrnbecher T, Engelhard D, Ljungman P. Vaccination of haemopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7).; European Conference on Infections in Leukaemia group. *Lancet Infect Dis*. 2019 Jun;19(6)

Cui Q, Sha P, Chen H, Shen H, Qin L, Li Z, Wu T, Wang Z. Modified immunosuppressive therapy with porcine antilymphocyte globulin plus delayed cyclosporine A in children with severe aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2018 Jan;107(1):64-68.

Darrigo LG, Colturato V, de Souza M.P, Loth G, Calixto R, Seber A, Gottardello Zecchin V, Esteves Daudt L, Barbosa Tavares R, Arcuri L, Vaz de Macedo A, Vieira A.K, Kuwahara C, Ribeiro L, Folloni Fernandes J, Flowers M.E, Pasquini R, Bonfim C. Allogeneic Bone Marrow Transplants for Pediatric Severe Aplastic Anemia: Real-world Data comparing Matched Related and Unrelated Donors in a Developing Country. Retrospective study on behalf of the Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Working Group of the Brazilian Bone Marrow Transplantation Society (SBTMO) and the Brazil-Seattle Consortium (Gedeco). *Pediatric Transplantation*. 2019;00:e13552.

De la Fuente Garcia I, Coïc L, Leclerc JM, Laverdière C, Rousseau C, Ovetchkine P, Tapiéro B. Protection against vaccine preventable diseases in children treated for acute lymphoblastic leukemia. *d.Pediatr Blood Cancer*. 2017 Feb;64(2):315-320.

Deeg HJ, Amylon ID, Harris RE, Collins R, Beatty PG, Feig S, Ramsay N, Territo M, Khan SP, Pamphilon D, Leis JF, Burdach S, Anasetti C, Hackman R, Storer B, Mueller B. Marrow transplants from unrelated donors for patients with aplastic anemia: minimum effective dose of total body irradiation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7:208-15.

Deeg HJ, O'Donnell M, Tolar J, Agarwal R, Harris RE, Feig SA, Territo MC, Collins RH, McSweeney PA, Copelan EA, Khan SP, Woolfrey A, Storer B. Optimization of conditioning for marrow transplantation from unrelated donors for patients with aplastic anemia after failure of immunosuppressive therapy. *Blood*. 2006;108:1485-91.

Deeg HJ, Spaulding E, Shulman HM. Iron overload, hematopoietic cell transplantation, and graft-versus-host disease. *Leuk. Lymphoma*. 2009; 50: 1566-1572.

Deeg HJ, Storb R, Appelbaum FR, Kennedy MS, Graham TC, Thomas ED. Combined immunosuppression with cyclosporine and methotrexate in dogs given bone marrow grafts from DLA-haploidentical littermates. *Transplantation*. 1984;37:62-5.

Deeg HJ, Storb R, Weiden PL, Raff RF, Sale GE, Atkinson K, Graham TC, Thomas ED. Cyclosporin A and methotrexate in canine marrow transplantation: engraftment, graft-versus-host disease, and induction of intolerance. *Transplantation*. 1982;34:30-5. 164.

Deng S, Lin S, Shen J, Zeng Y. The relationship between interferon-gamma (INF- γ) single nucleotide polymorphism +874(T/A) and occurrence risk of aplastic anemia: a meta-analysis. *Hematology* 2020 Dec;25(1):85-90.

Deng XZ, Du M, Peng J, Long JX, Zheng CJ, Tan Y, Li LJ, Chen HY, Qing C, Pang YY, Lan Y, Zhang HT. Associations between the HLA-A/B/DRB1 polymorphisms and aplastic anemia: evidence from 17 case-control studies. *Hematology* 2018 Apr;23(3):154-162.

Desmond R, Townsley D.M, Dumitriu B, Olnes M.J, Scheinberg P, Bevans M, Parikh A.k, Broder K, Calvo K.R, Wu C.O, Young N.S, Dunbar C.E. Eltrombopag restores tri-lineage hematopoiesis in refractory severe aplastic anemia which can be sustained on discontinuation of drug, *Blood* 2014

Dezern, A.E., Luznik, L., Fuchs, E.J., Jones, R.J. & Brodsky, R.A. Post-transplantation cyclophosphamide for GVHD prophylaxis in severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*, 2011, 46, 1012-1013.

Dezern, A.E., Zahurak, M.L., Symons, H.J., Cooke, K.R., Rosner, G.L., Gladstone, D.E., Huff, C.A., Swinnen, L.J., Imus, P., Borrello, I., Wagner-Johnston, N., Ambinder, R.F., Luznik, L., Bolaños-Meade, J., Fuchs, E.J., Jones, R.J. & Brodsky, R.A. Haploidentical BMT for severe aplastic anemia with intensive GVHD prophylaxis including posttransplant cyclophosphamide. *Blood Advances*, 2020, 4, 1770-1779.

DeZern A.E., Zahurak M., Symons H., Cooke K., Jones R.J., Brodsky R.A. Alternative Donor Transplantation with High-Dose Post-Transplantation Cyclophosphamide for Refractory Severe Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Mar;23(3):498-504.

Di Bona E, Rodeghiero F, Bruno B, Gabbas A, Foa P, Locasciulli A, Rosanelli C, Camba L, Saracco P, Lippi A, Iori AP, Porta F, De Rossi G, Comotti B, Iacopino P, Dufour C, Bacigalupo A. Rabbit antithymocyte globulin (r-ATG) plus cyclosporine and granulocyte colony stimulating factor is an effective treatment for aplastic anaemia patients unresponsive to a first course of intensive immunosuppressive therapy. Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Br J Haematol* 1999;107:330-4.

Diamantidis MD, Neokleous N, Agapidou A, Vetsiou E, Manafas A, Fotiou P, Vlachaki E Iron chelation therapy of transfusion-dependent β -thalassemia during pregnancy in the era of novel drugs: is deferasirox toxic? *Int J Hematol*. 2016 May;103(5):537-44.

Dirksen U, Moghadam KA, Mambetova C, Esser C, Fuhrer M, Burdach S. Glutathione S transferase theta 1 gene (GSTT1) null genotype is associated with an increased risk for acquired aplastic anemia in children. *Pediatr Res*. 2004;55:466-71.

Donnini I, Scappini B, Guidi S, Longo G, Bosi A. Acquired severe aplastic anemia after H1N1 influenza virus vaccination successfully treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol*. 2012;91(3):475-476.

Drachman DB, Jones RJ, Brodsky RA. Treatment of refractory myasthenia: "rebooting" with highdose cyclophosphamide. *Ann Neurol*. 2003;53:29-34.

Du S, He W, Yang Y et al. Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia using intensified immunoablative conditioning regimen leading to high engraftment and survival. *Bone Marrow Transplant*. 2020; 55:1677-1680.

Du Y, Long Z, Chen M, Han B, Hou B, Feng F. Observational Monitoring of Patients with Aplastic Anemia and Low/Intermediate-1 Risk of Myelodysplastic Syndromes Complicated with Iron overload. *Acta Haematol*. 2017;138(2):119-128

Dufour C (a), Veys P, Carraro E, Bhatnagar N, et al. Similar outcome of upfront-unrelated and matched sibling stem cell transplantation in idiopathic paediatric aplastic anaemia. A study on behalf of the UK Paediatric BMT Working Party, Paediatric Diseases Working Party and Severe Aplastic Anaemia Working Party of EBMT. *Br J Haematol*. 2015;171(4):585-94.

Dufour C (b), Pillon M, Soci`e G, Rov`o A, Carraro E, Bacigalupo A, et al. Outcome of aplastic anaemia in children. A study by the severe aplastic anaemia and paediatric disease working parties of the European group blood and bone marrow transplant. *Br J Haematol* 2015;169(4):565–73. [23].

Dufour C, Ferretti E, Bagnasco F, Burlando O, Lanciotti M, Ramenghi U, Saracco P, Van Lint MT, Longoni D, Torelli GF, Pillon M, Locasciulli A, Misuraca A, La Spina M, Bacigalupo A, Pistoia V, Corcione A, Svahn J; Marrow Failure Study Group of the AIEOP. Changes in cytokine profile pre- and post-immunosuppression in acquired aplastic anemia. *Haematologica*. 2009; 94:1743-7.

Dufour C, Pillon M, Passweg J, Socié G, Bacigalupo A, Franceschetto G, Carraro E, Oneto R, Risitano AM, Peffault de Latour R, Tichelli A, Rovo A, Peters C, Hoechsmann B, Samarasinghe S, Kulasekararaj AG, Schrezenmeier H, Aljurf M, Marsh J. Outcome of aplastic anemia in adolescence: a survey of the Severe

Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2014 Oct;99(10):1574-81.

Dufour C, Pillon M, Sociè G, Rovò A, Carraro E, Bacigalupo A, Oneto R, Passweg J, Risitano A, Tichelli A, Peffault de Latour R, Schrezenmeier H, Hocshmann B, Peters C, Kulasekararaj A, Van Biezen A, Samarasinghe S, Hussein AA, Ayas M, Aljurf M, Marsh J. Outcome of aplastic anaemia in children. A study by the severe aplastic anaemia and paediatric disease working parties of the European group blood and bone marrow transplant. *Br J Haematol*. 2015 May;169(4):565-73.

Dufour C, Svahn J, Bacigalupo A and on behalf of the Severe Aplastic Anemia–Working Party of the EBMT. REVIEW Front-line immunosuppressive treatment of acquired aplastic anemia. *Bone Marrow Transplantation* (2013) 48, 174–177.

Dufour C, Svahn J, Bacigalupo A, Longoni D, Varotto S, Iori AP, Bagnasco F, Locasciulli A, Menna G, Ramenghi U, Lanciotti M. Genetic polymorphism of CYP3A4, GSTT1, GSTM1, GSTP1 and NQO1 and the risk of acquired idiopathic aplastic anemia in Caucasian patients. *Haematologica*. 2005; 90:1027-31.

Dufour C, Veys P, Carraro E, Bhatnagar N, Pillon M, Wynn R, et al. Similar outcome of upfront-unrelated and matched sibling stem cell transplantation in idiopathic paediatric aplastic anaemia. A study on behalf of the UK Paediatric BMTWorking Party, Paediatric Diseases Working Party and Severe Aplastic Anaemia Working Party of EBMT. *Br J Haematol*. 2015;171(4):585–94.

Dufour C, Capasso M, Svahn J, Marrone A, Haupt R, Bacigalupo A, Giordani L, Longoni D, Pillon M, Pistorio A, Di Michele P, Iori A.P, Pongiglione C, Lanciotti M, Iolascon A, Associazione Italiana di Emato-Oncologia Pediatrica (AIEOP). Homozygosity for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN-gamma gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. *Br J Haematol*. 2004 Sep;126(5):682-5.

Dufour C, Dallorso S, Casarino L, Corcione A, Pistoia V, Bacigalupo A, Morreale G, Dini G. Late graft failure 8 years after first bone marrow transplantation for severe acquired aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 1999 Apr;23(7):743-5.

Dumont FJ. Alemtuzumab (Millennium/ILEX). *Curr Opin Investig Drugs*. 2001 Jan;2(1):139-60.

Eapen M, Le Rademacher J, Antin JH, et al. Effect of stem cell source on outcomes after unrelated donor transplantation in severe aplastic anemia. *Blood*. 2011;118(9):2618-2621.

Eapen M, Davies S.M, Ramsay N.K. Late graft rejection and second infusion of bone marrow in children with aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 1999 Jan;104(1):186-8.

Ecsedi M, Lengline E, Knol-Bout C, Bosman P, Eikema DJ, Afanasyev B, Maschan A, Dreger P, Halkes C.J.M, Drexler B, Cortelezzi A, Drénou B, Patriarca A, Bruno B, Onofrillo D, Lanino E, Pulanic D, Serventi-Seiwerth R, Garnier A, Ljungman P, Bonifazi F, Giammarco S, Tournilhac O, Pioltelli P, Rovó A, Risitano A.M, Peffault de Latour R, Dufour C, Passweg J for the EBMT SAA Working Party Use of eltrombopag in aplastic anemia in Europe, *Annals of Hematology* 2019.

Efrain Riveros-Perez, Amy C Hermes, Linda A Barbour, Joy L Hawkins, Aplastic anemia during pregnancy: a review of obstetric and anesthetic considerations *International Journal of Women's Health* 2018;10.

Elmahdi S, Muramatsu H, Narita A, Ismael O, Hama A, Nishio N, Okuno Y, Xu Y, Wang X, Takahashi Y, Kojima S. Markedly High Plasma Thrombopoietin (TPO) Level is a Predictor of Poor Response to Immunosuppressive Therapy in Children With Acquired Severe Aplastic Anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2016 Apr;63(4):659-64.

Elter T, Vehreschild JJ, Gribben J, Cornely OA, Engert A, Hallek M. Management of infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with alemtuzumab. *Ann Hematol*. 2009 Feb;88(2):121-32.

Eltrombopag Combined With Cyclosporine as First Line Therapy in Patients With Severe Acquired Aplastic Anemia (NCT02998645).

Esteves, I., Bonfim, C., Pasquini, R., Funke, V., Pereira, N.F., Rocha, V., Novis, Y., Arrais, C., Colturato, V., de Souza, M.P., Torres, M., Fernandes, J.F., Kerbaui, F.R., Ribeiro, A.A., Santos, F.P. & Hamerschlag, N. Haploidentical BMT and post-transplant Cy for severe aplastic anemia: a multicenter retrospective study. *Bone Marrow Transplant*, 2015, 50, 685-689.

Fan X, Desmond R, Winkler T, Young D.J, Dumitriu B, Townsley D.M et al. Eltrombopag for patients with moderate aplastic anemia or uni-lineage cytopenias, *Blood advances*, 2020.

Fang M, Song H, Zhang J et al. Efficacy and safety of immunosuppressive therapy with or without eltrombopag in pediatric patients with acquired aplastic anemia: A Chinese retrospective study. *Pediatr Hematol Oncol*. 2021 Mar 16;1-16.

Fang, B., Li, N., Song, Y., Li, J., Zhao, R.C. & Ma, Y. Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia. *Pediatr Transplant*, 2009, 13, 499-502.

Fattizzo B, Kulasekararaj A.G, Hill A, Benson-Quarm N, Griffin M et al. Clinical and morphological predictors of outcome in older aplastic anemia patients treated with eltrombopag, *Haematologica* 2019.

Fattizzo B, Levati G, Cassin R, Barcellini W. Eltrombopag in immune thrombocytopenia, aplastic anemia, and myelodysplastic syndrome: from magakariopoiesis to immunomodulation, *Drugs* 2019.

FDA/CDER SBIA Chronicles. Drugs in pregnancy and lactation: improved benefit-risk information. January 22, 2015.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/SmallBusinessAssistance/UCM431132>.

Filippidou M et al. Longitudinal evaluation of eltrombopag in paediatric acquired severe aplastic anaemia *Br J Haematol*, 2020; 190, e157–e173.

Fioredda Francesca, et al. Late-onset and long-lasting autoimmune neutropenia: an analysis from the Italian Neutropenia Registry *Blood Adv*. 2020 Nov 24; 4(22): 5644–5649.

Frickhofen N, Heimpel H, Kaltwasser JP, Schrezenmeier H; German Aplastic Anemia Study Group. Antithymocyte globulin with or without cyclosporin A: 11-year follow-up of a randomized trial comparing treatments of aplastic anemia. *Blood*. 2003;101:1236-42.

Frickhofen, N, H Heimpel, JP Kaltwasser, and H Schrezenmeier. Antithymocyte Globulin with or without Cyclosporin A: 11-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Treatments of Aplastic Anemia. *Blood* 2003, Vol. 101, No. 4, 1236-42.

Führer M, Rampf U, Baumann I, Faldum A, Niemeyer C, Janka-Schaub G, Friedrich W, Ebell W, Borkhardt A, Bender-Goetze C. Immunosuppressive therapy for aplastic anemia in children: a more severe disease predicts better survival. *Blood*. 2005;106:2102-4.

Furlong E, Carter T. Aplastic anaemia: Current concepts in diagnosis and management. *J Paediatr Child Health* 2020 Jul;56(7):1023-1028.

Gadalla, S.M., Cawthon, R., Giri, N., Alter, B.P. & Savage, S.A. Telomere length in blood, buccal cells, and fibroblasts from patients with inherited bone marrow failure syndromes. *Aging (Albany.NY)*, 2010, 2, 867–874.

Gamper CJ, Takemoto CM, Chen AR, Symons HJ, Loeb DM, Casella JF, Dezern AE, King KE, McGonigle AM, Jones RJ, Brodsky RA. High-dose Cyclophosphamide is Effective Therapy for Pediatric Severe Aplastic Anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2016 Nov;38(8):627-635.

Ganapathi KA, Townsley DM, Hsu AP, et al. GATA2 deficiency-associated bone marrow disorder differs from idiopathic aplastic anemia. *Blood*. 2015;125(1):56-70.

Gao Q, Zhang L, Zhao X, Zhu Y, Peng G, Li Y, Li Y, Li J, Song L, Ye L, Fan H, Zhou K, Yang W, Yang Y, Jing L, Zhang F. Eltrombopag, oral immunosuppressant and androgen combination therapy in twelve patients with refractory severe aplastic anemia. *Hematology*. 2020.

Gargiulo L, Zaimoku Y, Scappini B, Maruyama H, Ohumi R, Luzzatto L, Nakao S, Notaro R. Glycosylphosphatidylinositol-specific T cells, IFN- γ -producing T cells, and pathogenesis of idiopathic aplastic anemia. *Blood*. 2017 Jan 19;129(3):388-392.

Gattermann N. Guidelines on iron chelation therapy in patients with myelodysplastic syndromes and transfusional iron overload. *Leuk. Res*. 2007; 31 Suppl 3: S10-S15.

Gattermann N. Overview of guidelines on iron chelation therapy in patients with myelodysplastic syndromes and transfusional iron overload. *Int. J. Hematol*. 2008; 88: 24-29.

Geng W, Kearney S, Nelson S. Upfront eltrombopag monotherapy induces stable hematologic remission in pediatric patients with nonsevere idiopathic aplastic anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2018 Oct;65(10):e27290

Georges GE, Doney K, Storb R. Severe aplastic anemia: allogeneic bone marrow transplantation as first-line treatment. *Blood Adv*. 2018 Aug 14;2(15):2020-2028.

Georges, G.E. & Storb, R. Hematopoietic stem cell transplantation for acquired aplastic anemia. *Curr Opin Hematol*, 2016, 23, 495-500.

Ghanima W, Cooper N, Rodeghiero F, Godeau B, Bussel J.B. Thrombopoietin receptor agonists: ten years later. *Haematologica*. 2019 Jun; 104(6): 1112–1123.

Giammarco S, Van Lint MT, Lamparelli T, et al. Androgens may boost responses to antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia [abstract]. *Blood*. 2016;128(22):Abstract 3900.

Gill H, Leung G.M.K, Lopes D, Kwong Y.L. The thrombopoietin mimetics eltrombopag and romiplostim in the treatment of refractory aplastic anemia, *BJHaem* 2017.

Giudice V Feng X, Lin Z et al. Deep sequencing and flow cytometric characterization of expanded effector memory CD8+CD57+ T cells frequently reveals T-cell receptor V β oligoclonality and CDR3 homology in acquired aplastic anemia. *Haematologica* 2018: 103(5): 759-769).

Giudice V, Biancotto A, Wu Z, Cheung F, Candia J, Fantoni G, Kajigaya S, Rios O, Townsley D, Feng X, Young NS. Aptamer-based proteomics of serum and plasma in acquired aplastic anemia. *Exp Hematol*. 2018 Dec;68:38-50.

Gluckman E, Rokicka-Milewska R, Hann I, Nikiforakis E, Tavakoli F, Cohen-Scali S, Bacigalupo A; European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party for Severe Aplastic Anemia. Results and follow-up of a phase III randomized study of recombinant human-granulocyte stimulating factor as support for immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2002;119:1075-82.

Godley LA, Shimamura A. Genetic predisposition to hematologic malignancies: management and surveillance. *Blood*. 2017;130(4):424-432.

Gómez-Almaguer D, Solano-Genesta M, Tarín-Arzaga L, Herrera-Garza JL, Cantú-Rodríguez OG, Gutiérrez-Aguirre CH, Jaime-Pérez JC. Low-dose rituximab and alemtuzumab combination therapy for patients with steroid-refractory autoimmune cytopenias. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):4783-5.

Gonzalez-Casas R, Garcia-Buey L, Jones EA, Gisbert JP, Moreno-Otero R. Systematic review: hepatitis-associated aplastic anaemia - a syndrome associated with abnormal immunological function. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30 (5):436–43.

Griggs JJ, Mangu PB, Anderson H, Balaban EP, Dignam JJ, Hryniuk WM, Morrison VA, Pini TM, Runowicz CD, Rosner GL, Shayne M, Sparreboom A, Sucheston LE, Lyman GH; American Society of Clinical Oncology. Appropriate chemotherapy dosing for obese 65 adult patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2012;30:1553-61.

Groarke E.M, Patel B.A, Gutierrez-Rodrigues F, Rios O, Lotter J, Baldoni D et al. Eltrombopag added to immunosuppression for children with treatment-naive severe aplastic anaemia, *British Journal of Haematology*, 2021.

Groll AH, Castagnola E, Cesaro S, Dalle JH, Engelhard D, Hope W, Roilides E, Styczynski J, Warris A, Lehrnbecher T; Fourth European Conference on Infections in Leukaemia; Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood Marrow Transplantation (EBMT-IDWP); Infectious Diseases Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC-IDG); International Immunocompromised Host Society (ICHS); European Leukaemia Net (ELN). Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation. *Lancet Oncol*. 2014 Jul;15(8):e327-40).

Groth Martha , Singer Susanne, Niedeggen Cathrin , Petermann-Meyer Andrea , Röth Alexander, Schrezenmeier Hubert, Höchsmann Britta , Brümmendorf Jens Panse Tim H. Development of a disease-specific quality of life questionnaire for patients with aplastic anemia and/or paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (QLQ-AA/PNH)-report on phases I and II *Ann Hematol*. 2017 Feb;96(2):171-181.

Gu C, Zhu X, Qiao X, Zhai X, Shi W, Xie X. Multivariate logistic analysis of predictors of response to immunosuppressive therapy in children with aplastic anemia: a double-center study. *Hematology*. 2019 Dec;24(1):282-289.

Guida alle Controindicazioni alle Vaccinazioni 2018 http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2759_allegato.pdf (accessed December 14, 2019).

Guinan EC. Diagnosis and management of aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011; 2011:76-81.

Gupta V, Brooker C, Tooze JA, Yi QL, Sage D, Turner D, Kangasabapathy P, Marsh JC. Clinical relevance of cytogenetic abnormalities at diagnosis of acquired aplastic anaemia in adults. *Br J Haematol*. 2006;134:95-9.

Gupta V, Gordon-Smith EC, Cook G, Parker A, Duguid JK, Wilson KM, Yi QL, Marsh JC. A third course of anti-thymocyte globulin in aplastic anaemia is only beneficial in previous responders. *Br J Haematol*. 2005;129:110-7.

Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1996;87:5332-40.

Harde M, Dave S, Vasave RR, Gujjar P, Bhadade R. Lower segment cesarean section in a patient with severe thrombocytopenia and pregnancy induced hypertension. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2013;29(3):387–389.

Hartung HD, Olson TS, Bessler M. Acquired aplastic anemia in children. *Pediatr Clin North Am*. 2013 Dec;60(6):1311-36.

Hartung HD., Olson TS., Bessler M. Acquired Aplastic Anemia in Children *Pediatr Clin North Am*. 2013 December; 60(6): 1311–1336.

Hasle H. Myeloidplastic and myeloproliferative disorders in children. *Curr Opin Pediatr*. 2007;19:1-8.

Hayakawa J, Kanda J, Akahoshi Y, Harada N, Kameda K, Ugai T, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako-Saito K, Kimura SI, Kikuchi M, Yamazaki R, Kako S, Kanda Y.

Meta-analysis of treatment with rabbit and horse antithymocyte globulin for aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2017 May;105(5):578-586.

Heddle, N.M., Arnold, D.M., Boye, D., Webert, K.E., Resz, I. & Dumont, L.J. Comparing the efficacy and safety of apheresis and whole blood-derived platelet transfusions: a systematic review. *Transfusion*, 2008; 48, 1447–1458.

Helge D. Hartung, MDa, Timothy S. Olson, MD, PhD, and Monica Bessler, MD, PhD Acquired Aplastic Anemia in Children. *Pediatr Clin North Am*. 2013 December; 60(6): 1311–1336.

Hendry C. L., Sivakumaran M., Marsh J. C. W., Gordon-Smith E. C. Relapse of severe aplastic anaemia after influenza immunization. *British Journal of Haematology* 2002, 11, 283–284.

Hermans B.C.M., Zanders M.M., Van Oostrum N.H.M., Kuijper P.H.M., Nieuwenhuizen L. Successful treatment of aplastic anaemia with cyclosporine during pregnancy. *The Netherlands Journal of Medicine* 2019, Vol. 77.

Hilgendorf I, Freund M, Jilg W, et al. Vaccination of allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients: report from the international consensus conference on clinical practice in chronic GVHD. *Vaccine* 2011;29:2825-33.

Höchsmann B, Moicean A, Risitano A, Ljungman P, Schrezenmeier HSO. Supportive care in severe and very severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:168-73.

Hoelle W, Beck J F, Dueckers G, Kreyenberg H, Lang P, Gruhn B, Führer M, Niethammer D, Klingebiel T and Bader P. Clinical relevance of serial quantitative analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation in children for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplantation* 2004, 33, 219–223.

Hosokawa K, Yamazaki H, Tanabe M, Imi T, Sugimori N, Nakao S. High-dose romiplostim accelerates hematologic recovery in patients with aplastic anemia refractory to eltrombopag, *Leukemia*, 2020.

Howard SC, Naidu PE, Hu XJ, Jeng MR, Rodriguez-Galindo C, Rieman MD, Wang WC. Natural history of moderate aplastic anemia in children. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;43:545-51.

Huo J, Li X, Shao Y, Ren X, Ge M, You Y, Huang J, Zhang J, Wang M, Nie N, Jin P, Zheng Y. Long-term follow-up of a novel immunosuppressive strategy of cyclosporine alternatively combined with levamisole for severe aplastic anemia. *Ann Hematol*. 2020 Aug;99(8):1727-1734.

Iftikhar R, Chaudhry QUN, Anwer F, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in aplastic anemia: current indications and transplant strategies. *Blood Rev*. 2020 Oct 31:100772

Ikawa Y, Nishimura R, Kuroda R, Mase S, Araki R, Maeba H, Wada T, Toma T, Koizumi S, Yachie A. Expansion of a liver infiltrating cytotoxic T-lymphocyte clone in concert with the development of hepatitis-associated aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2013; 161 (4): 599–602.

Im, H.J., Koh, K.N., Choi, E.S., Jang, S., Kwon, S.W., Park, C.-J., Chi, H.-S. & Seo, J.J. Excellent Outcome of Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children and Adolescents with Acquired Severe Aplastic Anemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2013a,19, 754-759.

Inamoto Y, Flowers ME, Wang T, et al. Tacrolimus versus cyclosporine after hematopoietic cell transplantation for acquired aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21:1776–1782.

Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y, Endo Y, Nishimura J, Kurokawa K, Kuwayama M, Shime H, Machii T, Kanakura Y, Meyers G, Wittwer C, Chen Z, Babcock W, Frei-Lahr D, Parker CJ, Kinoshita T. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2006;108:4232-6.

Ise M, Lizuka H, Kamoda Y, Hirao M, Kida M, Usuki K. Romiplostim is effective for eltrombopag-refractory aplastic anemia: results of a retrospective study, *Lancet Haematol* 2019.

Ishiyama K, Chuhjo T, Wang H, Yachie A, Omine M, Nakao S Polyclonal hematopoiesis maintained in patients with bone marrow failure harboring a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells. *Blood*. 2003;102:1211-6.

Isidori A, Borin L, Elli E, Latagliata R, Martino B, Palumbo G, Pilo F, Loscocco F, Visani G, Cianciulli P. Iron toxicity - Its effect on the bone marrow. *Blood Rev*. 2018 Nov;32(6):473-479.

Jaime-Pérez JC, Colunga-Pedraza PR, Gómez-Ramírez CD, Gutiérrez-Aguirre CH, Cantú-Rodríguez OG, Tarín-Arzaga LC, Gómez-Almaguer D. Danazol as first-line therapy for aplastic anemia. *Ann Hematol*. 2011;90:523-7.

Jain R, Trehan A, Bansal D, Varma N. Aplastic anemia in children: How good is immunosuppressive therapy? *Pediatr Hematol Oncol*. 2019 May;36(4):211-221.

Jeong DC, Chung NG, Cho B, Zou Y, Ruan M, Takahashi Y, Muramatsu H, Ohara A, Kosaka Y, Yang W, Kim HK, Zhu X, Kojima S. Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia in children. *Haematologica* 2014 Apr;99(4):664-71.

Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, Rajala H, Gómez-Seguí I, Olson T, McGraw K, Przychodzen B, Kulasekararaj A, Afable M, Husseinazadeh HD, Hosono N, LeBlanc F, Lagström S, Zhang D, Ellonen P, Tichelli A, Nissen C, Lichtin AE, Wodnar-Filipowicz A, Mufti GJ, List AF, Mustjoki S, Loughran TP Jr, Maciejewski JP. STAT3 mutations indicate the presence of subclinical T-cell clones in a subset of aplastic anemia and myelodysplastic syndrome patients. *Blood*. 2013 Oct 3;122(14):2453-9.

Jiang S, Wang Y, Shi W, Shao Y, Qiao X, Lin J, Kuang H, Xie X. The benefit of ATG in immunosuppressive therapy of children with moderate aplastic anemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2009;26:313-20.

Kahan BD, Gibbons S, Tejpal N, Chou TC, Stepkowski S. Synergistic effect of the rapamycin-cyclosporine combination: median effect analysis of in vitro immune performances by human T lymphocytes in PHA, CD3, and MLR proliferative and cytotoxicity assays. *Transplant Proc* 1991;23:1090-1.

Kallon D, Navarrete CV, Sage DA, Stanworth S, Mufti GJ, Marsh JCW, Brown CJ. Impact of Human Leucocyte Antigen epitope matched platelet transfusions in alloimmunised aplastic anaemia patients. *Transfus Med*. 2020 Feb;30(1):23-29.

Kaminsky E.R, Hows J.M, Goldman J.M, Batchelor J.R. Pretransfused patients with severe aplastic anaemia exhibit high numbers of cytotoxic T lymphocyte precursors probable directed at non-HLA antigens. *British Journal of Haematology*, 1990 76, 401–405.

Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica*. 2011 Jun;96(6):814-9.

Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica*. 2011 Jun;96(6):814-9.

Kang HJ, Hong KT, Lee JW, et al. Improved Outcome of a Reduced Toxicity-Fludarabine, Cyclophosphamide, plus Antithymocyte Globulin Conditioning Regimen for Unrelated Donor Transplantation in Severe Aplastic Anemia: Comparison of 2 Multicenter Prospective Studies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Aug;22(8):1455-1459.

Kang HJ, Shin HY, Park JE, Chung NG, Cho B, Kim HK, Kim SY, Lee YH, Lim YT, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Im HJ, Seo JJ, Park SK, Ahn HS; Korean Society of Pediatric Hematology-Oncology. Successful engraftment with fludarabine, cyclophosphamide, and thymoglobulin conditioning regimen in unrelated transplantation for severe aplastic anemia: A phase II prospective multicenter study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16: 1582-8.

Karadimitris A, Manavalan JS, Thaler HT, Notaro R, Araten DJ, Nafa K, Roberts IA, Weksler ME, Luzzatto L. Abnormal T-cell repertoire is consistent with immune process underlying the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2000;96:2613-20.

Kekre N, Zhang Y, Zhang MJ, et al. Effect of antithymocyte globulin source on outcomes of bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Haematologica*. 2017 Jul;102(7):1291-1298.

Kennedy LB, Li Z, Savani BN, et al. Measuring immune response to commonly used vaccinations in adult recipients of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23:1614-21.

Khoury IF, Keating M, Körbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, Giralt S, Ippoliti C, von Wolff B, Gajewski J, Donato M, Claxton D, Ueno N, Andersson B, Gee A, Champlin R. Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol*. 1998;16:2817-24.

Khurana H, Malhotra P, Sachdeva MU, et al. Danazol increases T regulatory cells in patients with aplastic anemia. *Hematology*. 2018 Sep;23(8):496–500.

Killick SB et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anemia. *Br j Haematol* 2016; 172:187-207.

Killick SB, Bown N, Cavenagh J, Dokal I, Foukaneli T, Hill A, Hillmen P, Ireland R, Kulasekararaj A, Mufti G, Snowden JA, Samarasinghe S, Wood A, Marsh JC; British Society for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2016 Jan;172(2):187-207.

Killick S., Win N, Marsh J.C, Kaye T, Yandle A, Humphries C, Knowles S.M, Gordon-Smith E.C. Pilot study of HLA alloimmunisation after transfusion with pre-storage leucodepleted blood products in aplastic anaemia. *British Journal of Haematology*, 1997, 97, 677–684.

Kim H, Min YJ, Baek JH, Shin SJ, Lee EH, Noh EK, Kim MY, Park JH. A pilot dose-escalating study of alemtuzumab plus cyclosporine for patients with bone marrow failure syndrome. *Leuk Res*. 2009 Feb;33(2):222-31.

Kim IH, Moon JH, Lim SN, Sohn SK, Kim HG, Lee GW, Kim YS, Lee HS, Kwon KY, Kim SH, Park KT, Chung JS, Lee WS, Lee SM, Hyun MS, Kim H, Ryoo HM, Bae SH, Joo YD. Efficacy and safety of deferasirox estimated by serum ferritin and labile plasma iron levels in patients with aplastic anemia, myelodysplastic syndrome, or acute myeloid leukemia with transfusional iron overload. *Transfusion*. 2015 Jul;55(7):1613-20.

Kimmo Weisshaar , Hannah Ewald , Jörg Halter , Sabine Gerull , Sandra Schönfeld , Yuliya Senft, Maria Martinez , Anne Leuppi-Taegtmeyer , Nina Khanna , Birgit Maier , Antonio Risitano , Regis Peffault de Latour , Andre Tichelli , Jakob Passweg , Beatrice Drexler. Development of a patient-reported outcome questionnaire for aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PRO-AA/PNH) *Orphanet J Rare Dis* 2020 Sep 17;15(1):249.

Ko BS, Chang MC, Chiou TJ, Chang TK, Chen YC, Lin SF, Chang CS, Lu YC, Yeh SP, Chen TY, Hwang WS. Long-term safety and efficacy of deferasirox in patients with myelodysplastic syndrome, aplastic anemia and other rare anemia in Taiwan. *Hematology*. 2019 Dec;24(1):247-254.

Koh KN, Park M, Kim BE, Im HJ, Seo JJ. Restoration of hematopoiesis after iron chelation therapy with deferasirox in 2 children with severe aplastic anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010 Nov;32(8):611-4.

Kohgo Y, Urabe A, Kiliñç Y, Agaoglu L, Warzocha K, Miyamura K, Lim LC, Glaser S, Wang C, Wiktor-Jedrzejczak W. Deferasirox Decreases Liver Iron Concentration in Iron-Overloaded Patients with Myelodysplastic Syndromes, Aplastic Anemia and Other Rare Anemias. *Acta Haematol.* 2015;134(4):233-42.

Kojima S, Horibe K, Inaba J, Yoshimi A, Takahashi Y, Kudo K et al. Long-term outcome of acquired aplastic anemia in children: comparison between immunosuppressive therapy and bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 2000; 111:321–328

Kojima S, Matsuyama T, Kato S, Kigasawa H, Kobayashi R, Kikuta A, Sakamaki H, Ikuta K, Tsuchida M, Hoshi Y, Morishima Y, Kodera Y. Outcome of 154 patients with severe aplastic anemia who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program. *Blood.* 2002;100:799-803.

Kojima S, Nakao S, Young N, Bacigalupo A, Gerard G, Hirano N, Maciejewski J, Deeg J, Marsh J, Zhang FK, Lee JW, Ozawa K. The Third Consensus Conference on the treatment of aplastic anemia. *Int J Hematol.* 2011;93:832-7.

Konopacki J, Porcher R, Robin M, Bieri S, Cayuela JM, Larghero J, Xhaard A, Andreoli AL, Dhedin N, Petropoulou A, Rodriguez-Otero P, Ribaud P, Moins-Teisserenc H, Carmagnat M, Toubert A, Chalandon Y, Socie G, Peffault de Latour R. Long-term follow up after allogeneic stem cell transplantation in patients with severe aplastic anemia after cyclophosphamide plus antithymocyte globulin conditioning. *Haematologica.* 2012;97:710-6.

Kook H, Chung NG, Kang HJ, Im HJ. Acquired aplastic anemia in Korean children: treatment guidelines from the Bone Marrow Failure Committee of the Korean Society of Pediatric Hematology Oncology. *Int J Hematol.* 2016 Apr;103(4):380-6.

Kordasti S, Costantini B, Seidl T, et al. Deep phenotyping of Tregs identifies an immune signature for idiopathic aplastic anemia and predicts response to treatment. *Blood.* 2016 Sep 1;128(9):1193–1205.

Kordasti S, Marsh J, Al-Khan S, et al. Functional characterization of CD4+ T cells in aplastic anemia. *Blood* 2012;119(9):2033-2043

Koreth J, Antin JH. Iron overload in hematologic malignancies and outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2010; 95: 364-366.

Korthof ET, Békássy AN, Hussein AA. Management of acquired aplastic anemia in children. *Bone Marrow Transplant.* 2013;4:191-95.

Korthof ET, Svahn J, Peffault de Latour R, et al. Immunological profile of Fanconi anemia: a multicentric retrospective analysis of 61 patients. *Am J Hematol.* 2013;88(6):472-476.

Kosaka Y et al. Prospective multicenter trial comparing repeated immunosuppressive therapy with stem-cell transplantation from an alternative donor as second-line treatment for children with severe and very severe aplastic anemia. *Blood* 2008; 111(3):1054-1059 *Blood* 2008 Feb 1;111(3):1054-9.

Krečak I, Šupe M, Ilić I, Gverić-Krečak V. Behçet-like syndrome associated with aplastic anemia successfully treated with mycophenolate mofetil. *Ann Hematol.* 2020 Jun 13.

Kudo K, Muramatsu H, Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Tabuchi K et al. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50: 1312-1315.

Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* 2014; 345:1623-7.

Kulasekararaj AG, Jiang J, Smith AE et al. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2014;124(17):2698-704.

- Kulkarni S, Sastry PS, Saikia TK, et al. Antilymphocyte globulin (ALG) or antithymocyte globulin (ATG) with methylprednisone and oxymethalone in aplastic anaemia. *J Assoc Physicians India*. 1997;45(4):263–266.
- Kuwatsuka Y, Kanda J, Yamazaki H et al. Comparison of Outcomes for Cord Blood Transplantation and Unrelated Bone Marrow Transplantation in Adult Aplastic Anemia. *Biology of Blood and Marrow Transplant*. 2016;22:1836-1843.
- Lan Y, Chang L, Yi M, Cai Y, Feng J, Ren Y, Liu C, Chen X, Wang S, Guo Y, Zhang A, Liu L, Zhang J, Zhu X. Long-term outcomes of 172 children with severe aplastic anemia treated with rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine. *Ann Hematol*. 2021 Jan;100(1):53-61.
- Laundy GJ, Bradley BA, Rees BM, Younie M, Hows JM. Incidence and specificity of HLA antibodies in multitransfused patients with acquired aplastic anemia. *Transfusion*. 2004 Jun;44(6):814-25.
- Lawler, M., McCann, S.R., Marsh, J.C., Ljungman, P., Hows, J., Van- denberghe, E., O’Riordan, J., Locasciulli, A., Socie ´, G., Kelly, A., Schrezenmeier, H., Marin, P., Tichelli, A., Passweg, J.R., Dickenson, A., Ryan, J. & Bacigalupo, A., for the Severe Aplastic Anaemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): indication for routine assessment of chimerism post SCT for SAA. *British Journal of Haematology*, 2009, 144, 933–945.
- Lee J.W, Lee S.E, Jung C.W, Park S et al. Romiplostim in patients with refractory aplastic anaemia previously treated with immunosuppressive therapy: a dose-finding and long-term treatment phase 2 trial, *Lancet Haematol* 2019.
- Lee JW, Yoon SS, Shen ZX, Ganzer A, Hsu HC, Habr D et al. Iron chelation therapy with deferasirox in patients with aplastic anemia: a subgroup analysis of 116 patients from the EPIC trial. *Blood*. 2010; 116: 2448-2454
- Lee JW. Iron chelation therapy in the myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: a review of experience in South Korea. *Int. J. Hematol*. 2008; 88: 16-23.
- Lee PY. Vasculopathy, Immunodeficiency, and Bone Marrow Failure: The Intriguing Syndrome Caused by Deficiency of Adenosine Deaminase 2. *Front Pediatr*. 2018;6:282.
- Lee SE, Yahng SA, Cho BS, Eom KS, Kim YJ, Kim HJ, Min CK, Lee S, Cho SG, Kim DW, Min WS, Lee JW. Impact of pretransplant red cell transfusion on outcome after allogeneic stem cell transplantation in adult patients with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2016 Oct;51(10):1323-132. Epub 2016 May 23.
- Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K, American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 20; 24(18):2917-31.
- Leleu X, Terriou L, Duhamel A, Moreau AS, Andrieux J, Dupire S, Coiteux V, Berthon C, Micol JB, Guieze R, Facon T, Bauters F. Long-term outcome in acquired aplastic anemia treated with an intensified dose schedule of horse antilymphocyte globulin in combination with androgens. *Ann Hematol*. 2006;85:711-6.
- Lengline E, Drenou B, Peterlin P, Tournilhac O, Abraham J, Berceanu A, Dupriez B et al. Nationwide survey on the use of eltrombopag in patients with severe aplastic anemia: a report on behalf of the French Reference center for Aplastic anemia, *Haematologica* 2018.
- Levy GA. C2 monitoring strategy for optimising cyclosporin immunosuppression from the Neoral formulation. *BioDrugs*. 2001;15:279-90.
- Li B, Liang MY, Zhang Y, Wand SM, Zhang XH. Aplastic anemia associated with pregnancy: maternal and fetal complications. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016;29(7):1120–1124.

Li, Z., Wang, Y., Wang, J., Zhang, J. & Wang, Z. Successful haploidentical stem cell transplantation for three adults with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Bone Marrow Transplant* 2017, 52, 330-333.

Limin Liu , Yanming Zhang, Wenjing Jiao , Huifen Zhou, Qingyuan Wang, Song Jin, Yifeng Cai , Liyun Zhao , Xiaohui Shangguan , Zefa Liu , Jing Xu, Meiqing Lei , Xiaoyun Yan, Miao Miao Depei Wu. Comparison of efficacy and health-related quality of life of first-line haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with unrelated cord blood infusion and first-line immunosuppressive therapy for acquired severe aplastic anemia. *Leukemia* 2020 Dec; 34(12):3359-33.

Lin FC, Karwan M, Saleh B, et al. IFN- γ causes aplastic anemia by altering hematopoietic stem/progenitor cell composition and disrupting lineage differentiation. *Blood*. 2014.

Liu CY, Fu R, Wang HQ, Li LJ, Liu H, Guan J, Wang T, Qi WW, Ruan EB, Qu W, Wang GJ, Liu H, Wu YH, Song J, Xing LM, Shao ZH. Fas/FasL in the immune pathogenesis of severe aplastic anemia. *Genet Mol Res*. 2014 May 30;13(2):4083-8.

Liu HL, Sun ZM, Geng LQ, et al. Unrelated cord blood transplantation for newly diagnosed patients with severe acquired aplastic anemia using reduced-intensity conditioning: high graft rejection, but good survival. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47:1186-1190.

Liu L, Zhang Y, Jiao W, Zhou H, Wang Q, Jin S, Cai Y, Zhao L, Shangguan X, Liu Z, Xu J, Lei M, Yan X, Miao M, Wu D. Comparison of efficacy and health-related quality of life of first-line haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with unrelated cord blood infusion and first-line immunosuppressive therapy for acquired severe aplastic anemia. *Leukemia*. 2020 Dec;34(12):3359-3369.

Liu LP, Chen XJ, Yang WY, Yi MH, Zhou K, Ruan M, Liu F, Chen X, Chang LX, Liu TF, Zhang L, Zou Y, Chen YM, Zhang FK, Zhu XF, Guo Y. Predicting response to porcine antilymphocyte globulin plus cyclosporine A in children with acquired severe aplastic anemia. *Pediatr Res*. 2019 Sep;86(3):360-364.

Liu Q, Zhao X, Xu N, Huang P, Li S, Zhang F, Wang J. Frontline therapy of severe aplastic anaemia with fludarabine, cyclophosphamide and ciclosporin. *Br J Haematol*. 2015 Nov;171(3):427-30.

Locasciulli A, Bacigalupo A, Bruno B, Montante B, Marsh J, Tichelli A, Socié G, Passweg J. Hepatitis-associated aplastic anaemia: epidemiology and treatment results obtained in Europe. A report of The EBMT aplastic anaemia working party: Hepatitis-Associated Aplasia: epidemiology and outcome. *Br J Haematol* 2010; 149 (6): 890–5.

Locasciulli A, Oneto R, Bacigalupo A, Socié G, Korthof E, Bekassy A, Schrezenmeier H, Passweg J, Führer M; Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group. Outcome of patients with acquired aplastic anemia given first line bone marrow transplantation or immunosuppressive treatment in the last decade: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica*. 2007;92:11-8.

Locatelli F, Bruno B, Zecca M, Van-Lint MT, McCann S, Arcese W, Dallorso S, Di Bartolomeo P, Fagioli F, Locasciulli A, Lawler M, Bacigalupo A. Cyclosporin A and shortterm methotrexate versus cyclosporin A as graft versus host disease pro-phylaxis in patients with severe aplastic anemia given allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling: results of a GITMO/EBMT randomized trial. *Blood* 2000;96:1690–1697.

Lu, Y., Sun, R.J., Zhao, Y.L., Xiong, M., Cao, X.Y., Zhang, J.P., Wei, Z.J., Zhou, J.R., Liu, D.Y. & Lu, D.P. Unmanipulated Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation Achieved Outcomes Comparable With Matched Unrelated Donor Transplantation in Young Acquired Severe Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018, 24, 1881-1887.

Luzzatto L, Karadimitris A. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH): novel therapies for an ancient disease. *Br J Haematol*. 2020 Nov;191(4):579-586.

Maciejewski JP, Follmann D, Nakamura R, Sauntharajah Y, Rivera CE, Simonis T, Brown KE, Barrett JA, Young NS. Increased frequency of HLA-DR2 in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the PNH/aplastic anemia syndrome. *Blood*. 2001; 98:3513-9.

Maciejewski JP, Risitano A, Sloand EM, Nunez O, Yang NS. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. *Blood*, 2002; 99, 3129-3135.

Mandal PK, Baul S, Dolai TK, De R, Chakrabarti P. Outcome of Cyclosporine Monotherapy in Patients of Aplastic Anemia: Experience of a Tertiary Care Hospital in Eastern India. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2017 Mar;33(1):144-147.

Mansi Sachdev , Minakshi Bansal , Sohini Chakraborty , Sachin Jain , Rahul Bhargava , Vikas Dua. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Offer Good Outcomes in Pediatric Aplastic Anemia: Experience From Developing World. *Pediatr Hematol Oncol* .2020 Oct 28.

Marsh J, Schrezenmeier H, Marin P, Ilhan O, Ljungman P, McCann S, Socie G, Tichelli A, Passweg J, Hows J, Raghavachar A, Locasciulli A, Bacigalupo A. Prospective randomized multicenter study comparing cyclosporin alone versus the combination of antithymocyte globulin and cyclosporin for treatment of patients with nonsevere aplastic anemia: a report from the European Blood and Marrow Transplant (EBMT) Severe Aplastic Anaemia Working Party. *Blood*. 1999;93:2191-5.

Marsh J, Socie G, Tichelli A, Schrezenmeier H, Hochsmann B, Risitano AM, Fuehrer M, Bekassy AN, Korthof ET, Locasciulli A, Ljungman P, Bacigalupo A, Camitta B, Young NS, Passweg J; European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Severe Aplastic Anaemia Working Party. Should irradiated blood products be given routinely to all patients with aplastic anaemia undergoing immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin (ATG)? A survey from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Severe Aplastic Anaemia Working Party. *Br J Haematol*. 2010;150:377-9.

Marsh JC, Bacigalupo A, Schrezenmeier H, Tichelli A, Risitano AM, Passweg JR, Killick SB, Warren AJ, Foukaneli T, Aljurf M, Al-Zahrani HA, Höchsmann B, Schafhausen P, Roth A, Franzke A, Brummendorf TH, Dufour C, Oneto R, Sedgwick P, Barrois A, Kordasti S, Elebute MO, Mufti GJ, Socie G; European Blood and Marrow Transplant Group Severe Aplastic Anaemia Working Party. Prospective study of rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for aplastic anemia from the EBMT Severe Aplastic Anaemia Working Party. *Blood*. 2012 Jun 7;119(23):5391-6. Erratum in: *Blood*. 2013 Jun 20;121(25):5104. Höchsmann, Britta [added].

Marsh JC, Ball SE, Cavenagh J, Darbyshire P, Dokal I, Gordon-Smith EC, Keidan J, Laurie A, Martin A, Mercieca J, Killick SB, Stewart R, Yin JA; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2009 Oct;147(1):43-70.

Marsh JC, Gupta V, Lim Z, Ho AY, Ireland RM, Hayden J, Potter V, Koh MB, Islam MS, Russell N, Marks DI, Mufti GJ, Pagliuca A. Alemtuzumab with fludarabine and cyclophosphamide reduces chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation for acquired aplastic anemia. *Blood*. 2011;118:2351-7.

Marsh JC, Pearce RM, Koh MB, Lim Z, Pagliuca A, Mufti GJ, Perry J, Snowden JA, Vora AJ, Wynn RT, Russell N, Gibson B, Gilleece M, Milligan D, Veys P, Samarasinghe S, McMullin M, Kirkland K, Cook G; British Society for Blood and Marrow Transplantation, Clinical Trials Committee. Retrospective study of alemtuzumab vs ATG-based conditioning without irradiation for unrelated and matched sibling donor transplants in acquired severe aplastic anemia: a study from the British Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Jan;49(1):42-8.

Marsh JC, Stanworth S, Pankhurst LA, Kallon D, Gilbertson A, Pigden C, Deary AJ, Mora A, Brown J, Laing ES, Choo LL, Hodge R, Llewelyn CA, Harding K, Sage S, Mijovic A, Mufti GJ, Navarrete CV, Brown CJ. An epitope-based approach to use of HLA matched platelets for transfusion: a noninferiority, cross-over, randomised trial. *Blood*. 2020 Oct 16;blood.2020007199.

Marsh, J. C., S. E. Ball, J. Cavenagh, P. Darbyshire, I. Dokal, E. C. Gordon-Smith, J. Keidan, A. Laurie, A. Martin, J. Mercieca, S. B. Killick, R. Stewart, J. A. Yin, and British Committee for Standards in Haematology. 'Guidelines for the Diagnosis and Management of Aplastic Anaemia.', *Br J Haematol* 2009. Vol. 147, No. 1, 43-70.

Martire B, Azzari C, Badolato R, Canessa C, Cirillo E, Gallo V, Graziani S, Lorenzini T, Milito C, Panza R, Moschese V; with Italian Network for Primary Immunodeficiencies (IPINET). Vaccination in immunocompromised host: Recommendations of Italian Primary Immunodeficiency Network Centers (IPINET). *Vaccine*. 2018 Jun 7;36(24):3541-3554.

Martire B., Moschese V., Badolato R., Azzari C., Aiuti A, Paganelli R., Duse M., Quinti I., Pignata C. Indicazioni ad interim su "Vaccinazione anti SARS-CoV-2 nei soggetti con disordini congeniti dell'immunità " Rete Italiana delle Immunodeficienze Primitive (IPINET) Società Italiana di Allergologia e Immunologia Pediatrica (SIAIP) <https://www.aip-it.org/index.php/vaccino-anti-covid-19-le-indicazioni-del-comitato-scientifico-aip-odv>

Maury S, Bacigalupo A, Anderlini P, et al. Improved outcome of patients older than 30 years receiving HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for severe acquired aplastic anemia using fludarabine-based conditioning: a comparison with conventional conditioning regimen. *Haematologica* 2009; 94:1312–1315.

Mehta Hrishikesh M, Malandra Michael , Corey Seth J et al. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia Review. *J Immunol*. 2015 Aug 15;195(4):1341-9

Meletis, J., Samarkos, M., Mesogitis, S., Melitis, C., Mouggiou, A., Terpos, E., Tsimberidou, A., Andreopoulos, A., Konstantopoulos, K. & Loukopoulos, D. Severe aplastic anaemia relapsing during a pregnancy; spontaneous remission following a termination. *Haematologica* 1998, 29, 147–151.

Mercuri A, Farruggia P, Timeus F, Lombardi L, Onofrillo D, Putti MC, Pillon M, Cantarini ME, Corti P, Tridello G, De Bortoli M, Pegoraro A, Cesaro S. A retrospective study of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric and adolescent patients. *Blood Cells Mol Dis* 2017 May;64:45-50.

Merli P, Strocchio L, Vinti L, Palumbo G, Locatelli F. Eltrombopag for treatment of thrombocytopenia-associated disorders. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;16(14):2243-56.

Michel Marc, Ruggeri Marco, Gonzalez-Lopez Tomas Jose, Alkindi Salam et al. Use of thrombopoietin receptor agonists for immune thrombocytopenia in pregnancy: results from a multicenter study. *Blood*. 2020 Dec 24;136(26):3056-3061.

Michniacki TF, HannibalM, Ross CW, Frame DG, DuVall AS, Khoriaty R, Vander Lugt MT, Walkovich KJ. Hematologic Manifestations of Deficiency of Adenosine Deaminase 2 (DADA2) and Response to Tumor Necrosis Factor Inhibition in DADA2-Associated Bone Marrow Failure. *J Clin Immunol* 2018 Feb;38(2):166-173.

Moen V, Dahlgren N, Irestedt L. Severe neurological complications after central neuraxial blockades in Sweden 1990–1999. *Anesthesiology*. 2004;101(4):950–959.

Mohseny AB, Eikema DA, Neven B, Kröger N, Shaw PJ, Damaj G, Dalle JH, Bosman PV, Delehave F, Lankester AC, Smiers FJ, Peffault de Latour R. Hematopoietic stem cell transplantation for hepatitis-associated aplastic anemia following liver transplantation for nonviral hepatitis: a retrospective analysis and a review of the literature by the Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (SAAWP-EBMT). *J Pediatric Hematol Oncol*. 2020.

Moncharmont P, Quittançon E, Barday G, Benamara A, les Correspondants d'Hémovigilance et de sécurité transfusionnelle Auvergne Rhône Alpes. Adverse transfusion reactions in patients with aplastic anaemia or myelodysplastic syndromes. *Vox Sang*. 2019 May;114(4):349-354.

- Montané E, Ibáñez L, Vidal X, Ballarín E, Puig R, García N, Laporte JR; Catalan Group for Study of Agranulocytosis and Aplastic Anemia. Epidemiology of aplastic anemia: a prospective multicenter study. *Haematologica*.2008;93:518-23.
- Mori H, Nakagawa M, Itoh N, Wada K, Tamaya T. Danazol suppresses the production of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor by human monocytes. *Am J Reprod Immunol*. 1990;24:45-50.
- Mori T, Onishi Y, Ozawa Y, Kato C, Kai T, Kanda Y, Kurokawa M, Tanaka M, Ashida T, Sawayama Y, Fukuda T, Ichinohe T, Atsuta Y, Yamazaki H. Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients with hepatitis-associated aplastic anemia. *Int J Hematol* 2019; 109 (6): 711–7.
- Mortensen BK et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for severe aplastic anemia: similar long-term overall survival after transplantation with related donors compared to unrelated donors. *Bone Marrow Transplantation* (2016).
- Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, Ohta R, Noji H, Maeda Y, Nishimura J, Kanakura Y, Kinoshita T. Deregulated expression of HMGA2 is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2012;156:383-7.
- Nakao et al. Clinical Significance of a Small Population of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria–Type Cells in the Management of Bone Marrow Failure. *Int J Hematol*. 2006;84:118-122.
- Narita A, Kojima S. Biomarkers for predicting clinical response to immunosuppressive therapy in aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2016 Aug;104(2):153-8.
- Narita A, Muramatsu H, Sekiya Y, Okuno Y, Sakaguchi H, Nishio N, Yoshida N, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Doisaki S, Hama A, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Kobayashi M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia. *Haematologica* 2015 Dec;100(12):1546-52.
- Niemeyer CM, Baumann I. Classification of childhood AA and MDS. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:84-9.
- Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, Decastro CM, Hall S, Kanamaru A, Sullivan KM, Mizoguchi H, Omine M, Kinoshita T, Rosse WF. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)*. 2004;83:193-207.
- Nishio N, Yagasaki H, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Yoshida N, Kudo K, Kojima S. Natural history of transfusion-independent non-severe aplastic anemia in children. *Int J Hematol*. 2009 May;89(4):409-413.
- Niu H, Qi W, Wang Y, Xing L, Fu R, Shao Z, Wang H. Successful sirolimus therapy of an aplastic anemia patient with chronic kidney disease: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Jun 5;99(23):e20669.
- Ohara A, Kojima S, Hamajima N, Tsuchida M, Imashuku S, Ohta S, Sasaki H, Okamura J, Sugita K, Kigasawa H, Kiriama Y, Akatsuka J, Tsukimoto I. Myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia as a late clonal complication in children with acquired aplastic anemia. *Blood*. 1997;90:1009-13.
- Oleaga-Quintas C, de Oliveira-Júnior EB, Rosain J, et al. Inherited GATA2 Deficiency Is Dominant by Haploinsufficiency and Displays Incomplete Clinical Penetrance. *J Clin Immunol*. January 2021.
- Olkinuora H, Käyhty H, Davidkin I, et al. Immunity after (re)vaccination of paediatric patients following haematopoietic stem cell transplantation. *Acta Paediatr* 2012;101:373.
- Olnes MJ, Scheinberg P, Calvo KR, Desmond R, Tang Y, Dumitriu B, Parikh AR, Soto S, Biancotto A, Feng X, Lozier J, Wu CO, Young NS, Dunbar CE. Eltrombopag and improved hematopoiesis in refractory aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2012;367:11-9.

Oosterkamp HM, Brand A, Kluin-Nelemans JC, Vandenbroucke JP. Pregnancy and severe aplastic anaemia: causal relation or coincidence? *Br J Haematol*. 1998;103(2):315–316.

Osugi Y, Yagasaki H, Sako M, Kosaka Y, Taga T, Ito T, Yamamoto M, Ohara A, Sato T, Mimaya J, Tsukimoto I, Kojima S. Antithymocyte globulin and cyclosporine for treatment of 44 children with hepatitis associated aplastic anemia. *Haematologica* 2007; 92(12):1687–90.

Oved JH et al. development of Hemolytic Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria without graft loss following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acquired Aplastic Anemia. *Pediatr Transplant* 2019;23(4).

Pamphilon, D.H., Rider, J.R., Barbara, J.A.J. & Williamson, L.M. Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Transfusion Medicine*, 1999, 9, 115–123.

Passweg JR, Marsh JC. Aplastic anemia: first-line treatment by immunosuppression and sibling marrow transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:36-42.

Patel BJ, Barot SV, Kuzmanovic T, Kerr C, Przychodzen BP, Thota S, Lee S, Patel S, Radivoyevitch T, Lichtin A, Advani A, Kalaycio M, Sekeres MA, Carraway HE, Maciejewski JP. Distinctive and common features of moderate aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2020 Jun;189(5):967-975.

Pawelec K, Salamonowicz M, Panasiuk A, Leszczynska E, Krawczuk-Rybak M, Demkow U, Matysiak M. Influence of Iron Overload on Immunosuppressive Therapy in Children with Severe Aplastic Anemia. *Adv Exp Med Biol*. 2015;866:83-9.

Paziana K, Del Monaco M, Cardonick E, et al. Ciclosporin use during pregnancy. *Drug Saf*. 2013;36(5):279–294.

Peffault de Latour R, Chevret S, Jubert C, Sirvent A, Galambrun C, Ruggeri A, Gandemer V, Cornillon J, Rialland F, Dalle JH, Forcade E, Bruno B, Paillard C, Rorlich PS, Salmon A, Fürst S, Sicre de Fontbrune F, Rubio MT, Bay JO, Mohty M, Larghero J, Gluckman E, Socié G; Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy. Unrelated cord blood transplantation in patients with idiopathic refractory severe aplastic anemia: a nationwide phase 2 study. *Blood*. 2018 Aug 16;132(7):750-754.

Peffault de Latour R, Marsh J, Iacobelli S, Terwel S, Hill A et al. Results of the EBMT Saawp Phase III Prospective Randomized Multicenter Race Study of Horse ATG and Ciclosporin with or Without Eltrombopag in Naïve SAA Patient. Abstract collection. The 46th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. Bone Marrow Transplantation, 2020.

Peffault de Latour R, Mary JY, Salanoubat C et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of diseases subcategories. *Blood* 2008; 112: 3099-106

Peffault de Latour R, Risitano A, Dufour C. Severe aplastic anemia. In: *The EBMT Handbook: Hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapies*. 7th Edition. Cham (CH): Springer; 2019. Chapter 77

Peffault de Latour R, Tabrizi R, Marcais A, Leblanc T, Lamy T, Mohty M, Tavitian S, Jubert C, Pasquet M, Galambrun C, Nguyen S, Cahn JY, Braun T, Deconinck E, Bay JO, Sicre de Fontbrune F, Barraco F, Socié G. Nationwide survey on the use of horse antithymocyte globulins (ATGAM) in patients with acquired aplastic anemia: A report on behalf of the French Reference Center for Aplastic Anemia. *Am J Hematol*. 2018 May;93(5):635-642.

Perez-Albuerne ED, Eapen M, Klein J, Gross TJ, Lipton JM, Baker KS et al. Outcome of unrelated donor stem cell transplantation for children with severe aplastic anemia. *Br J Haematol* 2008; 141: 216–223.

Peslak SA, Olson T, Babushok DV. Diagnosis and Treatment of Aplastic Anemia. *Curr Treat Options Oncol*, 2018;18 (12):70.

Pfitzer C, Orawa H, Balcerek M, Langer T, Dirksen U, Keslova P, Zubarovskaya N, Schuster F R, Jarisch A, Strauss G, Borgmann-Staudt. A Dynamics of fertility impairment and recovery after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in childhood and adolescence: results from a longitudinal study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 Jan;141(1):135-42.

Piccin A, McCann S, Socié G, Oneto R, Bacigalupo A, Locasciulli A et al. Aplastic Anaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Survival of patients with documented autologous recovery after SCT for severe aplastic anemia: a study by the WPSAA of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 1008–1013.

Piccioni Maria Grazia, Capone Carmela, Vena Flaminia, Del Negro Valentina, Carlo Schiavi Michele, D'Ambrosio Valentina, Giancotti Antonella, Smacchia Maria Paola, Brunelli Roberto. Use of deferoxamine (DFO) in transfusion-dependent b-thalassemia during pregnancy: A retrospective study Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology 59 (2020) 120e122.

Pierga JY, Socie G, Gluckman E, Devergie A, Henry-Amar M, Bridier A, Girinsky T, Nguyen J, Cosset JM. Secondary solid malignant tumors occurring after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia given thoraco-abdominal irradiation. *Radiother Oncol*. 1994;30:55-8.

Pierri F, Dufour C. Management of aplastic anemia after failure of frontline immunosuppression. *Expert Rev Hematol*. 2019 Oct;12(10):809-819.

Pongtanakul B, Das PK, Charpentier K, Dror Y. Outcome of children with aplastic anemia treated with immunosuppressive therapy. *Pediatr Blood Cancer* 2008 Jan;50(1):52-7.

Prata P.H, Eikema D.J., Afansyev B., Bosman P., Smiers F., Diez-Martin J.L., Arrais-Rodrigues C., Koc Y, et al for SAA WP of the EBMT. Haploidentical transplantation and posttransplant cyclophosphamide for treating aplastic anemia patients: a report from the EBMT Severe Aplastic Anemia Working Party. *Bone Marrow Transplant* 2020 Jun;55(6):1050-1058.

Pullarkat V, Blanchard S, Tegtmeier B, Dagis A, Patane K, Ito J et al. Iron overload adversely affects outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 42: 799-805.

Pulsipher M.A., Lehmann L.E., Bertuch A.A, Sasa G., Olson T., Nakano T., Gilio A., Burroughs L.M., Lipton J.M., Huang J.N., Dickerson K., Bertaina A., Zhuang C., Malsch M., Fleming M., Weller E., Shimamura A., Williams D.A. A study assessing the feasibility of randomization of pediatric and young adult patients between matched unrelated donor bone marrow transplantation and immune-suppressive therapy for newly diagnosed severe aplastic anemia: A joint pilot trial of the North American Pediatric Aplastic Anemia Consortium and the Pediatric Transplantation and Cellular Therapy Consortium. *Pediatr Blood Cancer*. 2020 Oct;67(10):e28444

Qamar un Nisa Chaudhry, Raheel Iftikhar, Tariq Mehmood Satti, Syed Kamran Mahmood, Tariq Ghafoor, Ghassan Umair Shamshad, Muhammad Farhan, Nighat Shahbaz, Mehreen Ali Khan, Tariq Azam Khattak, Jahanzeb Rehman, Saima Humayun, Humayoon Shafique Satti, Faiz Anwer, Parvez Ahmed. Outcome of Fludarabine-Based Conditioning in High-Risk Aplastic Anemia Patients Undergoing Matched Related Donor Transplantation: A Single-Center Study from Pakistan) *Biol Blood Marrow Transplant* 25 (2019) 2375_2382.

Quarello P, Saracco P, Giacchino M, Caselli D, Caviglia I, Longoni D, Varotto S, Rana I, Amendola A, Misuraca A, Licciardello M, Paolucci P, Ladogana S, Rivetti E, Dufour C, Castagnola E. Epidemiology of infections in children with acquired aplastic anaemia: a retrospective multicenter study in Italy. *Eur J Haematol*. 2012 Jun;88(6):526-34).

Quillen K, Wong E, Scheinberg P, Young NS, Walsh TJ, Wu CO, Leitman SF. Granulocyte transfusions in severe aplastic anemia: an eleven-year experience. *Haematologica*, 2009 Dec;94(12):1661-8.

Rahman K et al. Clinicopathological profile of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone-positive aplastic anaemia paediatric patients—A single centre study from North India. *Int J Lab Hem.* 2018;40:604–610.

Rauff B, Idrees M, Riaz Shah SA, Butt S, Butt AM, Ali L, Hussain A, Irshad-Ur-Rehman, Ali M Hepatitis associated aplastic anemia: a review. *Virology journal* 2011; 8 (87): 1-6.

Risitano AM, Schrezenmeier H. Alternative immunosuppression in patients failing immunosuppression with ATG who are not transplant candidates: Campath (Alemtuzumab). *Bone Marrow Transplant.* 2013;48:186–90.

Risitano AM, Selleri C, Serio B, Torelli GF, Kulagin A, Maury S, Halter J, Gupta V, Bacigalupo A, Sociè G, Tichelli A, Schrezenmeier H, Marsh J, Passweg J, Rotoli B; Working Party Severe Aplastic Anaemia (WPSAA) of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Alemtuzumab is safe and effective as immunosuppressive treatment for aplastic anaemia and single-lineage marrow failure: a pilot study and a survey from the EBMT WPSAA. *Br J Haematol.* 2010 Mar;148(5):791-6.

Riveros-Perez E, Hermes AC, Barbour LA, Hawkins JL. Aplastic anemia during pregnancy: a review of obstetric and anesthetic considerations. *Int J Womens Health.* 2018 Feb 28;10:117-125.

Rogers ZR, Nakano TA, Olson TS, Bertuch AA, Wang W, Gillio A, Coates TD, Chawla A, Castillo P, Kurre P, Gamper C, Bennett CM, Joshi S, Geddis AE, Boklan J, Nalepa G, Rothman JA, Huang JN, Kupfer GM, Cada M, Glader B, Walkovich KJ, Thompson AA, Hanna R, Vlachos A, Malsch M, Weller EA, Williams DA, Shimamura A. Immunosuppressive therapy for pediatric aplastic anemia: a North American Pediatric Aplastic Anemia Consortium study. *Haematologica.* 2019 Oct;104(10):1974-1983.

Rosenfeld S, Follmann D, Nunez O, Young NS. Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia: association between hematologic response and long-term outcome. *JAMA.* 2003;289:1130-5.

Rosenfeld SJ, Kimball J, Vining D, Young NS. Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia. *Blood.* 1995;85:3058-65.

Rovo A, Tichelli A, Dufour C. Diagnosis of acquired aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant.* 2013; 48(2): 162- 167.

Ruppen W, Derry S, McQuay H, Moore RA. Incidence of epidural hematoma, infection, and neurologic injury in obstetric patients with epidural analgesia/anesthesia. *Anesthesiology.* 2006;105(2):394–399.

Sachdev M, Bansal M, Chakraborty S, Jain S, Bhargava R, Dua V. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Offer Good Outcomes in Pediatric Aplastic Anemia: Experience From Developing World. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2020 Oct 28.

Safadi R, Or R, Ilan Y, et al. Lack of known hepatitis virus in hepatitis-associated aplastic anemia and outcome after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 183–90.

Samarasinghe S, Clesham K, Iacobelli S, Sbianchi G, Knol C, Hamladji RM, Socié G, Aljurf M, Koh M, Sengeloev H, Dalle JH, Robinson S, et al. and Severe Aplastic Anaemia Working Party of the EBMT. Impact of T-cell depletion strategies on outcomes following hematopoietic stem cell transplantation for idiopathic aplastic anemia: a study on behalf of the european blood and marrow transplant (EBMT) SAA working party. *Am J Hematol.* 2019 Jan;94(1):80-86.

Samarasinghe S, Steward C, Hiwarkar P, Saif MA, Hough R, Webb D, Norton A, Lawson S, Qureshi A, Connor P, Carey P, Skinner R, Vora A, Pelidis M, Gibson B, Stewart G, Keogh S, Goulden N, Bonney D, Stubbs M, Amrolia P, Rao K, Meyer S, Wynn R, Veys P. Excellent outcome of matched unrelated donor transplantation in paediatric aplastic anaemia following failure with immunosuppressive therapy: a United Kingdom multicentre retrospective experience. *Br J Haematol.* 2012;157(3):339-46.

Samarasinghe S, Veys P, Vora A and Wynn R Paediatric amendment to adult BSH Guidelines for aplastic anaemia *Br J Haematol* 2018; 180 :201-205.

- Samarasinghe S, Webb DK. How I manage aplastic anaemia in children. *Br J Haematol*. 2012;157:26-40.
- Sampaio MS, Cho YW, Qazi Y, Bunnapradist S, Hutchinson IV, Shah T. Posttransplant malignancies in solid organ adult recipients: an analysis of the U.S. National transplant database. *Transplantation* 2012; 94: 990.
- Sanders JE, Storb R, Anasetti C, Deeg HJ, Doney K, Sullivan KM, Witherspoon RP, Hansen J. Marrow transplant experience for children with severe aplastic anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1994;16: 43-9.
- Saracco P et al. Cyclosporin A response and dependence in children with acquired aplastic anaemia: a multicentre retrospective study with long-term observation follow-up. *Br J Haematol* 2008;40, 197–205.
- Saracco P, Quarello P, Iori AP, Zecca M, Longoni D, Svahn J, Varotto S, Del Vecchio GC, Dufour C, Ramenghi U, Bacigalupo A, Locasciulli A; Bone Marrow Failure Study Group of the AIEOP (Italian Association of Paediatric Haematology Oncology). Cyclosporin A response and dependence in children with acquired aplastic anaemia: a multicentre retrospective study with long-term observation follow-up. *Br J Haematol*. 2008;140:197-205.
- Sauntharajah Y, Nakamura R, Nam JM, Robyn J, Loberiza F, Maciejewski JP, Simonis T, Molldrem J, Young NS, Barrett AJ. HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2002;100:1570-4
- Savage SA, Dufour C. Classical inherited bone marrow failure syndromes with high risk for myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Semin Hematol*. 2017 Apr;54(2):105-114.
- Savage SA, Viard M, O'hUigin C, Zhou W, Yeager M, Li SA, Wang T, Ramsuran V, Vince N, Vogt A, Hicks B, Burdett L, Chung C, Dean M, de Andrade KC, Freedman ND, Berndt SI, Rothman N, Lan Q, Cerhan JR, Slager SL, Zhang Y, Teras LR, Haagensohn M, Chanock SJ, Spellman SR, Wang Y, Willis A, Askar M, Lee SJ, Carrington M, Gadalla SM. Genome-wide Association Study Identifies HLA-DPB1 as a Significant Risk Factor for Severe Aplastic Anemia. *Am J Hum Genet*. 2020 Feb 6;106(2):264-271.
- Savaşan S. Acquired Aplastic Anemia: what have we learned and what is in the horizon? *Pediatr Clin North Am* 2018 June; 65(3):597-606.
- Sayour EJ, Mousallem T, Van Mater D, et al. Bone marrow transplantation for CVID-like humoral immune deficiency associated with red cell aplasia. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(10).
- Scheinberg P, Activity of eltrombopag in severe aplastic anemia, American Society of Hematology 2018
- Scheinberg P, Cooper JN, Sloand EM, Wu CO, Calado RT, Young NS Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia. *JAMA*. 2010 Sep 22; 304(12):1358-64.
- Scheinberg P, Fischer SH, Li L, Nunez O, Wu CO, Sloand EM, Cohen JI, Young NS, John Barrett A. Distinct EBV and CMV reactivation patterns following antibody-based immunosuppressive regimens in patients with severe aplastic anemia. *Blood*. 2007;109:3219-24.
- Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, Scheinberg P, Biancotto A, Wu CO, Young NS. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2011;365:430-8.
- Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, Scheinberg P, Wu CO, Young NS. Activity of alemtuzumab monotherapy in treatment-naïve, relapsed, and refractory severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012;119:345-54.
- Scheinberg P, Nunez O, Wu C, Young NS. Treatment of severe aplastic anaemia with combined immunosuppression: anti-thymocyte globulin, ciclosporin and mycophenolate mofetil. *Br J Haematol*. 2006;133:606-11.

Scheinberg P, Nunez O, Young NS. Retreatment with rabbit anti-thymocyte globulin and ciclosporin for patients with relapsed or refractory severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2006;133:622-7.

Scheinberg P, Rios O, Scheinberg P, Weinstein B, Wu CO, Young NS. Prolonged cyclosporine administration after antithymocyte globulin delays but does not prevent relapse in severe aplastic anemia. *Am J Hematol*. 2014; 89(6):571-4.

Scheinberg P, Townsley D, Dumitriu B, Scheinberg P, Weinstein B, Daphtary M, Rios O, Wu CO, Young NS. Moderate-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia has significant toxicity and does not prevent relapse and clonal evolution. *Blood*. 2014 Oct 30;124(18):2820-3.

Scheinberg P, Wu C.O., Nunez O. & Young, N.S. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. *British Journal of Haematology* 2009, 144, 206-216.

Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Scheinberg P, Boss C, Sloan EM, Young NS. Treatment of severe aplastic anemia with a combination of horse antithymocyte globulin and cyclosporine, with or without sirolimus: a prospective randomized study. *Haematologica*. 2009;94:348-54.

Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Young NS. Long-term outcome of pediatric patients with severe aplastic anemia treated with antithymocyte globulin and cyclosporine. *J Pediatr*. 2008;153:814-9.

Scheinberg P, Young NS. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood*, 2012 120: 1185-1196.

Scheinberg P. Prognostic value of telomere attrition in patients with aplastic anemia *Int J Hematol*. 2013 May;97(5):553-7.

Schoettler ML, Nathan DG. The Pathophysiology of Acquired Aplastic Anemia: Current Concepts Revisited. *Hematol Oncol Clin North Am* 2018 Aug;32(4):581-594.

Schrezenmeier H, Marin P, Raghavachar A, McCann S, Hows J, Gluckman E, Nissen C, van't Veer-Korthof ET, Ljungman P, Hinterberger W, et al. Relapse of aplastic anaemia after immunosuppressive treatment: a report from the European Bone Marrow Transplantation Group SAA Working Party. *Br J Haematol*. 1993;85:371-7.

Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC, Bacigalupo A, Bredeson CN, Bullorsky E, Camitta BM, Champlin RE, Gale RP, Fuhrer M, Klein JP, Locasciulli A, Oneto R, Schattenberg AV, Socie G, Eapen M. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1397-400.

Selleri C, Serio B, Risitano AM. Novel immunosuppressive strategies for bone marrow failure syndromes: a focus on alemtuzumab. *Mini Rev Med Chem*. 2011 Jun;11(6):536-43.

Serious Hazards of Transfusion (SHOT) Annual Report 2006. Website: www.shotuk.org.

Seung-Ah Yahng, Sung-Soo Park, Young-Woo Jeon, Jae-Ho Yoon, Seung-Hwan Shin, Sung-Eun Lee et al. Successful outcomes of second hematopoietic stem cell transplantation with total nodal irradiation and ATG conditioning for graft failure in adult patients with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 2018; 53: 1270-1277.

Shah C, Lemke S, Singh V, Gentile T. Case reports of aplastic anemia after vaccine administration. *Am J Hematol*. 2004;77(2):204.

Shah S, Jain P, Shah K, Patel K, Parikh S, Patel A, Panchal H, Anand A. Immunosuppressive therapy for aplastic anemia: a single-center experience from western India. *Ann Hematol*. 2019 Jan;98(1):41-46.

Shehata, N., Tinmouth, A., Naglie, G., Freedman, J. & Wilson, K. ABO-identical versus nonidentical platelet transfusion: a systematic review. *Transfusion*, 2009. 49, 2442-2453.

Sheil AG, Disney AP, Mathew TH, Livingston BE, Keogh AM. Lymphoma incidence, cyclosporine, and the evolution and major impact of malignancy following organ transplantation. *Transplant Proc.* 1997;29:825-7.

Shetty M, Narendra AM, Adiraju KP, Modugu NR. Study of Aplastic Anaemia with Cyclosporine in Resource Poor Setting. *J Clin Diagn Res.* 2016 Jun;10(6):OC15-8.

Shimamura A. Clinical approach to marrow failure. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:329-37.

Shin JE, Lee Y, Kim SJ, Shin JC. Association of severe thrombocytopenia and poor prognosis in pregnancies with aplastic anemia. *PLoS One.* 2014;9(7).

SHOT Annual report 2006

Sklarz T, Hurwitz SN, Stanley NL, Juusola J, Bagg A, Babushok D. Aplastic anemia in a patient with CVID due to NFKB1 haploinsufficiency. *Cold Spring Harb Mol case Stud.* 2020;6(6).

Smith BR, Guinan EC, Parkman R, Ferrara J, Levey RH, Nathan DG, Rapoport JM. Efficacy of a cyclophosphamide-procarbazine-antithymocyte serum regimen for prevention of graft rejection following bone marrow transplantation for transfused patients with aplastic anemia. *Transplantation.* 1985;39:671-3.

Smith JNP, Kanwar VS, MacNamara KC. Hematopoietic Stem Cell Regulation by Type I and II Interferons in the Pathogenesis of Acquired Aplastic Anemia. *Front Immunol.* 2016 Aug 29;7:330.

Socié G, et al. Malignant tumors occurring after treatment of aplastic anemia. European Bone Marrow Transplantation-Severe Aplastic Anaemia Working Party. *N Engl J Med.*

Socie G, Mary JY, Schrezenmeier H, Marsh J, Bacigalupo A, Locasciulli A et al. Granulocyte-stimulating factor and severe aplastic anemia: a survey by the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2007; 109: 2794–96

Solomon, S.R., Aubrey, M.T., Zhang, X., Piluso, A., Freed, B.M., Brown, S., Jackson, K.C., Morris, L.E., Holland, H.K., Solh, M.M. & Bashey, A. Selecting the Best Donor for Haploidentical Transplant: Impact of HLA, Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genotyping, and Other Clinical Variables. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24, 789-798.

Sreedharanunni S, Sachdeva MU, Bose P, Varma N, Bansal D, Trehan A. Frequency of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones by Multiparametric Flow Cytometry in Pediatric Aplastic Anemia Patients of Indian Ethnic Origin. *Pediatr Blood Cancer.* 2016 Jan;63(1):93-7.

Stanley et al. Recent advances in understanding clonal haematopoiesis in aplastic anaemia. *Br J Haematol*, 2017, 177, 509–525.

Stepkowski SM, Kahan BD. Rapamycin and cyclosporine synergistically prolong heart and kidney allograft survival. *Transplant Proc* 1991;23:3262-4.

Storb R, Blume KG, O'Donnell MR, Chauncey T, Forman SJ, Deeg HJ, Hu WW, Appelbaum FR, Doney K, Flowers ME, Sanders J, Leisenring W. Cyclophosphamide and antithymocyte globulin to condition patients with aplastic anemia for allogeneic marrow transplantations: the experience in four centers. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001;7:39-44.

Storb R, Deeg HJ, Farewell V, Doney K, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Hansen J, et al. Marrow transplantation for severe aplastic anemia: methotrexate alone compared with a combination of methotrexate and cyclosporine for prevention of acute graft-versus-host disease. *Blood.* 1986;68:119-25.

Storb R, Etzioni R, Anasetti C, Appelbaum FR, Buckner CD, Bensinger W, Bryant E, Clift R, Deeg HJ, Doney K, et al. Cyclophosphamide combined with antithymocyte globulin in preparation for allogeneic marrow transplants in patients with aplastic anemia. *Blood.* 1994;84:941-9.

Storb R, Floersheim GL, Weiden PL, Graham TC, Kolb HJ, Lerner KG, Schroeder ML, Thomas ED. Effect of prior blood transfusions on marrow grafts: abrogation of sensitization by procarbazine and antithymocyte serum. *J Immunol.* 1974;112:1508-16.

Storb R, Thomas ED, Buckner CD, Clift RA, Johnson FL, Fefer A, Glucksberg H, Giblett ER, Lerner KG, Neiman P. Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anemia. *Blood.* 1974;43:157-80.

Storb R, Thomas ED, Weiden PL, Buckner CD, Clift RA, Fefer A, Fernando LP, Giblett ER, Goodell BW, Johnson FL, Lerner KG, Neiman PE, Sanders JE. Aplastic anemia treated by allogeneic bone marrow transplantation: a report on 49 new cases from Seattle. *Blood.* 1976;48:817-41.

Storb R, Thomas ED. Bone marrow transplantation in randomly bred animal species and in man in: Schwarz MR (ed): *Proceedings of the Sixth Leucocyte Culture Conference.* New York, Academic Press, 1972, p 805.

Storb R, Weiden PL, Sullivan KM, Appelbaum FR, Beatty P, Buckner CD, Clift RA, Doney KC, Hansen J, Martin PJ, et al. Second marrow transplants in patients with aplastic anemia rejecting the first graft: use of a conditioning regimen including cyclophosphamide and antithymocyte globulin. *Blood.* 1987;70:116-21.

Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, Nakao S. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006;107:1308-14.

Sutherland DR, Illingworth A, Marinov I, Ortiz F, Andreasen J, Payne D, Wallace PK, Keeney M. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 2 - reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Jan;94(1):23-48.

Suzuki K, Muramatsu H, Okuno Y, Narita A, Hama A, Takahashi Y, Yoshida M, Horikoshi Y, Watanabe K, Kudo K, Kojima S. Immunosuppressive therapy for patients with Down syndrome and idiopathic aplastic anemia. *Int J Hematol.* 2016 Jul;104(1):130-3.

Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, DA. Arber, Hasserjian RP, Le Beau MM, Orazi A, Siebert R. WHO classification of Tumours of Haematopoietica and Lymphoid Tissues. IARC; Lyon 2017.

Taher AT, Iolascon A, Matar CF, Bou-Fakhredin R, de Franceschi L, Cappellini MD, Barcellini W, Russo R, Andolfo I, Tyan P, Gulbis B, Aydinok Y, Anagnou NP, Bencaiova GA, Tamary H, Martinez PA, Forni G, Vindigni R. Recommendations for Pregnancy in Rare Inherited Anemias. *Hemasphere.* 2020 Aug 12;4(4):e446.

Takatoku M, Uchiyama T, Okamoto S, Kanakura Y, Sawada K, Tomonaga M et al. Retrospective nationwide survey of Japanese patients with transfusion-dependent MDS and aplastic anemia highlights the negative impact of iron overload on morbidity/mortality. *Eur. J. Haematol.* 2007; 78: 487-494.

Teramura M, Kimura A, Iwase S, Yonemura Y, Nakao S, Urabe A, Omine M, Mizoguchi H. Treatment of severe aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporin A with or without G-CSF in adults: a multicenter randomized study in Japan. *Blood.* 2007;110:1756-61.

The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. Leukocyte Reduction and Ultraviolet B Irradiation of Platelets to Prevent Alloimmunization and Refractoriness to Platelet Transfusions. *N Engl J Med.* 1997;337(26):1861-9.

Tichelli A et al. Long-term outcome of a randomized controlled study in patients with newly diagnosed severe aplastic anemia treated with antithymocyte globulin and cyclosporine, with or without granulocyte colony-stimulating factor: a Severe Aplastic Anemia Working Party Trial from the European Group of Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica,* 2020; 105(5):1223-1231.

Tichelli A, Passweg J, Nissen C, Bargetzi M, Hoffmann T, Wodnar-Filipowicz A, Signer E, Speck B, Gratwohl A. Repeated treatment with horse antilymphocyte globulin for severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 1998;100:393-400.

Tichelli A, Schrezenmeier H, Socié G, Marsh J, Bacigalupo A, Dührsen U, Franzke A, Hallek M, Thiel E, Wilhelm M, Höchsmann B, Barrois A, Champion K, Passweg JR. A randomized controlled study in patients with newly diagnosed severe aplastic anemia receiving antithymocyte globulin (ATG), cyclosporine, with or without G-CSF: a study of the SAA Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2011 Apr 28;117(17):4434-41.

Tichelli A, Soci G, Marsh J, Barge R, Frickhofen N, McCann S, Bacigalupo A, Hows J, Marin P, Nachbaur D, Symeonidis A, Passweg J, Schrezenmeier H; European Group for Blood and Marrow Transplantation Severe Aplastic Anaemia Working Party. Outcome of pregnancy and disease course among women with aplastic anemia treated with immunosuppression. *Ann Intern Med*. 2002 Aug 6;137(3):164-72.

Timeus F, Crescenzo N, Doria A, Foglia L, Linari A, Giaccone M, Pastore G, di Montezemolo LC, Ramenghi U, Saracco P. Flow cytometric evaluation of circulating CD34+ cell counts and apoptotic rate in children with acquired aplastic anemia and myelodysplasia. *Exp Hematol*. 2005 May;33(5):597-604.

Timeus F, Crescenzo N, Doria A, Foglia L, Pagliano S, Lorenzati A, Quarello P, Decimi V, Svhan J, Locatelli F, Ruggero A, Martire B, Pillon M, Misuraca A, Longoni D, Dufour C, Ramenghi U, Saracco P. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones in Children with Acquired Aplastic Anemia: A Multicentric Study. *Blood, ASH Annual Meeting Abstracts 2012*;120:1269.

Timeus F, Crescenzo N, Lorenzati A, Doria A, Foglia L, Pagliano S, Quarello P, Ramenghi U, Saracco P. Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria Clones in Children with Acquired Aplastic Anaemia: A Prospective Single Centre Study. *Br J Haematol*. 2010;4:483-5.

Timeus F, Crescenzo M, Longoni D, et al. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria clones children with acquired aplastic anaemia; A multi centre study. *PLoS One*. 2014;9:e101948.

Tisdale JF, Dunn DE, Geller N, Plante M, Nunez O, Dunbar CE, Barrett AJ, Walsh TJ, Rosenfeld SJ, Young NS. High-dose cyclophosphamide in severe aplastic anaemia: a randomised trial. *Lancet*. 2000;356:1554-9.

Tisdale JF, Maciejewski JP, Nunez O, Rosenfeld SJ, Young NS. Late complications following treatment for severe aplastic anemia (SAA) with high-dose cyclophosphamide (Cy): follow-up of a randomized trial. *Blood* 2002;100:4668–4670

Tolar J, Deeg HJ, Arai S, Horwitz M, Antin JH, McCarty JM, Adams RH, Ewell M, Leifer ES, Gersten ID, Carter SL, Horowitz MM, Nakamura R, Pulsipher MA, Difrizzo NL, Confer DL, Eapen M, Anderlini P. Fludarabine-based conditioning for marrow transplantation from unrelated donors in severe aplastic anemia: early results of a cyclophosphamide dose deescalation study show life-threatening adverse events at predefined cyclophosphamide dose levels. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012; 18: 1007-11.

Tomiyama Y, Jang J.H, Lee J.W, Miyazaki K. Efficacy and Safety of Romiplostim in Patients with Acquired Aplastic Anemia Ineligible or Refractory to Immunosuppressive Therapy: Interim Analysis of Phase 2/3 Clinical Trial. *Blood* 2018

Top KA, Vaudry W, Morris SK, Pham-Huy A, Pernica JM, Tapiéro B, Gantt S, Price VE, Rassekh SR, Sung L, McConnell A, Rubin E, Chawla R, Halperin SA Waning Vaccine Immunity and Vaccination Responses in Children Treated for Acute Lymphoblastic Leukemia: A anadian Immunization Research Network Study. *Clin Infect Dis*. 2020 Dec 3;71(9):e439-e448.

Townsley D.M, Scheinberg P, Winkler T, Desmond R, Dumitriu B, Rios O, Weinstein B et al. Eltrombopag Added to Standard Immunosuppression for Aplastic Anemia, *N Engl J Med*. 2017.

Townsley DM, Desmond R, Dunbar CE, Young NS. Pathophysiology and management of thrombocytopenia in bone marrow failure: possible clinical applications of TPO receptor agonists in aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol*. 2013;98:48-55.

Townsley DM, Dumitriu B, Liu D, et al. Danazol treatment for telomere diseases. *N Engl J Med*. 2016 May 19;374(20):1922–1931.

Townsley DM, Dumitriu B, Young NS. Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood*. 2014 Oct 30;124(18):2775-83.

Townsley DM, Scheinberg P, Winkler T, Desmond R, Dumitriu B, Rios O, Weinstein B, Valdez J, Lotter J, Feng X, Desierto M, Leuva H, Bevans M, Wu C, Larochelle A, Calvo KR, Dunbar CE, Young NS. Eltrombopag Added to Standard Immunosuppression for Aplastic Anemia. *N Engl J Med*. 2017 Apr 20;376(16):1540-1550.

Treleaven, J., Gennery, A., Marsh, J., Norfolk, D., Page, L., Parker, A., Saran, F., Thurston, J. & Webb, D. Guidelines on the use of irradiated blood components prepared by the British Committee for Standards in Haematology blood transfusion task force. *British Journal of Haematology*, (2011) 152, 35–51.

Trompeter R, Fitzpatrick M, Hutchinson C, Johnston A. Longitudinal evaluation of the pharmacokinetics of cyclosporin microemulsion (Neoral) in pediatric renal transplant recipients and assessment of C2 level as a marker for absorption. *Pediatr Transplant*. 2003;7:282-8.

Tu J, Pan H, Li R, Wang Z, Lian Y, Li W, Shi J, Fang L. PNH Clones for Aplastic Anemia with Immunosuppressive Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Acta Haematol*. 2021;144(1):34-43.

UCLA Bone Marrow Transplant Team. Bone-marrow transplantation in severe aplastic anaemia. *Lancet*. 1976;2:921-3.

Urbano-Ispizua A, Muus P, Schrezenmeier H, Almeida AM, Wilson A, Ware RE. Different clinical characteristics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric and adult patients. *Haematologica* 2017 Mar;102(3):e76-e79.

Vamvakas EC. Is white blood cell reduction equivalent to antibody screening in preventing transmission of cytomegalovirus by transfusion? A review of the literature and meta-analysis. *Transfus Med Rev*. 2005;19(3):181-99.

Vamvakas EC. Meta-analysis of randomized controlled trials of the efficacy of white cell reduction in preventing HLA-alloimmunization and refractoriness to random-donor platelet transfusions. *Transf Med Rev*. 1998;12(4):258-70.

Van Bekkum DW, Bach F, Bergan JJ et al. Bone marrow transplantation from donors with aplastic anemia. A report from the ACS/NIH bone marrow transplant registry. *JAMA*. 1976;236:1131-5.

Van Tilburg CM, van Gent R, Bierings MB, et al. Immune reconstitution in children following chemotherapy for haematological malignancies: a long-term follow-up. *Br J Haematol* 2011;152:201-10.

Verlinden A, Mikulska M, Knelange NS, Averbuch D, Styczynski J; Infectious Diseases Working Party (IDWP) of the European Group for Blood and Marrow Transplantation Group (EBMT). Current antimicrobial practice in febrile neutropenia across Europe and Asia: the EBMT Infectious Disease Working Party survey. *Bone Marrow Transplant*. 2020 Aug;55(8):1588-1594. doi: 10.1038/s41409-020-0811-y. Epub 2020 Feb 11. PMID: 32047286; PMCID: PMC7391284.

Wandt H, Schaefer-Eckart K, Wendelin K, Pilz B, Wilhelm M, Thalheimer M, Mahlknecht U, Ho A, Schaich M, Kramer M, Kaufmann M, Leimer L, Schwerdtfeger R, Conradi R, Dölken G, Klenner A, Hänel M, Herbst R, Junghanss C, Ehninger G; Study Alliance Leukemia. Therapeutic platelet transfusion versus routine prophylactic transfusion in patients with haematological malignancies: an open-label, multicentre, randomised study. *Lancet*. 2012;380:1309-16.

- Wang H, Wu Y, Fu R, Qu W, Ruan E, Wang G, Liu H, Song J, Xing L, Guan J, Li L, Liu C, Shao Z. Granulocyte transfusion combined with granulocyte colony stimulating factor in severe infection patients with severe aplastic anemia: a single center experience from China. *PLoS One*. 2014 Feb 5;9(2):e88148.
- Wang J, Shen P, Wu X, Jin W. Risk factors associated with poor response to immunosuppressive therapy in acquired aplastic anemia: A meta-analysis of retrospective studies. *Exp Ther Med*. 2020 Apr;19(4):3104-3112.
- Wang S, Chen Y, Zou Y, Zheng Y, Zhu X. The progression risk factors of children with transfusion-independent non-severe aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2013 Feb;97(2):210-5.
- Wang, Y., Chang, Y.J., Xu, L.P., Liu, K.Y., Liu, D.H., Zhang, X.H., Chen, H., Han, W., Chen, Y.H., Wang, F.R., Wang, J.Z., Chen, Y., Yan, C.H., Huo, M.R., Li, D. & Huang, X.J. Who is the best donor for a related HLA haplotype-mismatched transplant? *Blood* 2014, 124, 843-850.
- Wang, Z., Yan, H., Zhu, L. & Wang, H. Successful unmanipulated stem cell transplantation from HLA-haploidentical 3-loci-mismatched parents in two children with severe aplastic anemia not responding to immunosuppressive therapy. *Am J Hematol* 2010, 85, 389-390.
- Willis F, Marsh JC, Bevan DH, Killick SB, Lucas G, Griffiths R, Ouwehand W, Hale G, Waldmann H, Gordon-Smith EC. The effect of treatment with Campath-1H in patients with autoimmune cytopenias. *Br J Haematol*. 2001 Sep;114(4):891-8.
- Wimmer CD, Angele NK, Schwarz B, Pratschke, Rentsch M, Khandoga A, Guba M, Jauch K-W, Bruns C, Graeb C. Impact of cyclosporine versus tacrolimus on the incidence of de novo malignancy following liver transplantation: a single center experience with 609 patients *Transplant International* 2013; 26,10,999-1006.
- Winkler T, Fan X, Cooper J, Desmond R, Young D.J, Townsley D.M, Scheinberg P, Grasmeder S et al. Treatment optimization and genomic outcomes in refractory severe aplastic anemia treated with eltrombopag, *Blood* 2019.
- Wlodarski MW, Hirabayashi S, Strahm B, et al. Recurrent 6pLOH is the most common somatic lesion in refractory cytopenia of childhood and occurs very infrequently in severe aplastic anemia. *Blood* 2012; 120(21):644.
- Wlodarski MW, Niemeyer CM, Brown AL, et al. Genetic syndromes predisposing to myeloid neoplasia: Elsevier Incorporated; 2017.
- Won In J, Lee N, Youn Roh E, Shin S, Park S, Young Song E. Association of aplastic anemia and FoxP3 gene polymorphisms in Koreans. *Hematology*. 2017 Apr;22(3):149-154.
- Wu Q, Zhang J, Shi J, Ge M, Li X, Shao Y, Yao J, Zheng Y. *PLoS One*. 2014 Nov 10;9(11):e110787.
- Xu L.P, Zhang X.H, Wang F.R, Mo X.D, Han T.T, Han W, Chen Y.H, Zhang Y.Y, Wang J.Z, Yan C.H, Sun Y.Q, Zuo S.N, Huang X.J. Haploidentical transplantation for pediatric patients with acquired severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant* 2017, 52, 381-387.
- Xu L.P., Wang S.Q., Wu D.P., Wang J.M., Gao S.J., Jiang M., Wang C.B., Zhang X., Liu Q.F., Xia L.H., Wang X., Huang X.J. Haplo-identical transplantation for acquired severe aplastic anaemia in a multicentre prospective study. *British Journal of Haematology* 2016, 175(2):265–274
- Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Kodera T. Tacrolimus/Methotrexate versus Cyclosporine/Methotrexate as Graft-versus-Host Disease Prophylaxis in Patients with Severe Aplastic Anemia Who Received Bone Marrow Transplantation from Unrelated Donors: Results of Matched Pair Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant* 15:1603-1608, 2009.

- Yamazaki H, Ohta K, Lida H, Imada K, Obara N, Tokumine Y, Tomiyama Y et al. Hematologic recovery induced by eltrombopag in Japanese patients with aplastic anemia refractory or intolerant to immunosuppressive therapy. *IJ of Hematology* 2019.
- Yang, S., Yuan, X., Ma, R., Jiang, L., Guo, J., Zang, Y., Shi, J., Yang, J., Lei, P., Liu, Z., Zhang, Y. & Zhu, Z. Comparison of Outcomes of Frontline Immunosuppressive Therapy and Frontline Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Children with Severe Aplastic Anemia Who Lack an HLA-Matched Sibling Donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019, 25, 975-980.
- Yazal Erdem A, Arman Bilir Ö, Işık M, Kaçar D, Özbek NY, Yaralı HN. Management of acquired aplastic anemia in children: A single center experience. *Transfus Apher Sci.* 2019 Aug;58(4):484-490.
- Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe K, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor versus immunosuppressive therapy. *Haematologica.* 2014 Dec;99(12):1784-91).
- Yoshida N, Kojima S. Updated Guidelines for the Treatment of Acquired Aplastic Anemia in Children. *Curr Oncol Rep.* 2018 Jun 30;20(9):67.
- Yoshida N, Yabe H, Kudo K, Kobayashi R, Yabe M, Inoue M, et al. Outcomes of stem cell transplantation with fludarabine and melphalan conditioning for children with acquired bone marrow failure: a nationwide retrospective study. *Blood.* 2014;124(21):2559.
- Yoshida N, Yagasaki H, Takahashi Y, Yamamoto T, Liang J, Wang Y, Tanaka M, Hama A, Nishio N, Kobayashi R, Hotta N, Asami K, Kikuta A, Fukushima T, Hirano N, Kojima S. Clinical impact of HLA-DR15, a minor population of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-type cells, and an aplastic anaemia-associated autoantibody in children with acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2008;142:427-35.
- Yoshida N, Yagasaki H, Yabe H, Kikuchi A, Kobayashi R, Takahashi Y, et al. Donor-type aplasia after bone marrow transplantation in children with aplastic anemia: a nationwide retrospective study. *Blood.* 2012;120(21):959.
- Yoshimi A, Kojima S, Taniguchi S, et al. Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:1057-1063.
- Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, Sato-Otsubo A, Sato Y, Liu D, Suzuki H, Wu CO, Shiraishi Y, Clemente MJ, Kataoka K, Shiozawa Y, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Nagata Y, Katagiri T, Kon A, Sanada M, Scheinberg P, Miyano S, Maciejewski JP, Nakao S, Young NS, Ogawa S. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med.* 2015 Jul 2;373(1):35-47.
- Young NS, Kaufman DW. The epidemiology of acquired aplastic anemia. *Haematologica.* 2008;93:489-92.
- Young NS. Aplastic Anemia. *N Engl J Med* 2018 October 25; 379 (17): 1643-1656.
- Young NS. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; 2013: 76-81.
- Zaimoku Y, Takamatsu H, Hosomichi K, et al. Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. *Blood* 2017;129(21):2908-2916
- Zeidler C, Grote UA, Nickel A, et al. Outcome and management of pregnancies in severe chronic neutropenia patients by the European branch of the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Haematologica.* 2014;99(8):1395–1402.
- Zeng Y, Katsanis E. The complex pathophysiology of acquired aplastic anaemia. *Clin Exp Immunol.* 2015 Jun;180(3):361-70.

Zhang F, Zhang L, Jing L, Zhou K, Wang H, Peng G, Li Y, Li Y, Li J, Ye L, Shi L, Fan H, Zhao X, Chu Y, Hao Y, Wang J. High-dose cyclophosphamide compared with antithymocyte globulin for treatment of acquired severe aplastic anemia. *Exp Hematol*. 2013 Apr;41(4):328-34.

Zhang Y, Guo Z, Liu XD, He XP, Yang K, Chen P, Chen HR. Comparison of Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Immunosuppressive Therapy for the Treatment of Acquired Severe Aplastic Anemia in Pediatric Patients. *Am J Ther*. 2017 Mar/Apr;24(2):e196-e201.

Zhao L.P, Sicre De Fontbrune F, Contejean A, Abraham J, Terriou L et al. Nationwide survey in France on the use of romiplostim in patients with refractory severe aplastic anemia *Bone Marrow Transplantation* 2018.

Zhao P, Gao Q, He Q, Tan J. Prevalence and clinical outcomes of hepatitis B virus infection in patients with aplastic anemia. *Int J Hematol* 2017; 106 (4): 484–9.

Zhao X, Zhang L, Jing L, Zhou K, Li Y, Peng G, Ye L, Li Y, Li J, Fan H, Song L, Yang W, Zhang F. The role of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in response to immunosuppressive therapy of patients with severe aplastic anemia. *Ann Hematol*. 2015 Jul;94(7):1105-10.

Zhu Y, Gao Q, Hu J, Liu X, Guan D, Zhang F. Allo-HSCT compared with immunosuppressive therapy for acquired aplastic anemia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Immunol*. 2020 Mar 6;21(1):10.

Zikos P, Van Lint MT, Frasconi F, Lamparelli T, Gualandi F, Occhini D, Mordini N, Berisso G, Bregante S, De Stefano F, Soracco M, Vitale V, Bacigalupo A. Low transplant mortality in allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia: a randomized study of low-dose cyclosporin versus low-dose cyclosporin and lowdose methotrexate. *Blood*. 1998;9:3503-8.

Zora R. Rogers, Taizo A. Nakano, Timothy S. Olson, Alison A. Bertuch, Winfred Wang, Alfred Gillio, Thomas D. Coates, Anjulika Chawla, Paul Castillo, Peter Kurre, Christopher Gamper, Carolyn M. Bennett, Sarita Joshi, Amy E. Geddis, Jessica Boklan, Grzegorz Nalepa, Jennifer A. Rothman, James N. Huang, Gary M. Kupfer, Michaela Cada, Bertil Glader, Kelly J. Walkovich, Alexis A. Thompson, Rabi Hanna, Adrianna Vlachos, Maggie Malsch, Edie A. Weller, David A. Williams and Akiko Shimamura Immunosuppressive therapy for pediatric aplastic anemia: a North American Pediatric Aplastic Anemia Consortium study *Haematologica* 2019 Oct;104(10):1974-1983.