



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

SCUOLA DI MEDICINA  
DIPARTIMENTO DI MEDICINA TRASLAZIONALE  
Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina e Chirurgia

Tesi di Laurea

CONCENTRATO PIASTRINICO DA SANGUE CORDONALE PER IL  
TRATTAMENTO DELLA cGVHD OCULARE E ALTRE OCULOPATIE  
AUTOIMMUNI: UNO STUDIO PROSPETTICO PILOTA

Relatore:

Chiar.mo Prof. Marco LADETTO

Candidato:

**Camilla DELPONTE**

Matricola n° 20028093

Anno accademico 2023/2024

*Alla mia mamma,  
per avermi insegnato  
a trasformare la paura  
in amore per la Vita.*

# SOMMARIO

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1. GVHD cronica	4
1.1.1. Definizione	4
1.1.2. Manifestazioni cliniche	5
1.1.3. Meccanismi eziopatogenetici	10
1.1.4. Diagnosi e classificazione	10
1.1.5. Fattori di rischio e fattori prognostici	16
1.1.6. Terapia	17
1.1.6.1 Profilassi	17
1.1.6.2. Terapia sistemica	18
1.1.6.3. Terapia topica	20
1.2. cGVHD oculare	22
1.2.1. Definizione	22
1.2.2. Fattori di rischio	23
1.2.3. Manifestazioni cliniche	23
1.2.4. Meccanismi eziopatogenetici	28
1.2.5. Diagnosi e grading	30
1.2.5.1. Lee eye subscale	31
1.2.5.2. Ocular Surface Disease Index (OSDI)	32
1.2.5.3. Schirmer test	33
1.2.5.4. NIH eye score	34
1.2.6. Prognosi e terapia	35
1.2.6.1. Terapia medica	36
1.2.6.2. Terapia chirurgica	38
1.3. Sindrome di Sjögren	40
1.3.1. Definizione ed epidemiologia	40
1.3.2. Manifestazioni	40

1.3.3. Diagnosi	41
1.3.4. Terapia	43
<b>2. OBIETTIVO DELLO STUDIO</b>	<b>44</b>
2.1. Premessa scientifica	44
2.2. Obiettivi	47
2.2.1. Obiettivi primari	47
2.2.2. Obiettivo secondario	48
2.3. Razionale	48
2.3.1. Razionale scientifico	48
2.3.2. Razionale biologico	48
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>51</b>
3.1. Disegno dello studio	51
3.2. Popolazione	54
3.3. Trattamento e procedura	55
3.3.1. Preparazione del collirio	55
3.3.2. Assegnazione del trattamento	56
3.3.3. Schema di consegna prodotto	56
3.4. Criteri e schema di valutazione	57
3.5. Tempi dello studio	60
3.6. Raccolta dati	60
3.7. Analisi statistica	61
<b>4. RISULTATI</b>	<b>63</b>
4.1. Arruolamento	63
4.2. Caratteristiche cliniche dei pazienti	65
4.2.1. Pazienti con cGVHD oculare	65
4.2.2. Pazienti con Sindrome di Sjögren	71
4.3. Risposta al trattamento	73
4.3.1. Sintomatologia oculare	73

4.3.1.1. Scala VAS	73
4.3.1.2. OSDI score	76
4.3.2. Misurazioni oggettive	81
4.3.2.1. Schirmer test	81
4.3.2.2. BUT test	83
4.3.2.3. Oxford score	85
4.4. Focus sulla cGVHD	88
4.4.1. Grado della cGVHD oculare	88
4.4.2. Terapia immunosoppressiva	92
4.4.3. Effetto <i>graft-versus-tumor</i> (GVT)	94
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>96</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>104</b>

## ABSTRACT

**Introduzione:** La sindrome da occhio secco è una condizione patologica della superficie oculare responsabile di un impatto negativo sulla qualità della vita a lungo termine dei pazienti che ne sono affetti. Tale sindrome è particolarmente frequente nelle patologie autoimmuni come la Sindrome di Sjögren, ma anche nella *graft versus host disease* cronica (cGVHD) a livello oculare, una complicanza che insorge frequentemente dopo trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) e il cui meccanismo patogenetico è da considerarsi paragonabile a quelle delle malattie autoimmuni.

**Obiettivo:** Considerata la scarsa efficacia e standardizzazione delle terapie convenzionali, sia mediche sia chirurgiche, è stato condotto uno studio prospettico monocentrico finalizzato a valutare l'efficacia e la sicurezza di un concentrato piastrinico derivato dal sangue del cordone ombelicale (CBS) in pazienti affetti da cGVHD e sindrome di Sjögren, sfruttando le maggiori concentrazioni di fattori di crescita e gli effetti anti-infiammatori del CBS rispetto al lisato piastrinico autologo.

**Materiali e metodi:** Venticinque pazienti con cGVHD e nove pazienti con sindrome di Sjögren con cheratocongiuntivite moderata/severa sono stati arruolati nello studio CPCB19, che consisteva nell'applicazione topica di un collirio a base di concentrato piastrinico preparato dalla lavorazione di sacche di sangue cordonale non idonee allo stoccaggio per bassa cellularità. Il trattamento prevedeva una durata di 4 mesi complessivi (dal T0 al T4).

**Risultati:** I dati più significativi emersi dal confronto tra T0 e T4 si riferiscono alla sintomatologia percepita soggettivamente, con un miglioramento di tutti i sintomi correlati alla cGVHD oculare o alla xeroftalmia da Sindrome di Sjögren che varia tra il 90% dei casi valutati con la scala VAS e il 96,7% secondo l'OSDI score. Per quanto riguarda i parametri oggettivi, il miglioramento dei valori della lacrimazione registrato sia attraverso Schirmer test che BUT test non è stato sufficiente per definire una differenza statisticamente significativa. Al contrario, la valutazione del danno corneale tramite Oxford score ha consentito di riscontrare una significativa riduzione della disepitelizzazione che era presente al basale e scomparsa nell'83,3% dei pazienti al T4. Nei pazienti con diagnosi di cGVHD è stato registrato anche un cambiamento dello score NIH della cGVHD oculare, con un miglioramento nel 73,9% dei pazienti e un punteggio pari a 0 raggiunto dall'8,7% di essi. Inoltre, grazie al trattamento con il lisato piastrinico da sangue cordonale è stato possibile ridurre la terapia steroidea in atto,

passando da 5 pazienti che assumevano una terapia sistemica con *prednisone* al T0 ad un solo paziente che lo assumeva ancora al T4, pur avendone comunque diminuito il dosaggio.

**Conclusioni:** I risultati dello studio suggeriscono che i colliri a base di CBS eterologo rappresentano un approccio terapeutico promettente nella cheratocongiuntivite secca da cGVHD e Sindrome di Sjögren e nel sollievo dei sintomi soggettivi dei pazienti.

Questi risultati sarebbero meritevoli di ulteriori indagini in uno studio multicentrico.

# 1. INTRODUZIONE

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) è un approccio potenzialmente curativo in svariate patologie ematologiche sia della linea mieloide sia della linea linfoide (1). Nonostante regimi di condizionamento meno aggressivi e migliorate supportive care abbiano determinato una riduzione della mortalità correlata al trattamento (TRM), consentendo anche a pazienti di età più avanzata di accedere a questo tipo di procedura, la *graft versus host disease* (GVHD) rimane la causa primaria di morbidità e mortalità dopo il trapianto (2).

La GVHD è una condizione piuttosto frequente, contemporaneamente sintomo dell'attività, e quindi dell'attecchimento, delle cellule del donatore, con un probabile effetto *graft versus leukemia / lymphoma* concomitante (3)(4), ma possibile causa di condizioni particolarmente invalidanti per il paziente, le quali si distinguono in:

- Graft versus host disease acuta (aGVHD): generalmente entro i primi 100 giorni dall'infusione delle cellule staminali (anche se può insorgere anche più tardivamente e/o in seguito a somministrazione di linfociti del donatore – DLI), prevalentemente focalizzata a livello cutaneo, intestinale ed epatico, e con un impatto importante sulla non-relapse mortality (NRM);
- Graft versus host disease cronica (cGVHD): generalmente oltre i 100 giorni dal trapianto, in cui si addiziona un coinvolgimento respiratorio, articolare e fasciale, delle mucose orali e genitali e anche oculare, con un sostanziale impatto sulla qualità di vita dei pazienti sottoposti ad allotrapianto di cellule staminali.

In realtà, aGVHD e cGVHD sono due entità differenti, che si manifestano con una clinica e una patogenesi diversa. Tuttavia, nonostante si possano avere quadri di aGVHD senza poi sviluppare una cGVHD e viceversa, il principale fattore di rischio per lo sviluppo di cGVHD è l'insorgenza di una precedente aGVHD, motivo per cui è stato ipotizzato un continuum fisiopatologico tra queste due diverse sindromi cliniche (1).

Considerato l'alto tasso di morbidità e mortalità correlata in generale alla GVHD, è evidente la necessità di strumenti diagnostici e terapeutici innovativi al fine di garantire la migliore assistenza possibile al paziente. In tale direzione, si è recentemente investito molto



nella ricerca per scoprire e convalidare biomarcatori specifici per la GVHD, la cui scarsa disponibilità deriva in parte dalla complessità patologica della GVHD stessa, che può essere analizzata attraverso un modello che prevede fasi sequenziali distinte di attivazione cellulare del sistema immunitario e di produzione di citochine, aspetti che si prevede influenzino specifici livelli cellulari e proteici nel sangue dei pazienti con GVHD (5). Le applicazioni potenziali comprendono la previsione della risposta al trattamento, la definizione di nuovi livelli di rischio che includono i valori dei biomarcatori, e l'avvio di terapie preventive prima dell'apparizione dei sintomi clinici. Questo ultimo punto è particolarmente pertinente per la cGVHD, dove, in assenza di misure biologicamente rilevanti e oggettive della malattia, risulta difficile condurre e interpretare studi clinici rigorosi, e il trattamento rimane di natura palliativa (6).

Considerata l'incidenza (30-50% per la aGVHD e 30-80% per la cGVHD) e la morbilità e mortalità associata, oltre alle misure di gestione della GVHD a seguito della sua manifestazione, un elemento cruciale inserito all'interno dei protocolli di trapianto sono le misure profilattiche, finalizzate a ridurre l'incidenza e la gravità della GVHD stessa.

A livello profilattico lo standard di cura è rappresentato dalla combinazione di un inibitore della calcineurina (CNI), generalmente *ciclosporina (CsA)* o *tacrolimus*, e un antimetabolita, tipicamente *methotrexate (MTX)*. In alternativa, si può utilizzare un CNI abbinato a *micofenolato mofetile (MMF)*, ma anche *globuline anti-timociti (ATG)* e *ciclofosfamide* post-trapianto. Ad ogni modo, nonostante la lista di nuovi agenti per la profilassi della GVHD si stia implementando, mancano ancora studi randomizzati per molti di essi (7).

Ovviamente, nel momento in cui non si riesca ad evitare l'insorgenza della GVHD, subentra il ruolo di terapie farmacologiche e non farmacologiche scelte sulla base della gravità e della modalità di presentazione del quadro, nonché degli organi coinvolti. Oltre al ruolo cruciale degli immunosoppressori (in primis i corticosteroidi, ma anche inibitori della calcineurina, antimetaboliti e agenti biologici come l'*infliximab*), si annoverano infatti anche terapie topiche, ad esempio per la cute, misure dietetiche per i disturbi gastrointestinali, supporto nutrizionale e terapie fisiche. La terapia può quindi essere locale (generalmente in caso di cGVHD lieve) o sistemica (se severità globale della cGVHD almeno moderata), articolata in prima ed eventuale seconda linea, e richiede un approccio multidisciplinare di

diverse figure professionali (dermatologi, oculisti, reumatologi, pneumologi, ginecologi, urologi, endocrinologi).

Tuttavia, non sempre le terapie ad oggi disponibili sono risolutive e un esempio è rappresentato proprio dalla gestione della cGVHD, e in particolare della cGVHD oculare. In questo contesto, terapie corticosteroidi e presidi topici spesso non sono in grado di determinare un sostanziale miglioramento, motivo per cui sono in atto studi clinici come quello in oggetto, finalizzati a migliorare non solo la sopravvivenza, ma anche la qualità di vita di pazienti che, dopo essere stati sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche, possono sviluppare quadri sintomatologicamente sovrapponibili alla clinica di malattie autoimmuni come la Sindrome di Sjögren, con sindrome secca che non a caso viene ad essere inclusa nel medesimo studio, potendo anch'essa plausibilmente giovare di questo tipo di trattamento.

## 1.1. GVHD cronica

### 1.1.1. Definizione

La GVHD cronica è una sindrome multisistemica alloimmune che occorre dopo il trapianto di midollo osseo (TMO), generalmente dopo il centesimo giorno (+100) ed entro i 3 anni dall'infusione delle cellule staminali, anche se talora può presentarsi più precocemente, eventualmente come overlap a partenza da una forma di GVHD acuta.

Tuttavia, ad oggi la cGVHD non è definita solo sulla base di un criterio temporale, ma anche a seconda della sintomatologia e delle manifestazioni cliniche presenti e alla loro eventuale associazione con manifestazioni tipiche di una GVHD acuta.

Dunque, è possibile distinguere la cGVHD in:

- De novo: forma di cGVHD che non ha relazioni con una precedente aGVHD; la prognosi in questo caso è solitamente migliore;
- Quiescente: forma di cGVHD che si sviluppa dopo una aGVHD apparentemente risolta;
- Progressiva: forma di cGVHD che si sviluppa in continuità diretta con una aGVHD.

Con un'incidenza di circa il 50% dei pazienti sopravvissuti a 3 mesi dal trapianto (range 30-80%), la cGVHD rappresenta la principale causa di morbidità e mortalità post-trapianto non legata a recidiva della malattia di base (non relapse mortality - NRM); tuttavia, essa si associa con l'azione terapeutica del trapianto in quella che viene definita *graft versus tumor* (GVT), finalizzata a contrastare la patologia neoplastica per la quale il/la paziente ha avuto la necessità di sottoporsi a un TMO.

L'incidenza di cGVHD risulta inoltre essere aumentata negli ultimi anni a causa sia dell'aumento dell'età dei pazienti (per l'estensione dei criteri di inclusione al trapianto allogenico) sia del maggior ricorso a trapianto da matched unrelated donor (MUD) o mismatched, a reduced intensity conditioning (RIC) e a peripheral blood stem cells (PBSC) (1).

Allo scopo di interrompere il meccanismo di danno organico mediato dal sistema immunitario e stabilire uno stato di tolleranza immunologica, è importante intervenire con una terapia, che potrà più spesso essere topica in caso di cGVHD lieve, mentre sarà sistemica se la cGVHD risulta essere moderata/severa. La terapia, gestita con un approccio multidisciplinare

da diverse figure professionali, è di lunga durata, ma l'85% dei pazienti che sopravvive oltre 5 anni può spesso arrivare ad interromperla.

### **1.1.2. Manifestazioni cliniche**

Le manifestazioni cliniche della cGVHD di solito iniziano da 3 mesi fino a 2/3 anni dopo il trapianto, ma in alcuni casi è possibile avere un esordio più precoce, con andamento rapidamente progressivo.

Il quadro è dovuto ad una reazione che può essere definita *alloimmune*, con manifestazioni che possono essere assimilabili a quelle di patologie *autoimmuni*, quali la sclerodermia, la sindrome di Sjögren o la cirrosi biliare primitiva, oppure ad altre alterazioni cliniche sempre su base immunologica, quali la bronchiolite obliterante, la wasting syndrome, le citopenie immuni o l'immunodeficienza cronica (8).

La cGVHD può presentarsi con manifestazioni limitate a un singolo organo o estese a determinare un quadro multiorgano.

Le principali manifestazioni cliniche di cGVHD possono interessare: (9)

#### **a. Cute e annessi**

A livello cutaneo è possibile riscontrare la presenza di un eritema maculare, lesioni papulosquamose, eventualmente desquamanti e/o pruriginose, talora simili a un eczema. Le suddette lesioni cutanee possono progredire verso il poichiloderma, caratterizzato da aree di ipopigmentazione, iperpigmentazione, teleangectasie e atrofia fino alla sclerosi superficiale o profonda (con interessamento anche della fascia muscolare).

La guarigione delle ferite risulta essere particolarmente difficoltosa, anche in caso di abrasioni minori.

Può coesistere un danno a livello degli annessi cutanei: il coinvolgimento delle ghiandole sudoripare implica una riduzione della loro capacità secretoria e conseguente riduzione della tolleranza al caldo. Il danno a livello dei follicoli piliferi può determinare alopecia; i capelli possono diventare fragili e prematuramente grigi. Infine, è possibile riscontrare un danno ungueale, con onicodistrofia, increspature verticali, alterazioni degenerative e malformazioni.

È possibile valutare il coinvolgimento di queste strutture attraverso una biopsia cutanea (10).

b. Occhi

Il quadro di interessamento oculare può comportare sensazione di secchezza (xerofthalmia), dovuta ad atrofia delle ghiandole lacrimali, o di corpo estraneo, bruciore, fotofobia, ulcere corneali.

Presentandosi generalmente come cheratite, è importante la diagnosi differenziale con la cheratite infettiva.

Oltre alle tipiche alterazioni fibrotiche congiuntivali, si può realizzare un'inflammatione cronica persistente con rossore oculare dovuto all'eritema congiuntivale.

Infine, è possibile un coinvolgimento delle ghiandole meibomiane (ghiandole escretorie olocrine) e delle palpebre, con una blefarite che può manifestarsi all'esordio con iperlacrimazione (1).

Il test di Schirmer è essenziale per la diagnosi.

c. Cavo orale

A livello orale è possibile riscontrare xerostomia, irritazione mucosa e gengivale, deterioramento degli elementi dentari, mucocele, eritema, alterazioni lichenoidi (strie bianche o placche ispessite) sia sulla mucosa orale che sulla lingua, atrofia ed ulcerazioni sulla mucosa orale (intensamente dolenti e segno evidente di grave malattia). Il dolore può essere presente in maniera persistente o solamente evocato da alcuni cibi (acidi/spezie) o dal dentifricio. È presente il rischio di evoluzione fibrotica, la quale può comportare una limitazione all'apertura della bocca.

Per quanto riguarda i test diagnostici, è possibile effettuare una biopsia della mucosa orale o delle labbra ed eventuali esami microbiologici, importanti per una diagnosi differenziale prima di iniziare il trattamento per la cGVHD (11).

Inoltre, la valutazione del coinvolgimento della mucosa orale può essere effettuata utilizzando la modifica recentemente proposta della Scala di Valutazione dell'Oral Mucositis di Schubert, in cui è incisa la valutazione delle quattro manifestazioni croniche di GVHD: eritema mucosale (valutazione dell'intensità del rossore), ipercheratosi di tipo lichenoidale (misurazione della percentuale della superficie della mucosa orale coinvolta), ulcerazioni

(anch'esse misurate come percentuale dell'area superficiale interessata), presenza di mucocele (numero totale) (12).

#### d. Fegato

Il coinvolgimento epatico può comportare un innalzamento dei livelli di bilirubina, fosfatasi alcalina, GGT, AST e ALT. È possibile in alcuni casi un'evoluzione in fibrosi epatica e cirrosi.

Ecografia e biopsia epatica transgiugulare sono i test diagnostici di scelta (12).

#### e. Tratto gastro-intestinale

Partendo dal tratto esofageo, è possibile riscontrare fibrosi della sottomucosa con conseguente scarsa motilità, stenosi, membrane, desquamazione, ulcerazioni con conseguenti disfagia e/o odinofagia, sensazione urente o dolore retrosternale.

A livello intestinale è frequente un quadro di malassorbimento con diarrea e calo ponderale, quest'ultimo non sempre spiegato dai sintomi GI. Sebbene la relazione esatta tra la perdita di peso e l'attività della GVHD cronica non sia chiara, è importante registrare il peso del paziente ad ogni valutazione programmata (12).

La diarrea può essere anche la conseguenza di un'insufficienza pancreatica o talora un effetto collaterale della terapia assunta dal paziente.

I test diagnostici utilizzati, a seconda del tratto interessato dalla sintomatologia, sono pasto baritato, EGDS, colonscopia, test per il malassorbimento, test per insufficienza pancreatica, coproculture, ricerca CMV o tossina Clostridium difficile, test per intolleranza al lattosio.

#### f. Polmoni

A livello polmonare è possibile riscontrare un quadro alterativo di tipo ostruttivo con bronchiolite obliterante, talora scatenata da un'infezione delle vie respiratorie. La sintomatologia associata comporta tosse, asma, dispnea da sforzo, pneumotorace, pneumomediastino, enfisema sottocutaneo.

La cGVHD può anche determinare una malattia restrittiva, ovvero una bronchiolite obliterante con polmonite organizzativa (BOOP). La sintomatologia con cui si presenta

quest'ultima comporta febbre, tosse, asma e infiltrati polmonari sparsi (importante la diagnosi differenziale con una causa infettiva).

La valutazione del quadro polmonare viene effettuata con spirometria, DLCO, HRCT.

I test di funzionalità polmonare pre-trapianto giocano un ruolo importante nella gestione delle complicanze polmonari non infettive dopo il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT): sebbene la loro utilità nel predire la probabilità di sviluppare complicanze polmonari post-trapianto e la mortalità non sia ben stabilita, i pulmonary function tests (PFTs) pre-trapianto sono importanti come riferimento per l'interpretazione dei PFT post-trapianto e per identificare i pazienti a rischio elevato di sviluppare complicanze polmonari e/o mortalità dopo HSCT (13).

#### g. Sistema muscolo-scheletrico

Il coinvolgimento muscolo-scheletrico nel contesto della cGVHD può manifestarsi in maniera variabile. Tra le possibili presentazioni vi sono: polimiosite, miastenia gravis, artralgie, artrite, crampi muscolari, fascite e successiva sclerosi, osteopenia e osteoporosi.

La valutazione del range di movimento articolare con assistenza attiva potrebbe risultare estremamente utile come misura oggettiva della risposta tissutale alla GVHD cronica nei pazienti con sclerosi che coinvolge le grandi articolazioni o il tronco (12).

Oltre ad una visita reumatologica, i test diagnostici suggeriti consistono in una valutazione dei livelli sierici di CPK e aldolasi, EMG e biopsia muscolare; per quanto riguarda il compartimento osseo, dosaggio di Calcio e Vitamina D basali e densitometria ossea.

#### h. Sierose

È possibile il riscontro di sierosità, versamento pleurico, pericardico e ascite.

La diagnosi è effettuata con visita reumatologica e analisi del liquido sieroso.

#### i. Vulva e vagina

Tra le possibili manifestazioni si annoverano eritema, alterazioni lichenoidi, restringimenti vaginali, secchezza, bruciore, dispareunia e disuria (12).

Sono suggerite una visita ginecologica e biopsia.

j. Reni

A livello renale è possibile il riscontro di sindrome nefrosica con proteinuria e raramente glomerulonefrite membranosa.

La diagnosi avviene con visita nefrologica, proteinuria delle 24h e biopsia renale.

k. Sistema nervoso

L'interessamento del SNC è incerto (probabile vasculite o un quadro simile a una encefalite), più spesso riconducibile alla tossicità dei farmaci usati durante il condizionamento o alla terapia immunosoppressiva.

Alcune manifestazioni cliniche possono essere secondarie a demielinizzazione della sostanza bianca, dei nervi ottici e del midollo spinale, con una clinica caratterizzata da un decorso spesso recidivante-remittente, che ricorda quello della sclerosi multipla. Altre manifestazioni possono essere, invece, secondarie ad un processo vasculitico immunomediato a carico di arterie sia parenchimali sia meningee. L'ultima modalità di presentazione della cGVHD a carico del SNC è un'encefalite immunomediata (importante la diagnosi differenziale con un'encefalite ad eziologia infettiva).

Più noto, invece, anche se comunque meno comune rispetto ad altri siti, è il coinvolgimento del SNP, con quadri di radicoloneurite che variano dalla Sindrome di Guillain-Barré a polineuropatie periferiche o più raramente autonome (1).

Tra i test diagnostici, oltre a una visita neurologica, si raccomandano esame del liquor, EMG e biopsia del nervo surale.

l. Sistema emopoietico

Il coinvolgimento del sistema emopoietico può presentarsi sotto forma di piastrinopenia immune, anemia emolitica autoimmune, eosinofilia, citopenie.

In questo caso, è di estrema importanza escludere condizioni quali graft failure (severa complicanza del trapianto che si manifesta con il fallimento da parte del graft nel garantire/mantenere l'attecchimento midollare a causa o di un fenomeno di rigetto o di una scadente funzionalità delle cellule staminali del donatore - poor graft functioning (1)), tossicità da farmaci, infezioni, relapse della malattia di base, citomegalovirus (CMV), emolisi, anemia dei disordini cronici o patologia autoimmune.



A questo scopo, i test diagnostici impiegati sono test di Coombs, emocromo, aspirato midollare, chimerismo, immunofenotipo, CMV DNA ed altre indagini microbiologiche.

### **1.1.3. Meccanismi eziopatogenetici**

La patogenesi della cGVHD resta tuttora poco definita.

Grazie a modelli sperimentali animali sono state mutate diverse ipotesi, che vedono coinvolti vari attori, quali meccanismi di alloreattività T-mediata (dimostrata da una ridotta frequenza di cGVHD in caso di T-deplezione del graft), presenza di cloni T-linfocitari autoreattivi, linfociti T regolatori, linfociti B che producono autoanticorpi.

Dunque, la cGVHD, dal punto di vista fisiopatologico, si caratterizza per un'alterazione della tolleranza immunologica che coinvolge sia l'immunità innata che quella adattativa e vede come principali attori del danno i linfociti B memoria, i quali manifestano una costitutiva iperattività nella produzione di allo/autoanticorpi e sono in grado di sviluppare meccanismi di resistenza all'apoptosi, grazie agli aumentati livelli di B-lymphocyte activating factor (BAF).

L'iperattività dei linfociti B e la loro capacità di produrre anticorpi, alcuni dei quali sono in grado di stimolare l'attività fibroblastica, sono responsabili dell'attivazione dei macrofagi e dell'aumentata produzione di citochine infiammatorie. In particolare, l'aumentata produzione di TGF- $\beta$  e PDGF è responsabile dell'iperattività fibroblastica con conseguente esagerata produzione di collagene, che è il principale determinante delle lesioni fibrotiche simil-sclerodermiche che si osservano in questi pazienti (1).

### **1.1.4. Diagnosi e classificazione**

Come trattato estesamente nell'articolo di Filipovich AH et al., *National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report*. Biol Blood Marrow Transplant. 2005 Dec (14), la NIH Consensus Conference definisce i criteri diagnostici e classificativi della cGVHD, basandosi su una preliminare distinzione tra:

- Segni e sintomi diagnostici: di per sé consentono di fare diagnosi;
- Segni e sintomi distintivi: manifestazioni non tipiche di una aGVHD, ma necessari ulteriori test o coinvolgimento di altri organi per fare diagnosi di cGVHD;

- Entità non classificate: quadri rari, controversi o non specifici per cGVHD, ma riconosciuti come parte di quest'ultima se la diagnosi è confermata;
- Segni e sintomi comuni: manifestazioni riscontrabili sia nella aGVHD che nella cGVHD.

Per fare diagnosi di cGVHD è necessario seguire il seguente iter:

1. Distinzione dalla forma acuta di GVHD;
2. Presenza di almeno 1 segno/sintomo “diagnostico” di cGVHD o di almeno 1 segno/sintomo “distintivo” di cGVHD, con diagnosi di cGVHD confermata dalla biopsia o dai test di laboratorio o radiologici rilevanti nello stesso o in un altro organo;
3. Esclusione di diagnosi alternative (diagnosi differenziale): infezioni, reazioni da farmaci, neoplasie (recidiva o seconda neoplasia), allergie, diarrea da insufficienza pancreatica, psoriasi, ecc.

Mentre in passato la cGVHD veniva classificata in limitata ed estesa, la NIH Consensus Conference ha proposto nuovi criteri di scoring e valutazione della cGVHD.

Per ogni singolo organo o sito interessato, così come anche per il performance status, è stato definito un sistema di scoring clinico che attribuisce un punteggio da 0 a 3. A seconda della somma degli score dei singoli organi o siti, la severità globale del quadro è definita come:

- Lieve: se interessa 1 o 2 organi o siti (eccetto il polmone) con nessuna significativa alterazione funzionale (score massimo in tutti gli organi/siti interessati = 1);
- Moderata: se interessa almeno 1 organo o sito con significato clinico, ma senza disabilità maggiore (score massimo in uno degli organi/siti interessati = 2) oppure se interessa 3 o più organi o siti con nessuna significativa alterazione funzionale (score massimo per ogni organo/sito interessato = 1). Uno score di 1 a livello polmonare determina una GVHD cronica moderata;
- Severa: se sono presenti disabilità maggiori (score = 3 in uno degli organi/siti interessati). Uno score  $\geq 2$  a livello polmonare determina una GVHD cronica severa.

L'attribuzione del punteggio da 0 a 3 segue i criteri descritti in tabella (15):

**Tabella 1.** Scoring clinico per organo della cGVHD

	<b>SCORE 0</b>	<b>SCORE 1</b>	<b>SCORE 2</b>	<b>SCORE 3</b>
<b>PERFORMANCE STATUS</b>				
<p>ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) / KPS (Karnofsky Performance Status) / LPS (Lansky Performance Status)</p>	<p>Paziente asintomatico e completamente attivo (ECOG 0; KPS o LPS 100%)</p>	<p>Paziente sintomatico: deambula autonomamente, ma intollerante allo sforzo (ECOG 1; KPS o LPS 80-90%)</p>	<p>Paziente sintomatico: deambula, autosufficiente, &gt;50% delle ore di veglia non allettato (ECOG 2, KPS o LPS 60-70%)</p>	<p>Paziente sintomatico: non del tutto autosufficiente, &gt;50% delle ore di veglia allettato (ECOG 3-4, KPS o LPS &lt;60%)</p>
<b>CUTE</b>				
<p>-score %BSA (body surface area):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Eritema/rash maculopapulare</li> <li>o Caratteristiche lichen planus – like</li> <li>o Sclerosi</li> <li>o Lesioni papulosquamose o ittiosi</li> <li>o Cheratosi pilare</li> </ul> <p>-score non con %BSA:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o Iperpigmentazione</li> <li>o Ipopigmentazione</li> <li>o Poichiloderma</li> <li>o Prurito severo o generalizzato</li> <li>o Coinvolgimento ungueale</li> </ul>	<p>0% BSA</p> <p>Non caratteristiche sclerotiche</p>	<p>1-18% BSA</p>	<p>19-50% BSA</p> <p>Sclerosi superficiale con cute “pinzabile” (“no hidebound”)</p>	<p>&gt;50% BSA</p> <p>Sclerosi profonda con cute “non pinzabile” (“hidebound”), ridotta mobilità, ulcerazioni, prurito severo</p>

○ Coinvolgimento capillizio				
<b>MUCOSA ORALE</b>				
Caratteristiche lichen planus - like	Nessun sintomo	Sintomi lievi con segni di malattia senza danni significativi della mucosa orale, non limitanti l'assunzione orale	Sintomi moderati con segni di malattia e danni parziali della mucosa orale con parziale limitazione dell'assunzione orale	Sintomi severi con segni di malattia e danni gravi della mucosa orale con importante limitazione dell'assunzione orale
<b>MUCOSA OCULARE</b>				
Cheratocongiuntivite secca (KCS)	Nessun sintomo	Lieve secchezza oculare o segni di KCS, con sintomi lievi che non compromettono le ADL (richiedenti $\leq 3$ applicazioni di lacrime artificiali al giorno)	Moderata secchezza oculare con sintomi che compromettono parzialmente le ADL (richiedenti $\geq 3$ applicazioni di lacrime artificiali al giorno o punctal plugs), ma senza compromissione della vista dovuta alla KCS	Severa secchezza oculare con sintomi che compromettono significativamente le ADL o l'attività lavorativa (richiedenti lenti terapeutiche per il dolore) o perdita della vista dovuta alla KCS
<b>TRATTO GI</b>				
Restrizione esofagea Disfagia Anoressia Nausea	Nessun sintomo	Sintomi senza significativo calo ponderale ( $\leq 5\%$ )	Sintomi associati a calo ponderale lieve/moderato (5-15%) o	Sintomi associati a calo ponderale significativo ( $>15\%$ ),

Vomito Diarrea Calo ponderale (in 3 mesi) Scarsa crescita			diarrea moderata senza impatto significativo nella vita quotidiana	richiedenti supplemento nutrizionale o dilatazione esofagea, o diarrea severa con impatto significativo nella vita quotidiana
<b>FEGATO</b>	Bilirubina totale normale e ALT o AP < 3 x ULN	Bilirubina totale normale con ALT ≥ 3 fino a 5 x ULN o AP > 3 x ULN	Bilirubina totale elevata ma ≤ 3 mg/dL o ALT > 5 ULN	Bilirubina totale elevata > 3 mg/dL
<b>POLMONI</b>				
- Sintomatologia	Nessun sintomo	Sintomi lievi (fame d'aria dopo una rampa di scale)	Sintomi moderati (fame d'aria dopo una camminata in piano)	Sintomi severi (fame d'aria a riposo, necessità di O <sub>2</sub> )
- FEV1	FEV1 ≥ 80%	FEV1 60-79%	FEV1 40-59%	FEV1 ≤ 39%
<b>ARTICOLAZIONI E CONNETTIVO FASCIALE</b>				
P-ROM score di: ○ Spalle ○ Gomiti ○ Polsi / dita ○ caviglie	Nessun sintomo	Lieve rigidità di braccia o gambe, range di mobilità (ROM) normale o lievemente ridotto e non	Rigidità di braccia o gambe o contratture articolari, eritema dovuto alla fascite, ROM	Contratture con ROM significativamente ridotto e severa limitazione ADL (incapacità di allacciarsi le

		interferente le ADL	moderatamente ridotto e lieve/moderata limitazione ADL	scarpe / abbottonare la camicia, ecc.)
<b>TRATTO GENITALE</b>	Nessun segno o sintomo	Segni lievi. Possibile disagio all'esame ginecologico	Segni moderati e possibili sintomi con discomfort e dispareunia	Segni severi con o senza sintomi (stenosi, ulcere severe, intolleranza alla visita ginecologica)
<b>ALTRI POSSIBILI INDICATORI</b>	Nessun impatto funzionale	Lieve impatto funzionale	Moderato impatto funzionale	Severo impatto funzionale
<ul style="list-style-type: none"> <li>- ascite</li> <li>- versamento pericardico</li> <li>- versamento pleurico</li> <li>- sindrome nefrosica</li> <li>- miastenia gravis</li> <li>- neuropatia periferica</li> <li>- polimiosite</li> <li>- calo ponderale senza sintomi GI</li> <li>- eosinofilia &gt; 500/μl</li> <li>- PLT &lt;100/μl</li> </ul>				

[Fonte: Carreras E. et al., *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*, chapter 44, Springer Nature, 7<sup>th</sup> edition, 2019.]

### 1.1.5. Fattori di rischio e fattori prognostici

I fattori di rischio associati alla possibilità di sviluppare una cGVHD sono molteplici ed è stata dimostrata una correlazione con:

- Trapianto;
- Paziente;
- Donatore.

Tra i fattori di rischio trapianto-correlati si annovera sicuramente la presenza di aGVHD, ma si è riscontrata anche una sostanziale differenza tra matched unrelated donor (MUD) / aploidentico e familiare HLA-identico. Il rischio aumenta anche in correlazione con l'utilizzo di peripheral blood stem cells (PBCS) (16) e in caso di donor lymphocyte infusion (DLI).

Per quanto riguarda il paziente, un'età più avanzata del ricevente correla con un rischio aumentato di cGVHD. Infatti, regimi di condizionamento meno aggressivi (4) e un miglioramento delle supportive care hanno portato ad una riduzione della TRM, rendendo candidabili a questo tipo di procedura anche pazienti di età superiore a 60-65 anni (17), (18), (19).

Infine, relativamente al donatore, un mismatch di sesso (inteso in termini di donatore di sesso femminile e ricevente di sesso maschile) può rappresentare un fattore di rischio aggiuntivo (9).

Resta ancora controversa l'interpretazione del ruolo di altri fattori nell'aumentare il rischio di cGVHD, in particolare:

- Elevata quantità di CD34 infuse;
- Rapido raggiungimento di chimerismo full donor;
- Sieropositività e riattivazione di CMV;
- Uso di steroidi nel trattamento della aGVHD;
- Trapianto per LMC e anemia aplastica.

Per quanto riguarda la prognosi, essendo la cGVHD la principale causa di non relapse mortality, sono stati riscontrati alcuni fattori correlati con un rischio più elevato di NRM, quali:

- Trombocitopenia  $< 100 \times 10^9/L$ ;

- Comparsa progressiva di segni di cGVHD a partire da una aGVHD.

A questi si aggiungono elevati livelli di bilirubina, coinvolgimento cutaneo esteso lichen planus-like, basso PS, diarrea, storia di pregressa aGVHD e mancanza di risposta alla terapia per la cGVHD.

### **1.1.6. Terapia**

La finalità della terapia della cGVHD è quella di interrompere il meccanismo di danno organico mediato dal sistema immunitario e stabilire uno stato di tolleranza immunologica. Si tratta di una terapia a lungo termine che può arrivare ad essere interrotta a definitivamente a distanza di anni (l'85% dei pazienti che sopravvive per un periodo di tempo maggiore di 5 anni è in grado di interromperla). Come accennato in precedenza, la terapia della cGVHD si fonda dapprima su una componente profilattica e successivamente su una gestione terapeutica vera e propria tarata sul paziente e sulle sue manifestazioni cliniche, sia in termini sintomatologici sia di riscontro oggettivo, nonché sugli organi coinvolti e sulla severità del quadro. Generalmente, la terapia topica può essere utilizzata in caso di cGVHD lieve (interessamento di 1 o 2 siti, eccetto il polmone, con lieve intensità e nessun impatto sulla funzionalità), mentre sarà più spesso una terapia sistemica se la severità globale della cGVHD è maggiore (moderata o severa, quindi con interessamento di 3 o più siti o di entità moderata anche in un solo sito).

Alla terapia strettamente connessa alla prevenzione e gestione della cGVHD si somma anche la necessità di associare una profilassi antimicrobica, essendo le infezioni la principale causa di mortalità di questi pazienti (20).

#### 1.1.6.1 Profilassi

Come anticipato in precedenza, per quanto riguarda la profilassi della GVHD, questa viene ad essere eseguita su tutti i pazienti sottoposti ad allotrapianto, il più delle volte con una combinazione di un inibitore della calcineurina (CNI), generalmente *ciclosporina (CsA)* o *tacrolimus*, e un antimetabolita, tipicamente *methotrexate (MTX)*. Rispetto alla combinazione CNI più *methotrexate*, l'uso di CNI abbinato a *micofenolato mofetile (MMF)* consente di ottenere risultati simili in termini di incidenza della GVHD, ma con un tasso di tossicità inferiore in termini di neutropenia o mucosite. L'uso di *globuline anti-timociti* (meglio note come *ATG*) è stato associato a un minor rischio di GVHD acuta e cronica in studi prospettici



randomizzati, così come l'uso di *ciclofosfamide* post-trapianto. Altri studi prospettici hanno valutato l'uso di recettori come CCR5 o  $\alpha 4\beta 7$  per evitare il traffico delle cellule T negli organi bersaglio della GVHD, bloccanti delle citochine o agonisti dei checkpoint immunitari. Inoltre, i modificatori epigenetici hanno mostrato risultati promettenti negli studi di fase II (7).

Ovviamente, il tentativo di prevenire la GVHD non deve sottovalutare un bilanciamento della terapia immunosoppressiva, in quanto, in caso contrario, comporta il rischio di altre complicazioni, come il rigetto, la recidiva o un ritardo nella reimmunizzazione (21).

#### 1.1.6.2. Terapia sistemica

Di fondamentale importanza è il ruolo della terapia sistemica, la quale può essere coadiuvata da terapie topiche applicate nel distretto di interesse (ad esempio per il cavo orale o la superficie corneale) o anche misure ancillari non strettamente farmacologiche, quali terapie fisiche, misure dietetiche o supporto nutrizionale.

La terapia sistemica si articola, se necessario, su più linee di trattamento:

- 1° linea:

*Prednisone (PDN)* 1 mg/kg/die in eventuale associazione con *ciclosporina (CSP)* circa 6 mg/kg/die, calcolati sul peso ideale (o reale se minore) e suddivisi in 2 somministrazioni, da aggiustare in base al livello della ciclosporinemia per 2 settimane.

In relazione ai noti effetti collaterali e complicità relate alla terapia steroidea a lungo termine, la dose di prednisone deve essere poi scalata fino a raggiungere la dose minima sufficiente per il controllo dei sintomi. In generale, dopo due settimane di terapia a dose piena, il prednisone va scalato del 25% alla settimana fino alla dose di 0.1mg/kg a giorni alterni e può essere sospeso dopo almeno 4 settimane di trattamento a questo dosaggio.

In caso di riesacerbazione, la dose di prednisone deve essere riaumentata almeno di due step o va risomministrato a dose piena a seconda del quadro clinico. Il trattamento deve essere continuato per almeno 3 mesi prima di ritentare il taper.

In caso di mancata risposta, sarà necessario l'avvio di una terapia di salvataggio.

- 2° linea:

Circa la metà dei pazienti affetti da cGVHD diventa steroide-refrattario (SR), il che incrementa sensibilmente il rischio di morbidità e mortalità. Si definiscono SR-cGVHD quei pazienti che non rispondono adeguatamente alla dose piena di *prednisone* (1mg/kg) per due settimane oppure rimangono in stabilità clinica dopo 4-6 settimane di trattamento con *prednisone* ad un dosaggio > 0.5mg/kg o che non riescono ad eseguire il taper steroideo e scendere sotto la dose di 0.5mg/kg/die.

In questi pazienti, pertanto, si avvia terapia di seconda linea, la quale tende ad essere adattata al paziente e generalmente viene discussa all'interno del team trapianti.

In generale, in caso di mancata risposta alla terapia di prima linea con steroide +/- inibitori della calcineurina (se non già a dosaggio terapeutico) o di impossibilità alla prosecuzione di tale terapia, si procederà, a seconda del quadro clinico, con diverse opzioni terapeutiche, alcune delle quali ancora utilizzate in modalità *off-label*, in quanto non ancora definita l'indicazione per la cGVHD, ma sulla base di dati di efficacia ottenuti in ambito clinico:

- a. *Ruxolitinib* 10 mg\*2/die o 5mg\*2/die se PLTS<50.000 (22), (23): data la riconosciuta efficacia del farmaco (JAK Inhibitor), il suo utilizzo è ad oggi stato esteso in modalità off-label anche alla gestione della GVHD, nonostante l'attuale indicazione sia ancora per il trattamento della Mielofibrosi primaria o secondaria a Policitemia Vera o Trombocitemia Essenziale.
- b. *Fotoaferesi extracorporea (ECP)*: indicazione in tutte le forme ad interessamento cutaneo esteso o mucoso, in quelle intestinali, polmonari ed epatiche. È un procedimento basato sulla leucocitafereesi con un profilo di efficacia significativa e un profilo di sicurezza eccellente, senza la necessità di immunosoppressione (24).
- c. *Ibrutinib* 420 mg/die (25): si tratta di un tirosina-kinasi inibitore (TKI) con indicazione per il Linfoma Mantellare (MCL), la Leucemia Linfatica Cronica (CLL) e la Macroglobulinemia di Waldenström (WM), ma questa molecola, agendo sulla tirosina chinasi di Bruton (BTK), è anche in grado di alterare il ruolo delle cellule B e T nella patogenesi della GVHD stessa, motivo per cui può essere prescritto off-label.
- d. *Micofenolato mofetile* 1000mg\*2/die.
- e. *Rituximab* 375 mg/m<sup>2</sup> settimanale per 4 dosi in caso di GVHD cutanea, muscolo scheletrica, cavo orale.

- f. *Imatinib* 200-400 mg/die: il farmaco è utilizzato in modalità off-label per il trattamento della GVHD cutanea sclerodermica o nei casi di GVHD polmonare, in quanto la sua indicazione ufficiale è nel contesto di Leucemia Mieloide Cronica (LMC) con cromosoma Philadelphia positivo (Ph+), Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA) Ph+, malattie mielodisplastiche/mieloproliferative (MDS/MPD) associate a riarrangiamenti di PDGFR, sindrome ipereosinofila avanzata (HES) o Leucemia Eosinofila Cronica (LEC) con riarrangiamento FIP1L1-PDGFR $\alpha$ , tumori stromali del tratto gastro-intestinale (GIST) con mutazione di c-Kit e dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP).

Di rilevante interesse, recentemente approvato e quindi disponibile anche in Italia, il *Belumosudil*, inibitore di ROCK2, il cui utilizzo era già stato approvato da FDA nei pazienti di età superiore a 12 anni con cGVHD in terza linea di terapia (26).

#### 1.1.6.3. Terapia topica

La terapia topica può essere di notevole aiuto soprattutto a livello cutaneo, del cavo orale, del distretto oculare e vulvovaginale, eventualmente anche come unica modalità di approccio terapeutico nel caso delle forme più lievi di cGVHD.

#### - cGVHD orale

In particolare, a livello della cavità orale la terapia topica è spesso più efficace di quella sistemica. Potrebbe essere sufficiente la sola terapia topica se l'interessamento orale è lieve o moderato; se invece l'interessamento è severo (come in caso di sclerosi) o la lesione orale non risponde alla terapia ancillare, è necessaria la terapia sistemica.

Tra le misure terapeutiche frequentemente adottate si annoverano steroidi ad alta potenza in gel, come ad esempio *fluocinonide* 0.05% gel, *clobetasol* 0.05% gel e *betametasona dipropionato* 0.05% gel.

Lesioni più generalizzate sono trattate con steroide in sciacqui (*desametasona* 0.5 mg/5 ml soluzione o *triamcinolone* 0.1% soluzione acquosa).

In casi refrattari si può effettuare un tentativo con sciacqui di *ciclosporina* 100 mg/ml soluzione orale. In caso di lesioni dolorose si consigliano sciacqui di 5 ml al bisogno di *lidocaina* viscosa 2% soluzione mescolata con *maalox-benadryl* 1:1.

Sono inoltre consigliati farmaci stimolanti la salivazione (*cevimelina* c 30 mg 1 c x 3 al dì o *pilocarpina* c 5 mg 1-2 c x 3 al dì) o saliva artificiale. Vanno invece ovviamente evitati farmaci che riducono la salivazione (antidepressivi triciclici, inibitori del reuptake della serotonina, antistaminici) (11).

- cGVHD oculare

In caso di interessamento oculare, come primo presidio viene consigliato l'uso di lacrime artificiali, le quali possono essere sia in formulazioni più dense, come ad esempio *Celluvisc*, oppure in unguento (ad esempio *Lacrilube* o *Hypotears*), consigliabili per il riposo notturno. A queste si aggiungono pomate oculari, steroidi topici, ciclosporina topica in gocce, bendaggi, occlusione del dotto lacrimale o altri provvedimenti (15).

Una valutazione specialistica da parte di un oculista è importante per stabilire la necessità dell'uso di steroidi topici per gli occhi.

Tuttavia, negli ultimi anni sono in fase di studio opzioni terapeutiche innovative in alternativa agli steroidi, soprattutto nei casi caratterizzati da manifestazioni cliniche più marcate o con segni di iniziali danni dei tessuti oculari, come gel piastrinici preparati da sangue autologo o cordonale, i quali verranno ampiamente discussi nelle sezioni successive.

- cGVHD cutanea

A livello cutaneo si può tentare una gestione con emollienti topici, ma soprattutto steroidi topici. In particolare, l'approccio più diffuso alla comparsa delle lesioni è con *desossimetasone* (bustine da 2,5 mg in 1 g di emulsione).

- cGVHD vulvovaginale

Un riscontro di cGVHD vulvovaginale può essere gestito attraverso l'applicazione topica di lubrificanti a base acquosa, estrogeni, steroidi, ciclosporina, dilatatori, fino alla chirurgia per estese sinechie.

## 1.2. cGVHD oculare

### 1.2.1. Definizione

Nonostante il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) sia potenzialmente un salvavita per numerose patologie ematologiche maligne (27) (28) e non (come nel caso di severe immunodeficienze o emoglobinopatie (29)), in seguito ad esso sono possibili svariate complicanze, fra le quali si annovera un possibile coinvolgimento oculare, il quale può essere correlato o meno alla *graft versus host disease* (GVHD) (15).

Il coinvolgimento oculare non GVHD-correlato, il cui rischio è aumentato in caso di terapia steroidea, TBI e diabete, può determinare condizioni come infezioni, uveiti, cataratta, glaucoma e anomalie del segmento posteriore (15).

Le manifestazioni oculari nel contesto della aGVHD vanno dall'iperemia congiuntivale alla congiuntivite pseudomembranosa (30): esse sono piuttosto rare, ma riportate in letteratura in quanto possono determinare un danno oculare irreversibile e una prognosi piuttosto sfavorevole (31).

Sicuramente più frequente (con una ricorrenza che varia dal 40 al 60% dei pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali) è, invece, il coinvolgimento oculare in un quadro di cGVHD sistemica (32), il quale può presentarsi con alterazioni congiuntivali (fibrosi o infiammazione cronica persistente con eritema congiuntivale), atrofia delle ghiandole lacrimali (riduzione della lacrimazione e sindrome secca), blefarite o, soprattutto, cheratocongiuntivite secca.

I disturbi correlati a questa condizione sono generalmente irritazione congiuntivale, xeroftalmia e lesioni corneali (con conseguente occhio rosso), fino a possibili severe alterazioni del visus, inclusa la cecità (1) (33), con un notevole impatto sulla qualità di vita (34). I pazienti avvertono fotofobia, dolore, sensazione di corpo estraneo e occhio secco, a cui si aggiunge la possibilità di una sovrainfezione e conseguente congiuntivite. Da un punto di vista sintomatologico, quindi, la cGVHD oculare può essere assimilata alla condizione di pazienti con patologie autoimmuni coinvolgenti la superficie oculare, come la Sindrome di Sjögren (35), non a caso inclusi anch'essi nello studio clinico in oggetto.

### **1.2.2. Fattori di rischio**

Tra i fattori di rischio si annoverano differenze in termini di genere e di HLA tra donatore e ricevente e un'età più avanzata del donatore, i quali si sommano a fattori preesistenti nel ricevente, quali diabete e ipertensione (15).

Come descritto per la cGVHD in generale, anche per la cGVHD oculare si annoverano fra i fattori di rischio episodi precedenti di GVHD acuta, l'utilizzo di cellule staminali estratte dal sangue periferico, trapianti da donatrici di sesso femminile a riceventi di sesso maschile, ma anche l'assenza di trattamento preventivo con *globulina anti-timocitaria (ATG)* e un coinvolgimento esteso di organi e tessuti da GVHD. Inoltre, è stato riscontrato un rischio aumentato in caso di donatori EBV-positivi, etnia asiatica, discrepanze negli antigeni HLA, età avanzata del donatore o del ricevente. Infine, condizioni preesistenti come la secchezza oculare o disfunzioni delle ghiandole di Meibomio prima del trapianto possono incrementare il rischio di GVHD oculare o peggiorarne i sintomi in fase successiva.

Invece, procedure come il trapianto di cellule staminali da cordone ombelicale, la deplezione delle cellule T sia in vitro che in vivo (trapianto T-depleto), o l'applicazione di *ciclofosfamide* dopo il trapianto possono abbassare il rischio di sviluppare GVHD (29).

### **1.2.3. Manifestazioni cliniche**

I tessuti oculari affetti da aGVHD e/o cGVHD comprendono la palpebra e la cute periorbitale, la congiuntiva, la cornea, il cristallino, il sistema lacrimale, la sclera, l'uvea e la retina.

Molti sintomi oculari possono essere la prima e unica presentazione della GVHD oculare, mentre altri hanno il potenziale di progredire in condizioni gravi come ulcerazione, fusione e perforazione della cornea, che possono occasionalmente portare all'eviscerazione, motivo per cui il monitoraggio e la diagnosi tempestiva sono essenziali per evitare evoluzioni così drastiche, che possono compromettere permanentemente la vista e la qualità della vita del paziente (36) (37) (38), con un impatto stimato della malattia comparabile all'uveite erpetica o all'occlusione venosa retinica (39).

Inoltre, è stato osservato che un danno oculare più severo al baseline correla con un rischio aumentato di successivo peggioramento e compromissione della visione (40), motivo per cui può valere la pena di effettuare uno screening oculistico in questi pazienti a 3-6 mesi dal trapianto, in modo da intercettare il prima possibile l'instaurarsi del quadro (41).

Le caratteristiche cruciali della malattia sono una nuova insorgenza di occhio secco refrattario, che rappresenta la manifestazione più frequente (40% - 70%), e danni secondari alla superficie oculare (42).

Anche la cataratta è una complicanza tardiva comune dell'allo-SCT, ma è attribuita principalmente all'irradiazione e alla terapia steroidea (33).

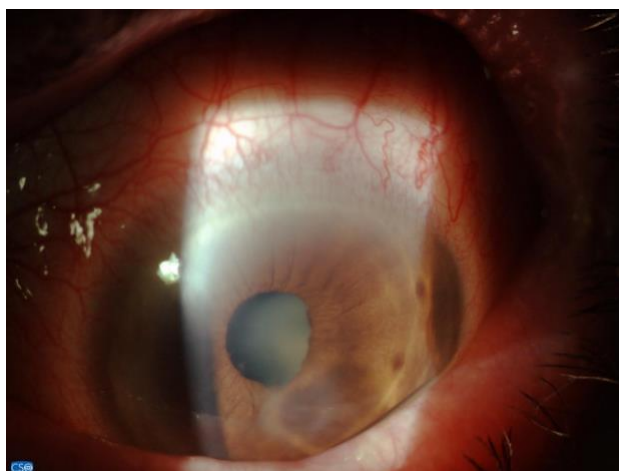
a. Manifestazioni della superficie oculare

Le complicanze a livello della superficie oculare e della cornea possono essere il risultato diretto del coinvolgimento delle cellule caliciformi congiuntivali o un risultato indiretto della stasi delle ghiandole lacrimali causata dallo stato di immunosoppressione o dall'irradiazione corporea totale (TBI) (43).

A livello congiuntivale e corneale si determinano quadri di cheratinizzazione, assottigliamento epiteliale e metaplasia squamosa (33) (44).

Le anomalie morfologiche della cornea sono rappresentate da cheratite puntata (caratterizzata dal decadimento di piccoli gruppi cellulari sulla superficie della cornea), erosioni o cheratite filamentosa (caratterizzata dalla morte delle cellule in superficie che formano filamenti che rimangono adesi alla superficie della cornea) nei casi più gravi. Inoltre, possono comparire deficit delle cellule staminali del limbus (porzione più esterna della cornea), assottigliamento dello stroma, ulcerazione, cicatrizzazione, calcificazione e neovascolarizzazione, fino ad arrivare a casi gravi di perforazione corneale.

**Figura 1.** Ulcera corneale



[Azienda Ospedaliero-Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria – SC Oculistica. Paziente AL03: ulcera corneale in paziente con cGVHD oculare al T0]

b. Occhio secco

La sindrome dell'occhio secco (DES) o cheratocongiuntivite secca è la complicanza più frequente della cGVHD oculare e si verifica nel 40-76% dei pazienti (45), anche in assenza di altre complicanze sistemiche. Sebbene la causa principale del DES sia la cGVHD, possono contribuire anche l'irradiazione, la chemioterapia, la terapia immunosoppressiva ed eventuali infezioni; inoltre, nelle forme più gravi possono incrementare il rischio anche la malattia delle ghiandole di Meibomio (46), anch'esse coinvolte nel processo patologico, e il trapianto da donatrice di sesso femminile a ricevente di sesso maschile (47).

La tempistica media entro la quale generalmente si sviluppa la cheratocongiuntivite secca è di circa sei mesi.

La sintomatologia tipica comporta secchezza oculare e sensazione di corpo estraneo con conseguenti affaticamento oculare, secrezione e sensazione di opacità, a cui possono eventualmente aggiungersi altri sintomi, quali bruciore, pizzicore, prurito, indolenzimento e pesantezza delle palpebre e fotofobia (33). Nella maggior parte dei pazienti, i sintomi progrediscono fino a grave secchezza oculare simile alla sindrome di Sjögren.

I sintomi vengono classificati allo scopo di attribuire un punteggio alla cGVHD come illustrato in tabella.

**Tabella 2.** Grading della dry eye syndrome nella GVHD

<b>GVHD score</b>	<b>SINTOMATOLOGIA OCULARE</b>
0	Assenza di sintomi
1	Sintomi da occhio secco che non impattano sulle attività quotidiane (necessità di collirio $\leq$ 3 volte al giorno) o segni di cheratocongiuntivite secca asintomatica
2	Sintomi da occhio secco che impattano parzialmente sulle attività quotidiane (necessità di collirio $>$ 3 volte al giorno o punctal plugs) senza compromissione della visione
3	Sintomi da occhio secco che impattano significativamente sulle attività quotidiane o determinano un'incapacità lavorativa a causa della sintomatologia o perdita della visione dovuta alla cheratocongiuntivite secca



[Fonte: Nassiri N et al., *Ocular graft versus host disease following allogeneic stem cell transplantation: a review of current knowledge and recommendations*. J Ophthalmic Vis Res. 2013 Oct.]

c. Malattia congiuntivale

Il coinvolgimento congiuntivale nella GVHD può essere osservato in circa il 10% dei casi (48), prevalentemente in termini di iperemia e chemosi.

A questo livello la cGVHD può progredire a partire da sequele della forma acuta, come cicatrici congiuntivali e simblefaron, ovvero un'aderenza patologica tra la palpebra e la congiuntiva che ricopre il globo oculare, instauratisi in conseguenza di una significativa infiammazione e desquamazione congiuntivale (33). La fibrosi congiuntivale e la successiva cicatrizzazione possono non solo causare la perdita di cellule caliciformi, ma anche entropion, distichiasi (presenza di una o più file aggiuntive di ciglia, generalmente poste in corrispondenza dello sbocco delle ghiandole del Meibomio) e trichiasi (deviazione delle ciglia che sfregano contro il bulbo oculare, in un soggetto non affetto da entropion). Pertanto, è obbligatoria un'attenta ispezione subtarsale per determinare la patologia anche sotto la palpebra superiore (49).

I sintomi vengono classificati allo scopo di attribuire un punteggio alla cGVHD come illustrato in tabella.

**Tabella 3.** Grading della malattia congiuntivale nella GVHD

<b>GVHD score</b>	<b>SINTOMATOLOGIA OCULARE</b>
0	Assenza di sintomi
1	Iperemia congiuntivale
2	Iperemia congiuntivale con risposta chemotica ed essudato sierosanguigno
3	Congiuntivite pseudomembranosa
4	Congiuntivite pseudomembranosa con desquamazione epiteliale corneale e successiva cicatrice congiuntivale e formazione di simblefaron

[Fonte: Nassiri N et al., *Ocular graft versus host disease following allogeneic stem cell transplantation: a review of current knowledge and recommendations*. J Ophthalmic Vis Res. 2013 Oct.]

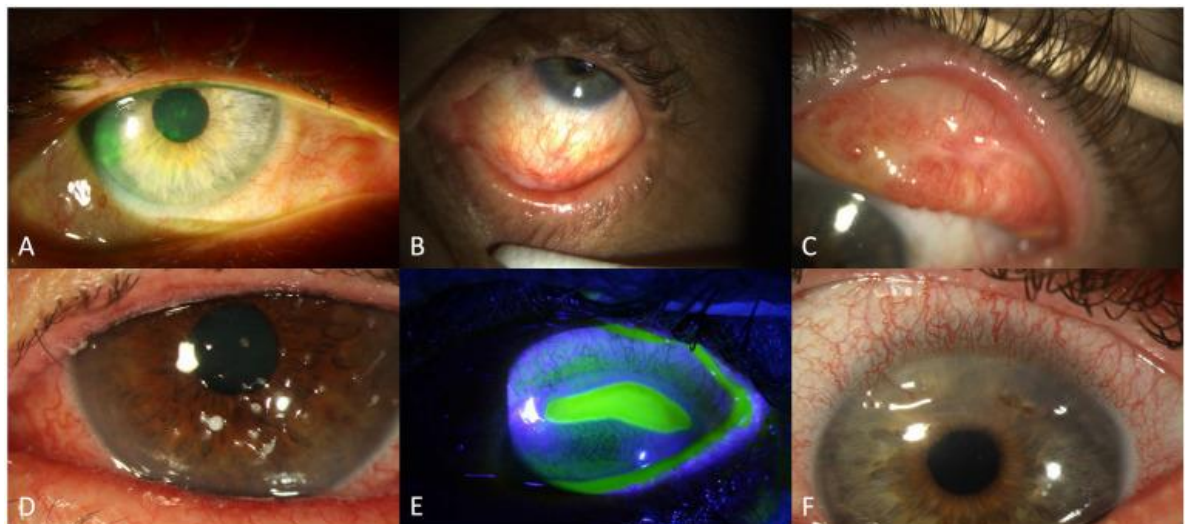
d. Altre manifestazioni

Altre manifestazioni oculari della GVHD includono complicanze cutanee come dermatite palpebrale, lagofalmo ed ectropion. L'uveite può verificarsi fino all'8% dei casi dei pazienti con cGVHD.

Le complicazioni neurooftalmologiche, come l'edema del disco ottico, probabilmente sono secondarie agli effetti tossici di agenti chemioterapici come la ciclosporina A e/o a condizioni mediche concomitanti, e solitamente sono reversibili (50).

La principale complicanza vitreoretinica osservata in associazione con la GVHD è una microvasculopatia retinica, che può verificarsi nel 10% dei casi (33).

**Figura 2.** Reperti in cGVHD oculare (oGVHD)



Reperti nella oGVHD: iperemia congiuntivale e colorazione corneale (A), cicatrizzazione/fibrosi congiuntivale (B), iperemia congiuntivale e simblefaron (C), cheratite filamentosa (D), ulcera corneale sterile (E) e fusione corneale con perforazione (F).

[Fonte: Tappeiner C, Heiligenhaus A, Halter JP, Miserocchi E, Bandello F, Goldblum D. *Challenges and concepts in the diagnosis and management of ocular graft-versus-host disease*. Front Med (Lausanne). 2023 Feb 16;10:1133381. doi: 10.3389/fmed.2023.1133381. PMID: 36891189; PMCID: PMC9987249.]

#### 1.2.4. Meccanismi eziopatogenetici

La fisiopatologia della GVHD oculare, sia nella forma acuta che nella molto più frequente espressione cronica (51), si può sintetizzare come un disordine immunomediato che coinvolge non solo il comparto B e T linfocitario, ma una molteplicità di cellule associate al sistema immunitario, come macrofagi, cellule B e cellule T (52) (53) (54).

Nella forma acuta (aGVHD) si instaura un'interazione tra le cellule T del donatore e i tessuti ospiti che si articola in un processo in tre fasi:

1. danno al tessuto ricevente mediante il regime di condizionamento pre-trapianto;
2. presentazione dell'antigene del ricevente e conseguente attivazione delle cellule T del donatore seguita da espansione clonale;
3. morte cellulare indotta da cellule T attivate, citochine (TNF- $\alpha$ ) e altre cellule immunitarie innate.

Il processo infiammatorio nell'aGVHD si instaura principalmente a livello dei tessuti delle ghiandole congiuntivali e lacrimali e sembra coinvolgere prevalentemente le cellule T-helper di tipo 1, IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-1 (1).

Per quanto riguarda, invece, la fisiopatologia della cGVHD, il segno distintivo è l'espressione dell'IFN- $\gamma$  e, considerate le numerose somiglianze, è spesso paragonata ad una malattia autoimmune. Sono presenti fibrosi eccessiva, deposizione di collagene, produzione di anticorpi e soppressione della risposta infiammatoria acuta.

Contrariamente alla aGVHD, le cellule presentanti l'antigene del donatore svolgono un ruolo nella patogenesi della forma cronica della malattia (55).

Nei modelli animali di cGVHD, le cellule T-helper di tipo 2 producono citochine come IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$  in assenza di IL-2 (33) (56).

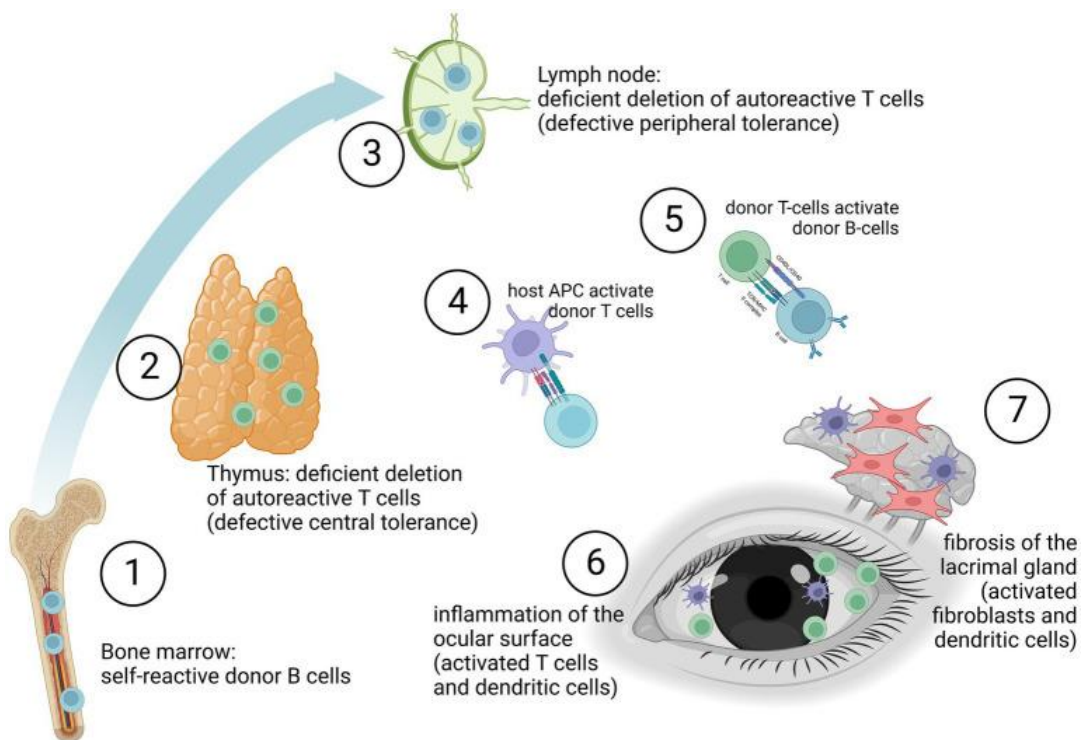
Il coinvolgimento oculare nella cGVHD ad opera di fibroblasti e linfociti T si presenta come infiltrazione e distruzione infiammatoria della congiuntiva e delle ghiandole lacrimali con fibrosi, diminuzione della densità delle cellule caliciformi e una conseguente diminuzione della produzione lacrimale, da cui il danno corneale. La fisiologia lacrimale risulta essere gravemente compromessa e il tasso di turnover lacrimale risulta essere addirittura più basso rispetto a quello dei soggetti affetti da Sindrome di Sjögren, mentre l'evaporazione e l'osmolarità sono più elevate e lo strato lipidico appare più instabile.

Dal punto di vista fisiopatologico, quindi, i linfociti T auto-reattivi derivanti dal donatore non vengono correttamente eliminati né nel timo (difetto della tolleranza centrale) né nei linfonodi (difetto della tolleranza periferica) e si genera una risposta immunitaria mediata dai linfociti T che promuove un riconoscimento degli antigeni dell'ospite. Tale risposta infiammatoria, favorita da uno squilibrio tra le funzioni dei linfociti T effettori e regolatori (57) (58), è principalmente determinata dalle discrepanze nell'espressione degli antigeni tra ospite e donatore, come ad esempio le differenze di HLA, sia per quanto riguarda i complessi maggiori di istocompatibilità (MHC) sia per gli antigeni minori di istocompatibilità (miHAG) (59) (60) (61).

Sebbene siano coinvolte anche le cellule B e le cellule presentanti l'antigene (APC), i linfociti T del donatore sembrano rappresentare il fulcro della malattia sistemica così come di quella oculare (62), nella quale si ritiene che l'attivazione delle APC, la differenziazione, la proliferazione e l'attivazione dei linfociti T del donatore, insieme all'attivazione delle cellule B e al rilascio di citochine pro-infiammatorie, contribuiscano all'infiammazione della superficie oculare e alla fibrosi della ghiandola lacrimale.

Il meccanismo fisiopatologico descritto è rappresentato graficamente nell'immagine seguente.

**Figura 3.** Fisiopatologia della GVHD oculare



[Fonte: Tappeiner C, Heiligenhaus A, Halter JP, Miserocchi E, Bandello F, Goldblum D. *Challenges and concepts in the diagnosis and management of ocular graft-versus-host disease*. Front Med (Lausanne). 2023 Feb 16;10:1133381. doi: 10.3389/fmed.2023.1133381. PMID: 36891189; PMCID: PMC9987249.]

L'attivazione del sistema immunitario e la fibrosi progressiva si riflettono, da un punto di vista istologico, con il riscontro nelle ghiandole esocrine interessate di una marcata fibrosi dell'interstizio e di un aumento significativo del numero di fibroblasti, accompagnati da un'inflammatione linfocitaria lieve (incremento delle cellule T nelle zone adiacenti ai dotti).

Nelle zone circostanti i dotti, quindi, si osserva una co-localizzazione di cellule T CD4+ e CD8+ con fibroblasti stromali che presentano un insieme completo di molecole di superficie necessarie per la presentazione dell'antigene. Questi risultati indicano in modo dirimente che i fibroblasti situati nelle aree periduttali partecipano attivamente ai processi di fibrogenesi e risposta immunitaria, interagendo con le cellule T nella ghiandola lacrimale di pazienti affetti da GVHD cronica (63).

A livello clinico, la severità della xeroftalmia sembra essere maggiormente legata all'estensione dei cambiamenti fibrotici piuttosto che all'intensità dell'infiltrazione linfocitaria, indicando come l'accumulo esagerato di matrice extracellulare sia il principale responsabile della disfunzione delle ghiandole esocrine (64).

### **1.2.5. Diagnosi e grading**

Al momento dell'insorgenza di una sintomatologia oculare in un paziente sottoposto a trapianto allogenico di midollo osseo è importante programmare una visita oculistica, oltre alla valutazione soggettiva della sintomatologia tramite appositi questionari, tra i quali spicca sicuramente l'Ocular Surface Disease Index (OSDI), utilizzabili anche a scopo di screening.

Infatti, le numerose complicanze oculari della GVHD richiedono un attento monitoraggio attraverso la valutazione dei sintomi ed esami oftalmici completi, tra cui test dell'acuità visiva, esame con lampada a fessura, analisi dell'occhio secco, tonometria e oftalmoscopia. Inoltre, le misurazioni dell'osmolarità del film lacrimale riscontrano valori aumentati nella cGVHD e possono essere utilizzate come ulteriore fattore utile a coadiuvare le decisioni terapeutiche (65).

Oltre alle manifestazioni e ai risultati degli esami, la diagnosi di GVHD oculare può essere effettuata mediante biopsie congiuntivali e delle ghiandole lacrimali, le quali però non dovrebbero essere eseguite di routine, a causa del rischio di ulteriore compromissione della loro funzione, ma possono essere considerate in pazienti selezionati.

A livello delle biopsie delle ghiandole lacrimali interessate da cGVHD è possibile osservare infiltrazione monocitaria, perdita di lobuli acinari e fibrosi della ghiandola (66) (67). Nel campione congiuntivale, invece, sono evidenziabili esocitosi linfocitaria, vacuolizzazione dell'epitelio basale e necrosi delle cellule epiteliali; inoltre, sono state identificate cellule T, probabilmente responsabili dell'allorreattività nella cGVHD (68).

Nel corso degli ultimi decenni, sono stati proposti diversi criteri per diagnosticare la GVHD oculare (oGVHD) (69).

Il sistema NIH eye score è un sistema di punteggio clinico proposto come criterio di consenso NIH nel 2005, come parte di una valutazione globale della gravità della cGVHD basata sul numero di organi coinvolti e sul grado di compromissione degli organi colpiti (14). L'NIH eye score mostra la massima sensibilità ai cambiamenti dei sintomi tra varie scale comuni, tra cui la valutazione globale dei sintomi oculari, la Lee eye subscale (70), l'Ocular Surface Disease Index (OSDI) (71) e il test di Schirmer (72).

#### 1.2.5.1. Lee eye subscale

La Lee cGVHD Symptom Scale (LSS) è stata sviluppata per misurare i sintomi nei pazienti adulti con cGVHD. La scala contiene 30 item raggruppati in 7 sottoscale (cute, occhi, bocca, polmoni, nutrizione, energia e assetto psicologico) e richiede due minuti per essere completata.

I pazienti devono indicare quanto si sentono "infastiditi" da ciascun sintomo nell'ultimo mese utilizzando una scala Likert a 5 punti, che va da "per niente" a "estremamente". Il punteggio varia da 0 a 100, con un progressivo peggioramento dei sintomi per valori più alti (70).

Per quanto riguarda la sezione dedicata agli occhi, gli item valutati sono tre:

- secchezza oculare
- necessità di utilizzare colliri frequentemente
- difficoltà di visione

### 1.2.5.2. Ocular Surface Disease Index (OSDI)

L'Ocular Surface Disease Index (OSDI) è una scala di 12 elementi per la valutazione dei sintomi correlati alla malattia dell'occhio secco e al loro effetto sulla vista nell'ultima settimana della vita del paziente. Il questionario ha 3 sottoscale: sintomi oculari, funzione visiva e trigger ambientali.

In particolare, si articola come segue:

- valutazione della presenza nell'ultima settimana di:
  1. occhi sensibili alla luce
  2. sensazione di sabbia negli occhi
  3. dolore o irritazione oculare
  4. visione annebbiata
  5. visione insufficiente
- valutazione della presenza nell'ultima settimana di difficoltà nello svolgimento di qualcuna di queste azioni:
  6. lettura
  7. guida notturna
  8. lavorando al computer
  9. guardando la TV
- valutazione della presenza di fastidio agli occhi in qualcuna di queste situazioni:
  10. condizioni di vento
  11. frequentando luoghi molto secchi
  12. frequentando luoghi con aria condizionata

I pazienti danno una valutazione con risposte su una scala da 0 a 4 (dove 0 = mai, 1 = alcune volte, 2 = metà del tempo, 3 = quasi sempre, 4 = sempre) a ciascuna di queste domande e viene calcolato un punteggio finale che va da 0 a 100 (71).

Il punteggio totale viene calcolato sulla base della seguente formula:

$$OSDI = \frac{\text{somma della severità di tutte le risposte date} \times 100}{\text{numero delle risposte date} \times 4}$$

Valori di OSDI:

- 0 - 12 = superficie oculare normale;
- 13 - 22 = condizione lieve di occhio secco;
- 23 - 32 = condizione moderata di occhio secco;
- 33 - 100 = condizione severa di occhio secco

Il punteggio soglia per la valutazione clinica di secchezza oculare è  $> 23$

L'OSDI si limita a valutare solo alcuni sintomi dell'occhio secco, ma non prende in considerazione, ad esempio, sintomi come lacrimazione e sensazione di corpo estraneo, cosa che rende il questionario meno accurato nella valutazione dei sintomi specifici che il paziente può descrivere.

#### 1.2.5.3. Schirmer test

Il test lacrimale di Schirmer (STT) viene utilizzato per valutare la produzione lacrimale, specialmente nei pazienti con sospetta cheratocongiuntivite secca, secchezza oculare o sovrapproduzione lacrimale. Il test funziona secondo il principio dell'azione capillare, che consente all'acqua nelle lacrime di viaggiare lungo una striscia reattiva di carta in modo identico a un tubo capillare orizzontale. La velocità di spostamento lungo la striscia reattiva è proporzionale alla velocità di produzione lacrimale (73).

Le strisce reattive di Schirmer sono etichettate come "L" e "R" rispettivamente per l'occhio sinistro e destro. Ogni striscia viene piegata con un angolo di 90 gradi e l'estremità piegata della striscia reattiva viene posizionata nell'occhio in modo tale che poggi tra la congiuntiva palpebrale della palpebra inferiore e la congiuntiva bulbare dell'occhio, dove verrà mantenuta per 5 minuti con gli occhi chiusi.

Il punteggio del test di Schirmer è determinato dalla lunghezza dell'area inumidita delle strisce e dalla durata della misurazione in minuti. Un punteggio superiore a 10 mm in 5 minuti è accettato come normale. Un punteggio inferiore a 5 mm in 5 minuti indica una carenza lacrimale.



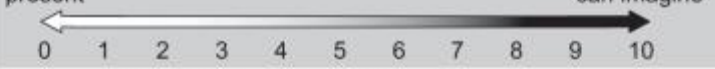
#### 1.2.5.4. NIH eye score

I criteri NIH eye score per la diagnosi di cGVHD oculare richiedono la presenza di sindrome secca oculare di nuova insorgenza documentata da bassi valori allo Schirmer test, con un valore medio di entrambi gli occhi  $\leq 5$  mm a 5 minuti, oppure, se la nuova insorgenza di cheratocongiuntivite secca è definita con esame con lampada a fessura, sono sufficienti valori medi da 6 a 10 mm allo Schirmer test, ma accompagnati da segni/sintomi distintivi di cGVHD in almeno un altro organo (14) (29).

L'NIH eye score definisce un punteggio da 0 a 3:

- 0 - *non dry eye*: nessun sintomo;
- 1- *dry eye lieve*: lieve secchezza oculare o segni di cheratocongiuntivite asintomatica o con sintomi lievi che non compromettono le ADL (richiedenti  $\leq 3$  applicazioni di lacrime artificiali al giorno);
- 2: *dry eye moderato*: moderata secchezza oculare con sintomi che compromettono parzialmente le ADL (richiedenti  $\geq 3$  applicazioni di lacrime artificiali al giorno o punctal plugs), ma senza compromissione della vista dovuta alla cheratocongiuntivite secca;
- 3: *dry eye severo*: severa secchezza oculare con sintomi che compromettono significativamente le ADL o l'attività lavorativa (richiedenti lenti terapeutiche per il dolore) o perdita della vista dovuta alla cheratocongiuntivite secca (74).

**Figura 4. Scale di valutazione oGVHD**

Measurement scale	No. of items	Score
National Institutes of Health (NIH) eye score	1	(0) No symptoms (1) Mild dry eye symptoms not affecting ADL (requiring eye drops $\leq 3 \times$ per day) <b>OR</b> asymptomatic signs of keratoconjunctivitis sicca (2) Moderate dry eye symptoms partially affecting ADL (requiring eye drops $>3 \times$ per day or punctal plugs) <b>WITHOUT</b> vision impairment (3) Severe dry eye symptoms significantly affecting ADL (special eyewear to relieve pain) <b>OR</b> unable to work because of ocular symptoms <b>OR</b> loss of vision caused by keratoconjunctivitis sicca
Patient-reported global rating of eye symptoms	1	Please circle the number that shows how severe your symptoms have been <b>in the last week</b> : Your <b>eye</b> problem at its <b>WORST</b> ? Not present <span style="float: right;">As bad as you can imagine</span>  0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Eye subscale of Lee symptom scale	3	Summary of the following 3 items (0 – 100) -Dry eyes -Need to use eye drops frequently -Difficulty seeing clearly Not at all   Slightly   Moderately   Quite a bit   Extremely 0            1            2            3            4
Ocular surface disease index (OSDI)	12	Summary of 12 items (0 – 100)
Schirmer test	1	mm in 5 minutes
<b>Clinician or patient-reported symptom change ("Anchor")</b>		(1) Completely gone   (2) Very much better   (3) Moderately better   (4) A little better   (5) About the same   (6) A little worse   (7) Moderately worse   (8) Very much worse

[Fonte: Inamoto Y, Chai X, Kurland BF, Cutler C, Flowers ME, Palmer JM, Carpenter PA, Heffernan MJ, Jacobsohn D, Jagasia MH, Pidala J, Khera N, Vogelsang GB, Weisdorf D, Martin PJ, Pavletic SZ, Lee SJ; Chronic GVHD Consortium. *Validation of measurement scales in ocular graft-versus-host disease*. *Ophthalmology*. 2012 Mar;119(3):487-93. doi: 10.1016/j.opthta.2011.08.040. Epub 2011 Dec 6. PMID: 22153706; PMCID: PMC3294118.]

### 1.2.6. Prognosi e terapia

Per una corretta gestione del quadro, la massima attenzione deve essere posta al controllo della lacrimazione e relativa evaporazione e alla minimizzazione dell'infiammazione e mantenimento dell'integrità dell'epitelio corneale, il tutto con l'obiettivo di preservare la visione e migliorare la qualità della vita del paziente. Sono ad oggi disponibili approcci in termini di terapia medica e, qualora questa non fosse sufficiente, procedure chirurgiche.

### 1.2.6.1. Terapia medica

#### - Lubrificanti

Generalmente, il primo presidio che viene consigliato per la gestione del dry eye e per ridurre l'infiammazione della superficie oculare è l'uso di lacrime artificiali senza conservanti e in confezione monodose (75). Le formulazioni più dense possono essere maggiormente utili per i pazienti che hanno bisogno molto frequente di lacrime artificiali; invece, le lacrime artificiali in unguento sono consigliabili per il riposo notturno (76).

I colliri a base di *acido ialuronico* possono aiutare a stabilizzare il film lacrimale, promuovere la guarigione delle lesioni epiteliali e migliorare i sintomi oculari e l'acuità visiva; invece, in caso di cheratite filamentosa, potrebbe essere utile considerare l'uso di colliri mucolitici come l'*N-acetilcisteina* topica al 5%-10% (77).

#### - Antinfiammatori topici

Essendo presente un fenomeno infiammatorio a carico della superficie oculare, un valido aiuto è fornito dai corticosteroidi topici (29). Tuttavia, a causa dei loro probabili effetti avversi e rischi (formazione di cataratta, infezioni, ipertensione oculare/glaucoma, ridotta epitelizzazione e compromissione della guarigione delle ferite corneali (78)), è necessario evitare l'applicazione prolungata nel tempo, dosaggi elevati e/o formulazioni altamente potenti, o istituire controlli oftalmologici regolari. Nonostante questa terapia dimostri un profilo di efficacia e sia comunemente utilizzata (21), i corticosteroidi topici non sono in grado di controllare sufficientemente la cGVHD in circa la metà dei pazienti (74).

Come opzione alternativa di trattamento antinfiammatorio sono utilizzati colliri a base di *ciclosporina (CsA)*, la quale agisce come inibitore della calcineurina e sopprime l'attivazione delle cellule T, riducendo l'infiammazione della superficie oculare, aumentando la densità delle cellule calciformi congiuntivali e la produzione di lacrime e migliorando la sintomatologia (52) (79). Tuttavia, l'utilizzo della *CsA* topica potrebbe essere limitato a causa di una ridotta tolleranza dovuta a una sensazione di bruciore all'applicazione.

Inoltre, anche pomate a base di *tacrolimus* possono essere applicate sulle palpebre come trattamento off-label (80).

Non vi sono, invece, evidenze di efficacia relative all'utilizzo topico di *anti-infiammatori non steroidei (FANS)* nella cGVHD (29).

- Colliri da siero autologo

Sebbene il meccanismo d'azione esatto non sia noto, l'alta concentrazione di diversi fattori di crescita combinata agli effetti antinfiammatori rende ragione dell'utilizzo di colliri a base di siero derivato da sangue autologo per migliorare la guarigione delle lesioni epiteliali (81) (82) (83). Comunque, condizioni fisiche del paziente quali scarsa accessibilità venosa, grave anemia, infezioni attive, basso peso corporeo e comorbidità cardiovascolari possono rappresentare ostacoli all'accesso a questa terapia.

- Controllo della lacrimazione

Nel contesto di una patologia da occhio secco, è utile un approccio in termini di gestione della lacrimazione, sia cercando di aumentarne l'entità sia di limitarne l'evaporazione e il drenaggio.

Il trattamento sistemico con agonisti muscarinici per os come *pilocarpina* o *cevimelina* può aumentare la produzione lacrimale (15) (84).

La riduzione del drenaggio lacrimale è un ulteriore approccio per migliorare il film lacrimale in termini quantitativi. A questo scopo, possono essere inseriti i cosiddetti *punctal plugs*, ovvero tappi di collagene o silicone nei dotti lacrimali (85), oppure può essere effettuata un'occlusione permanente mediante cauterizzazione (86). Tuttavia, è stato ipotizzato il rischio di accumulare citochine pro-infiammatorie a causa della riduzione del drenaggio lacrimale, cosa che potrebbe portare ad aumentare il danneggiamento della superficie oculare e il disagio del paziente (87).

Allo scopo di limitare l'evaporazione del film lacrimale, esistono appositi spray lipidici, il cui utilizzo è combinato al miglioramento dei fattori ambientali, come l'umidità dell'aria. Esiste anche la possibilità di utilizzare protezioni come lenti occlusive (88) (89).

- Lenti sclerali

L'utilizzo di lenti sclerali in pazienti affetti da cGVHD grave ha dimostrato di ridurre i sintomi oculari, in particolare il dolore, e migliorare l'acuità visiva (90). Queste lenti sono permeabili ai gas e ricoprono gran parte della superficie oculare sovrapponendosi alla cornea e

al limbus, creando un serbatoio di liquido interposto tra la lente stessa e la superficie corneale, proteggendo quindi quest'ultima da eventuali danni meccanici dovuti sia al frizionamento della lente sia al battito delle palpebre.

- Terapia sistemica

Il trattamento sistemico è indicato nel momento in cui il coinvolgimento oculare (ed eventualmente anche di altri organi) della cGVHD è grave e non può essere controllato solo con il trattamento topico.

I corticosteroidi ad alte dosi (*metilprednisolone* 1 mg/kg) rappresentano la principale opzione terapeutica proposta per il trattamento sistemico iniziale della cGVHD, sia somministrati singolarmente che in combinazione con inibitori della calcineurina (91).

In caso di cGVHD refrattaria agli steroidi, non unicamente a livello oculare, è indicato un trattamento di seconda linea; ciononostante, ad oggi non esiste ancora uno standard, ma sono proposti vari trattamenti, tra i quali si annoverano, in particolare, *ruxolitinib* (inibitore di JAK2, approvato sia da FDA che da EMA) e *belumosudil* (inibitore del pathway di ROCK2, ad oggi approvato solo da FDA) (29).

- Profilassi antibiotica

Nel contesto di una grave infiammazione della superficie oculare, il rischio che si instaurino processi infettivi è significativo; per questo motivo, è possibile considerare la profilassi antibiotica topica a scopo preventivo (29), soprattutto nei pazienti che indossano regolarmente lenti a contatto, specialmente se morbide, e che sono sottoposti a trattamento con corticosteroidi topici. Nei pazienti in cui si riscontra oggettivamente un processo di sovrainfezione batterica, come una blefarite, si possono prendere in considerazione non solo antibiotici topici, ma anche sistemici, come le tetraciline (ad esempio, *doxiciclina*) (92).

#### 1.2.6.2. Terapia chirurgica

Alle modalità di trattamento medico si addiziona la possibilità di procedure chirurgiche, tra le quali si annoverano:

- Occlusione permanente dei punti lacrimali (blocco meccanico del sistema di drenaggio lacrimale per favorire la conservazione delle lacrime naturali), eseguita

qualora i punctal plugs non fossero tollerati e ripetutamente espulsi, attraverso cauterizzazione, coagulazione laser o sutura puntiforme (86).

- Tarsorrafie temporanee o complete o ptosi protettiva indotta dalla tossina botulinica (29) (93), eseguite al fine di proteggere la cornea e guadagnare tempo quando il trattamento immunomodulatorio sistemico non è ancora completamente efficace.
- Trapianto di membrana amniotica, che favorisce il recupero dell'epitelio corneale ulcerato, riduce l'infiammazione grazie ai suoi fattori di crescita e citochine e agisce inoltre come una barriera protettiva contro le forze di attrito e i danni di natura meccanica (94). In caso di ulcere corneali profonde o di rischio di perforazione imminente, l'utilizzo di particolari colle o di lembi congiuntivali può essere una soluzione temporanea per evitare interventi chirurgici più invasivi (95).
- Cheratoplastica (trapianto di cornea) o cheratoprotesi (impianto di cornee artificiali), utili nei pazienti con perforazioni corneali (29).
- Trapianto epiteliale mucoso orale coltivato (COMET), in caso di danno fibrotico cicatriziale esteso (96).
- Debridement della cheratite filamentosa.

Tutti i trattamenti finora descritti presentano dati di efficacia di qualità moderata, oltre al fatto che le procedure chirurgiche rappresentano un approccio invasivo per i pazienti, quindi si tratta di un quadro patologico che, nonostante le diverse alternative gestionali proposte, non ha ancora trovato un approccio risolutivo in maniera definitiva.

Inoltre, non è ancora chiaro quale sia la modalità di gestione ottimale di questi pazienti, anche per la mancanza di studi in questo ambito (97).

### **1.3. Sindrome di Sjögren**

La sintomatologia oculare intesa come dry eye severo riscontrata nei pazienti con cGVHD è paragonabile a quella tipicamente descritta nei pazienti affetti da Sindrome di Sjögren (SS). Per questo motivo, considerata l'analogia dal punto di vista sintomatologico e la comune assenza, ad oggi, di una valida strategia terapeutica risolutiva, anche i pazienti affetti da Sindrome di Sjögren sono stati inclusi nello studio clinico in oggetto.

#### **1.3.1. Definizione ed epidemiologia**

La malattia di Sjögren è una malattia infiammatoria cronica sistemica con un elemento caratterizzante, cioè l'infiammazione delle ghiandole esocrine. L'incidenza è di 7/100.000 all'anno, la prevalenza è di 40-50/100.000 ma, sebbene il sintomo tipico sia la secchezza oculare (definita, infatti, come sindrome secca), solo il 10-12% delle persone con questa sintomatologia è affetto da sindrome di Sjögren. Infatti, altre cause di xerostomia e xeroftalmia sono la disidratazione, l'età, farmaci antidepressivi, antiaritmici e betabloccanti, ma anche l'HCV (98).

#### **1.3.2. Manifestazioni**

L'infiammazione cronica delle ghiandole esocrine porta ad un danno delle stesse che si traduce in ridotta secrezione. Le prime a risentirne sono le ghiandole lacrimali e le ghiandole salivari, con conseguenti xeroftalmia e xerostomia (99). La secchezza generalmente può essere sierosa-cutanea (cute secca, con conseguente prurito, e secchezza vaginale, associata a dispareunia) e si possono avere anche manifestazioni extra-ghiandolari, talora molto importanti e diffuse, come:

- artralgie e mialgie: è frequente l'overlap con l'artrite reumatoide, ma anche con la sclerosi sistemica.
- manifestazioni polmonari: in un 10-25% dei pazienti il polmone può essere colpito da interstiziopatia polmonare, la quale insorge con tosse stizzosa e progressivamente può svilupparsi una dispnea da sforzo e a riposo con evoluzione verso la fibrosi polmonare ed insufficienza respiratoria cronica.
- manifestazioni renali: nel 20-40% dei casi si può sviluppare un'acidosi tubulare renale.
- manifestazioni neurologiche: neuropatie periferiche, più che coinvolgimento del SNC.

- manifestazioni ematologiche: la leucopenia è presente nel 20% dei pazienti per distruzione autoimmune o anomala maturazione midollare. Il rischio di sviluppare un linfoma aumenta di 40 volte rispetto alla popolazione generale ed emergono soprattutto da cloni linfocitari B nelle ghiandole salivari.
- Manifestazioni endocrinologiche: nel 10-15% dei casi si può avere ipotiroidismo.

L'infiltrazione benigna dei linfociti determina un'inflammatione cronica ghiandolare che evolve verso l'atrofia ghiandolare e duttale.

Nello specifico, i sintomi oculari (xeroftalmia) sono irritazione, bruciore e sensazione di corpo estraneo (sabbia negli occhi) legato alla cheratocongiuntivite secca. In mancanza della lubrificazione lacrimale, anche solo lo scorrimento delle palpebre sull'occhio determina dei microtraumatismi corneali e genera questo problema.

Frequentemente all'esame obiettivo si può osservare una tumefazione delle ghiandole salivari, soprattutto della parotide monolateralmente.

La Sjögren è una malattia solitamente a decorso benigno, tranne in chi manifesta sintomi sistemici simil-lupus e in chi sviluppa un'evoluzione linfomatosa. Infatti, questa patologia è caratterizzata da un aumentato rischio di linfomi, in quanto legata alla presenza di linfociti T aggressivi che infiltrano tessuti in tutto il corpo oltre che le ghiandole salivari e lacrimali.

Generalmente, una biopsia delle ghiandole salivari maggiori non consente di vedere l'infiltrato. Questo è il motivo per cui uno degli esami dell'iter diagnostico della sindrome di Sjögren è la biopsia delle ghiandole salivari minori.

### **1.3.3. Diagnosi**

Sebbene la Sjögren possa colpire strutture extra-ghiandolari, la diagnosi si fonda essenzialmente sul coinvolgimento ghiandolare. Nel sospetto di una Sindrome di Sjögren è fondamentale indagare la presenza di sintomi oculari (sensazione di bruciore o sabbia negli occhi, necessità di utilizzare periodicamente lacrime artificiali) oppure sintomi orali (come bocca secca tale da rendere difficoltosa la deglutizione o necessità di continuare a bere).

La diagnosi prevede:

- Valutazione della presenza di sintomi oculari e/o del cavo orale;
- Test oculari:



- Test di Schirmer: l'umidificazione di < di 5mm in 5 minuti è considerata anormale. Si può usare anestesia locale e lo svuotamento della borsa congiuntivale prima del test per renderlo maggiormente attendibile. Il volume lacrimale è simmetrico.
- Rosa Bengala: si instillano 10 microlitri di una soluzione all'1% di Rosa Bengala (colorante) nel fornice inferiore di un occhio non anestetizzato. Il paziente chiude le palpebre 2 volte. Si osserva il paziente con oftalmoscopio e si valuta la colorazione della congiuntiva e della cornea. Se sono presenti lesioni corneali gravi da cheratocongiuntivite sicca, si ha un accumulo del colorante.
- Prove obiettive di iposalivazione: scintigrafia delle ghiandole salivari (parotidi); sialografia parotidea; sialometria (al paziente viene chiesto di sputare per una volta; quindi, si raccoglie la saliva in un contenitore graduato e dopo 15 minuti si misura il volume della saliva: un valore < 1,5ml è abnormemente basso);
- Valutazione della presenza di autoimmunità specifica con la ricerca di una positività per gli anti-SSA o anti-SSB. Gli anti-SSA sono presenti in oltre il 70-95% dei pazienti con Sjögren, quindi sono molto indicativi di questa malattia, ma possono anche essere presenti nel lupus.
- Biopsia di una ghiandola salivare minore (gold standard): è microinvasiva e viene effettuata a livello delle ghiandole salivari minori delle labbra. La maggior parte dei criteri diagnostici richiede che vi sia più di un focus di infiltrazione di  $4\text{mm}^2$  per una diagnosi definitiva. L'immunoistochimica dimostra che molti dei linfociti sono linfociti T CD4+ Th2.

Di solito per fare diagnosi servono almeno quattro punti: il criterio di ingresso è che il paziente abbia i sintomi oculari e i sintomi orali. Sono particolarmente rilevanti la biopsia, la positività anticorpale (soprattutto per gli anti-SSA) e il test di Schirmer (se positivo, è già diagnostico).

Per la valutazione della severità di malattia è particolarmente importante la presenza di proteinuria, perchè indica un interessamento del rene. Anche la presenza di consumo del complemento ed ipergammaglobulinemia sono indicativi di forme molto infiammatorie e severe con impegno extra-ghiandolare.

I due principali fattori prognostici negativi sono il coinvolgimento extra-ghiandolare e l'eventuale sviluppo di linfomi.

#### **1.3.4. Terapia**

La terapia della sindrome di Sjögren si concentra sulla gestione dei sintomi come la xeroftalmia, la xerostomia e la secchezza vaginale, ma anche sulla prevenzione della carie dentale e la gestione delle infezioni del cavo orale. In caso di manifestazioni sistemiche, come dolore articolare o coinvolgimento degli organi interni, si può trarre beneficio dall'utilizzo di trattamenti immunomodulatori. È inoltre fondamentale instaurare un attento monitoraggio nei pazienti con SS allo scopo di intercettare precocemente lo sviluppo di eventuali complicanze, specialmente linfomi Non Hodgkin (NHL).

Nello specifico, per quanto riguarda la gestione della xeroftalmia sono raccomandate misure di tipo ambientale, come la protezione da vento e fumo tramite occhiali, ma soprattutto è indicato l'utilizzo di lacrime artificiali, oppure gel e unguenti per uso notturno nei casi più gravi. In alcuni casi possono essere prescritti anche steroidi topici, DMARDs (*methotrexate*, *ciclosporina*, *azacitidina*, *acido micofenolico*) o agenti biologici (*rituximab*, *belimumab*, *abatacept*) (100). Inoltre, possono essere applicati punctal plugs, nelle stesse modalità e con gli stessi obiettivi descritti per la oGVHD.

A questo si associano misure di gestione specifiche per la xerostomia, con il mantenimento di una buona idratazione e igiene orale, l'astensione da farmaci che possono avere un ruolo peggiorativo ed eventualmente la somministrazione di agonisti muscarinici allo scopo di aumentare la produzione di saliva.

Per la secchezza vaginale, invece, sono indicati lubrificanti e agenti idratanti, fino ad arrivare a una terapia estrogenica vaginale a basso dosaggio se i sintomi persistono.

## 2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

### 2.1. Premessa scientifica

Data la risposta scarsamente soddisfacente alla terapia sia medica sia chirurgica nei pazienti affetti da cGVHD oculare e la mancanza di un consenso su quale fosse la strategia migliore da attuare in questo contesto, nel 2016 è stato pubblicato uno studio clinico prospettico monocentrico pilota da Zallio F. et al. (*A Single-Center Pilot Prospective Study of Topical Application of Platelet-Derived Eye Drops for Patients with Ocular Chronic Graft-versus-Host Disease*. Biol Blood Marrow transplant. 2016 Sep (83)), relativo all'applicazione topica di un lisato piastrinico autologo (PClys) in forma di collirio in pazienti con patologie della superficie oculare connesse alla cGVHD (101) (102).

L'obiettivo era un controllo dell'autoimmunità, una soppressione della risposta infiammatoria e una promozione della rigenerazione tissutale, proprio grazie all'azione degli emocomponenti (103). In particolare, le piastrine hanno un ruolo molto positivo nella guarigione delle ferite, soprattutto nelle fasi di riepitelizzazione e rimodellamento tissutale, esercitato attraverso vitamine, fattori di crescita, fibronectina e modulatori della risposta infiammatoria, ciascuno di essi utile al fine di mantenere l'integrità di cornea e congiuntiva (104) (105).

Nello studio sono stati arruolati 26 pazienti, 24 dei quali hanno portato a termine il trattamento.

Dopo 30 giorni di terapia, il 91% dei pazienti ha riscontrato un miglioramento della sintomatologia, valutata tramite OSDI score (106), e nel 32% dei casi sono state riscontrate differenze oggettive e misurabili a livello della superficie oculare. Nell'86% dei pazienti arruolati è stata definita una remissione del danno corneale.

Risultati simili sono stati riscontrati nelle fasi successive, raggiungendo una overall survival (OS) a 5 anni pari al 65%, comparabile a quella di pazienti con un coinvolgimento oculare limitato nel contesto di una cGVHD (75%) e superiore a quella di pazienti con cGVHD estesa non oculare o senza cGVHD (rispettivamente 30% e 59%).

I risultati dello studio hanno dimostrato che il collirio biologico derivato da lisato piastrinico rappresenta un'opzione terapeutica sicura, pratica e ben tollerata, la quale garantisce sostanziali benefici alla maggior parte dei pazienti affetti da cGVHD oculare all'esordio,

consentendo inoltre di gestire la condizione attraverso una terapia topica anziché un'immunosoppressione sistemica.

Il beneficio riscontrato, quindi, non si discosta da ciò che era già stato riportato in studi precedenti, confermando l'ipotesi di un ruolo del siero autologo nella ricostituzione funzionale del fluido lacrimale (107). Infatti, era già stato osservato che i colliri a base di siero autologo rappresentano una ricca fonte di fattori di crescita (in particolare epithelial growth factors – EGF (108), che inducono la proliferazione e limitano l'apoptosi), proteine sieriche (fibronectina e vitamina A) e citochine, le quali favoriscono la guarigione dell'epitelio corneale e della congiuntiva (109).

In aggiunta, le gocce oftalmiche da concentrato piastrinico (PClys) utilizzate nel trial clinico descritto hanno dimostrato di offrire vantaggi supplementari rispetto al semplice siero autologo. Infatti, la concentrazione più elevata di fattori di crescita piastrinici (tra cui platelet derived growth factor - PDGF, EGF, fibronectina e transforming growth factor  $\beta$  – TGF  $\beta$ ) può promuovere una più rapida riepitelizzazione oculare (110). Dunque, i colliri PClys potrebbero avere un effetto più ampio: la componente plasmatica contiene proteine essenziali per la lubrificazione della superficie oculare, mentre le piastrine apportano fattori di crescita che favoriscono la rigenerazione tissutale, accelerando così il processo di guarigione.

Studi successivi hanno focalizzato la loro attenzione sul trattamento a base di siero autologo, con lo scopo di dimostrarne l'efficacia.

Ad esempio, lo studio di Tahmaz V et al., *Treatment of severe chronic ocular graft-versus-host disease using 100% autologous serum eye drops from a sealed manufacturing system: a retrospective cohort study*. Br J Ophthalmol. 2017 Mar (111), ha valutato 17 pazienti con cGVHD oculare trattati con collirio da siero 100% autologo con un follow-up di sei mesi, riscontrando un significativo miglioramento dell'acuità visiva, dello staining corneale e della sintomatologia, oltre all'assenza di effetti collaterali riportati e ad una riduzione della necessità di lacrime artificiali.

Un altro studio retrospettivo di Azari AA et al., *Safety and efficacy of autologous serum eye drop for treatment of dry eyes in graft-versus-host disease*. Cutan Ocul Toxicol. 2017 Jun (112), ha preso in considerazione 35 casi di pazienti con una storia di cGVHD oculare, definendo come il trattamento con collirio da siero autologo (autologous serum eye drops –

ASED) fosse contemporaneamente sicuro ed efficace, non essendo stati riscontrati effetti collaterali (fatta eccezione per una cheratite ad eziologia micotica) ed essendo stati descritti dai pazienti miglioramenti (55%) o stabilità (45%) nella sintomatologia oculare con l'utilizzo di ASED.

Nei pazienti per i quali erano disponibili dati precedenti è stata effettuata anche una valutazione dell'evoluzione dello straining corneale e dell'acuità visiva: mentre nel caso dello straining corneale è stato misurato un miglioramento oggettivo di una mediana di 1 ( $p=0,003$ ), l'acuità visiva, valutata secondo logMAR chart (Logarithm of the Minimum Angle of Resolution), non ha subito un miglioramento significativo. In conclusione, data la sicurezza ed efficacia dimostrate, è stata suggerita la possibilità di utilizzare ASED in pazienti con sindrome secca in cGVHD.

Inoltre, sono stati effettuati degli studi più approfonditi sulla composizione del prodotto utilizzato, allo scopo di comprendere il reale responsabile della sua efficacia.

Nello studio di Valentini CG et al., *Cytokine profile of autologous platelet-derived eye drops in patients with ocular chronic graft-versus-host disease*. Vox Sang. 2016 Feb (113), è stato valutato il contenuto citochinico del collirio prodotto utilizzando un lisato non gelificato ottenuto da plasma autologo ricco di piastrine in 6 pazienti.

Sia nei pazienti responder (4) sia nei non responder (2), il collirio risultava particolarmente ricco di vari fattori di crescita, in quantitativo proporzionale con il contenuto piastrinico. I livelli di interleuchine e ligandi delle chemochine erano invece simili a quelli del plasma; tuttavia, nei pazienti non responder sono stati riscontrati livelli più alti di ligandi delle chemochine.

Più di recente, è stato eseguito uno studio da Tahmaz V et al., *Detection of systemic immunosuppressants in autologous serum eye drops (ASED) in patients with severe chronic ocular graft versus host disease*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2021 Jan (114), il quale era finalizzato a valutare un possibile effetto di "ri-somministrazione" topica tramite ASED della terapia immunosoppressiva sistemica svolta da questi pazienti. L'obiettivo dello studio era quindi quello di determinare se e quali immunosoppressori sistemici fossero rilevabili nell'ASED.

Sono quindi stati raccolti e analizzati 34 campioni di ASED da 16 pazienti con patologie emato-oncologiche post allotrapianto di cellule staminali, svolgendo uno screening dei livelli di *ciclosporina*, *micofenolato mofetile*, *everolimus* e *tacrolimus* tramite cromatografia liquida accoppiata con spettrometria di massa in tandem.

Tramite questa analisi è stata dimostrata la presenza di:

- *ciclosporina* in 18 campioni di ASED in una concentrazione di 6,5-105 ng/ml;
- *micofenolato mofetile* in 19 campioni di ASED in una concentrazione di 0,04-25,0 mg/l;
- le concentrazioni di *everolimus* e *tacrolimus* erano entrambe al di sotto dei limiti di quantificazione.

In conclusione, lo studio ha suggerito la probabilità che la terapia per os con *ciclosporina* e *micofenolato mofetile* per il trattamento della GVHD sistemica possa agire secondariamente per via topica tramite ASED. Tuttavia, sarebbe importante approfondire l'entità di questo effetto in ulteriori studi.

## **2.2. Obiettivi**

Sulla base della precedente esperienza con il collirio da lisato piastrinico autologo e delle sue prove di efficacia, è stato quindi progettato un nuovo studio clinico prospettico monocentrico pilota finalizzato a testare l'efficacia dell'utilizzo di un collirio biologico preparato da sangue cordonale (CPCB) nella medesima categoria di pazienti, i quali risultano affetti da cheratopatia moderata-severa correlata a cGVHD o malattie autoimmuni (in particolare, Sindrome di Sjögren), refrattari al trattamento farmacologico convenzionale e non idonei/refrattari al trattamento con lisato piastrinico autologo.

### 2.2.1. Obiettivi primari

Gli obiettivi primari dello studio in oggetto sono:

- la valutazione della variazione del danno corneale in pazienti affetti da cheratocongiuntivite - sindrome sicca moderata/severa post trattamento (tramite *Oxford score*);
- la valutazione del miglioramento della lacrimazione post trattamento (attraverso *Schirmer test* e *BUT test*).

### 2.2.2. Obiettivo secondario

L'obiettivo secondario dello studio è, invece, la valutazione della variazione della sintomatologia, dolore, fotofobia, sintomi da occhio secco condizionanti le normali attività quotidiane (tramite *OSDI score* e *scala VAS*).

## **2.3. Razionale**

### 2.3.1 Razionale scientifico

Il razionale scientifico di utilizzo si basa su due concetti fondamentali:

1. le terapie convenzionali utilizzate fino ad ora non sono in grado di ripristinare la naturale omeostasi e composizione dei fattori di crescita (GF) presenti normalmente nelle lacrime, in quanto generalmente le terapie farmacologiche forniscono uno o due GF e non una miscela biologica, come è invece presente nel sangue (115);
2. il collirio da lisato piastrinico ha caratteristiche simili per composizione alle lacrime, ma è più ricco in GF e molecole proteiche della matrice extracellulare (ECM) che, attraverso fenomeni naturali di stimolazione, inducono la riduzione dell'infiammazione locale, stimolano la rigenerazione e la guarigione dell'epitelio infartuato ed aiutano a ripristinare l'omeostasi dell'occhio (116).

### 2.3.2. Razionale biologico

Il razionale biologico è quello di ottenere un miglioramento a livello della superficie oculare e ripristinare il normale film lacrimale apportando per via esogena biomolecole piastriniche e proteine plasmatiche a concentrazioni elevate (almeno il doppio rispetto a quelle fisiologiche).

1. Per quanto riguarda la componente piastrinica, attraverso studi di proteomica sono state identificate più di 2000 proteine biologicamente attive derivate dalle piastrine stesse e coinvolte nei meccanismi di chemiotassi, proliferazione cellulare, angiogenesi, deposizione di ECM e riparazione tissutale.
2. La componente plasmatica, invece, apporta importanti proteine come fibrinogeno, fibronectina, vitronectina, fattore di Von Willebrand, trombospondina-1 e 2, Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1), Platelet Factor-4 (PF4), ad azione adesivo-chemiotattica per monociti e neutrofili ed immunoregolatoria,  $\beta$ -tromboglobulina, IL-

1 $\beta$ , Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), proteina S, proteine ad azione antimicrobica ed infine il network di GF che diventano strategici per la guarigione e la ricostruzione della ECM.

La biodisponibilità di tutte queste molecole derivate dall'ambiente ematopoietico influenza la proliferazione cellulare e quindi la riparazione e la rigenerazione delle zone danneggiate (117).

Fino ad ora nella preparazione dei colliri da emocomponenti per uso non trasfusionale è stata privilegiata la fonte *autologa*, però esiste la possibilità di produrre anche colliri da fonti *allogeniche*, come il sangue da donatore di sangue o il sangue cordonale non utilizzato per scopi trapiantologici.

L'utilizzo di fonti allogeniche è una possibile soluzione terapeutica per i pazienti non candidabili al prelievo di sangue autologo o che, essendo in trattamento con chemioterapici, hanno probabilmente in circolo una grande quantità di cataboliti e molecole pro-infiammatorie che possono inficiare l'uso di una terapia biologica autologa.

Sulla base delle risposte insoddisfacenti ai trattamenti medici e chirurgici in uso, finora incentrati su terapie a base di lacrime artificiali e steroidi, l'interesse si è spostato sull'utilizzo di trattamenti biologici in grado di controllare l'autoimmunità, sopprimere l'infiammazione e promuovere la rigenerazione dei tessuti, sfruttando proprio la capacità degli emocomponenti di assolvere a questa funzione. In particolare, i concentrati piastrinici hanno dimostrato un impatto positivo sulla guarigione delle ferite modulando le sue diverse fasi: riepitelizzazione e rimodellamento tissutale (118).

Lo studio del sangue cordonale (CB) ha avuto inizio nel 2009; infatti, in considerazione dell'evidenza che solo il 10% delle unità di CB donate a scopo solidaristico contengono il numero di cellule staminali sufficiente per il trapianto emopoietico, si è valutata la possibilità di usare questo sangue, sicuramente ricco di fattori di crescita tissutali, come fonte terapeutica, in particolare per la preparazione di prodotti per la Medicina Rigenerativa.

Questo utilizzo è contemplato nel DM 02 novembre 2015, art 9 e allegato II; al punto 2 (materiale informativo per l'uso delle unità non idonee per il trapianto a scopo di ricerca) e nella parte H (informativa e consenso per il trattamento dei dati personali per la donazione



allogena di sangue cordonale e per l'uso delle unità non idonee per il trapianto a scopo di ricerca) viene indicato come questa opportunità di nuovo utilizzo debba essere comunicata ai genitori e quindi palesata per il consenso (119).

I vantaggi dell'utilizzo di un collirio da CB, seppur allogeno, in pazienti affetti da gravi patologie oculari è sicuramente l'assenza di fattori pro-infiammatori ed un corretto contenuto proteico (GF) in equilibrio naturale.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1. Disegno dello studio

È stato eseguito uno studio clinico prospettico monocentrico pilota con l'obiettivo di valutare l'efficacia dell'utilizzo di un collirio biologico preparato da sangue cordonale (CPCB) in pazienti con cheratopatia moderata-severa nel contesto di cGVHD o malattie autoimmuni.

La valutazione della variazione del danno a carico dell'epitelio corneale è stata eseguita tramite *Oxford score*, mentre il miglioramento della lacrimazione post trattamento è stato valutato attraverso altri test di pertinenza oculistica, quali *Schirmer test* e *BUT test*.

Per quanto riguarda l'obiettivo secondario dello studio, ovvero la valutazione della variazione sintomatologica, in termini di dolore, fotofobia, sintomi da occhio secco condizionanti le normali attività quotidiane, sono stati utilizzati l'*OSDI score* e la scala *VAS*.

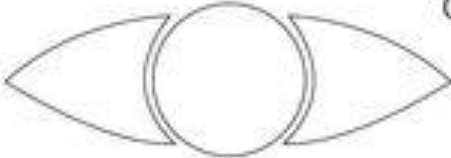
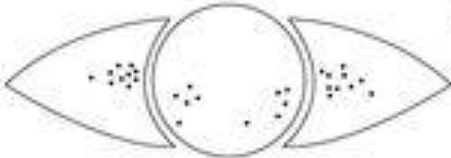



Il funzionamento dello Schirmer test e il questionario OSDI sono già stati descritti nel capitolo introduttivo sulla cGVHD oculare, rispettivamente nelle sezioni 1.2.5.2. e 1.2.5.3..

#### 3.1.1. Oxford score

Per quanto riguarda l'Oxford score, si tratta di una scala utilizzata per attribuire un grading al danno in termini di disepitelizzazione corneale nelle patologie della superficie oculare caratterizzate da occhio secco.

A seguito dell'instillazione a livello corneale di coloranti vitali (in genere fluoresceina, oppure rosa bengala, verde di lissamina o soluzioni a base di riboflavina (120)) e successiva osservazione alla lampada a fessura con il filtro blu cobalto, è possibile effettuare un confronto con pannelli proposti dall'American Academy of Ophthalmology® (da A a >E) e, quindi, attribuire un grading da 0 a 5.

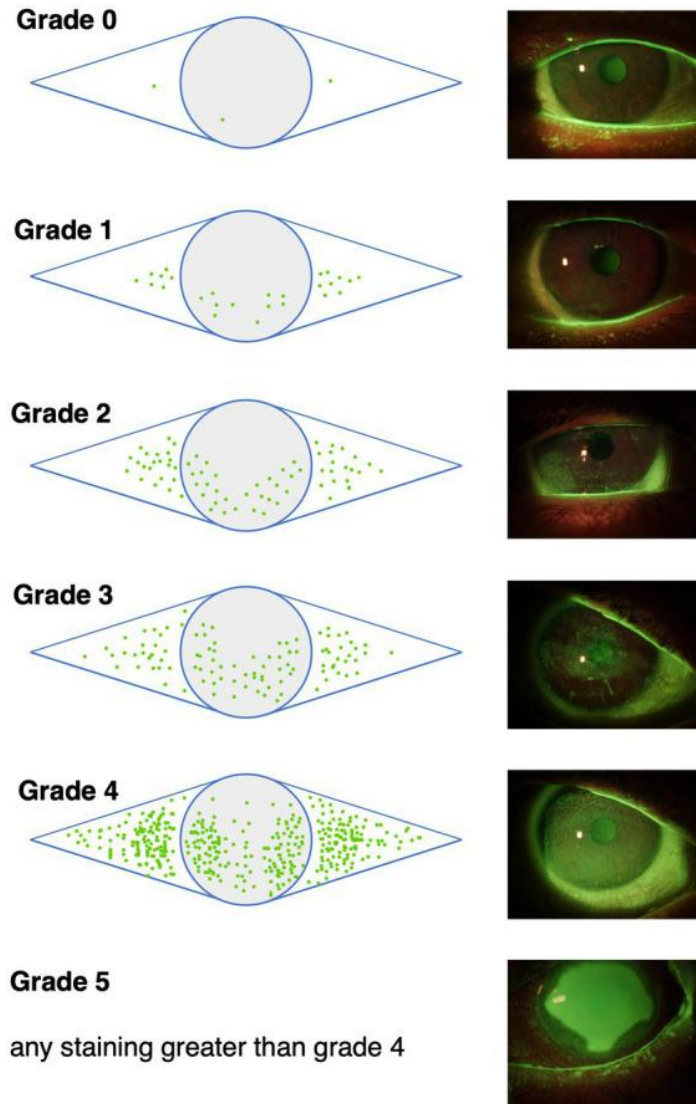
**Figura 5. Oxford Grading System**

Panel	Staining pattern	Grade	Criteria
A		0	Equal to or less than panel A
B		I	Equal to or less than panel B, greater than A
C		II	Equal to or less than panel C, greater than B
D		III	Equal to or less than panel D, greater than C
E		IV	Equal to or less than panel E, greater than D
>E		V	Greater than panel E

[Fonte: American Society of Ophthalmology®. *ONE Network. The Ophthalmic News and Education Network*®.]

Il colore della fluoresceina evidenzia qualsiasi interruzione nelle giunzioni strette delle cellule superficiali o un difetto nel glicocalice delle cellule epiteliali danneggiate (42).

**Figura 6.** Oxford Grading System e riscontro clinico



[Fonte: Tappeiner C, Heiligenhaus A, Halter JP, Miserocchi E, Bandello F, Goldblum D. *Challenges and concepts in the diagnosis and management of ocular graft-versus-host disease*. Front Med (Lausanne). 2023 Feb 16;10:1133381. doi: 10.3389/fmed.2023.1133381. PMID: 36891189; PMCID: PMC9987249.]

### 3.1.2. BUT test

Il break up time test (BUT test) è un semplice test clinico che valuta il tempo di rottura del film lacrimale tramite colorazione della superficie oculare con fluoresceina (esiste anche un metodo non invasivo senza colorazione).

Un breve tempo di rottura del film lacrimale è un valido indicatore di una sindrome da disfunzione lacrimale, tipica della patologia da occhio secco, con un'alterazione qualitativa del film lacrimale principalmente dovuta a disfunzione delle ghiandole di Meibomio (121). Questo viene valutato misurando il tempo che intercorre tra l'ultimo ammiccamento completo e la comparsa della prima area di rottura del film lacrimale a livello della superficie oculare (mantenendo le palpebre aperte), osservata con lampada a fessura. Il cut-off per la condizione patologica è individuato al di sotto dei 10 secondi.

### 3.1.3. Visual Analogue Scale (VAS)

Per VAS si intende una scala visuo-analogica del dolore rapida, semplice e riproducibile utilizzata nelle varie branche della medicina allo scopo di stimare l'intensità del dolore nei pazienti adulti.

È un test diagnostico che non richiede strumentazione e consente di rilevare piccoli cambiamenti dell'intensità del dolore provato dal paziente, chiedendo a quest'ultimo di indicare soggettivamente su una scala continua orizzontale (HVAS) o verticale (VVAS), solitamente lunga 10 cm, con agli estremi i valori 0 ("nessun dolore") e 10 ("massimo dolore"), l'intensità del dolore provato allo stato attuale o nelle ultime 24 ore.

## **3.2. Popolazione**

Sono stati arruolati 34 pazienti affetti da cheratopatia moderata-severa sulla base del soddisfacimento di specifici criteri di inclusione.

- Criteri di inclusione:
  - età  $\geq$  18 anni
  - diagnosi di secchezza oculare moderata - severa
  - presenza di sofferenza epiteliale corneale secondo *Oxford scheme*  $\geq$  2
  - buon *performance status* secondo scala ECOG (0-2)
  - pazienti post trapianto: GVHD oculare  $\geq$  1 secondo NIH

- possibilità di aderire al trattamento ed alle procedure previste dallo studio
  - consenso per la partecipazione allo studio e per il trattamento dei dati personali
- Criteri di esclusione:
- età  $\leq$  a 18 anni
  - aspettativa di vita  $<$  di 6 mesi
  - pazienti in trattamento con colliri ipotonizzanti
  - pazienti che abbiano subito interventi chirurgici oculari nei 12 mesi prima dell'arruolamento
  - patologie infettive sistemiche e locali in atto

### **3.3. Trattamento e procedura**

Il collirio per lo studio è un emocomponente per uso non trasfusionale allogenico, ottenuto da concentrato piastrinico preparato da sangue cordonale, validato secondo i criteri previsti dalla normativa vigente, ma non idoneo per cellularità allo stoccaggio ai fini trapiantologici (leucociti tot.  $\leq 1450 \times 10^6$ ).

Il sangue cordonale donato al momento del parto è sottoposto a valutazione e conta della cellularità. Dopo la valutazione, il sangue non inviato alla Banca Cordonale di Torino, perché non idoneo allo stoccaggio, è avviato alla lavorazione per la preparazione del collirio presso il Laboratorio di Medicina Rigenerativa - SC Medicina Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria.

#### **3.3.1. Preparazione del collirio**

La preparazione del collirio è effettuata secondo la procedura consolidata già utilizzata per la produzione dei colliri biologici da concentrato piastrinico autologo o allogenico (122).

Il sangue cordonale è centrifugato a bassa velocità per separare la componente piastrinica e, una volta ottenuta la separazione, questa verrà trasferita sterilmente in un nuovo contenitore (sacca transfer) e congelata a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Il concentrato piastrinico di almeno 5 sacche omogruppo sarà quindi scongelato a  $37^{\circ}\text{C}$  e assemblato a creare un pool di circa 30/40 mL (omogruppo). Lo shock termico  $-80^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$  permette di ottenere la lisi delle piastrine ed il prodotto ottenuto sarà diluito 1:3 con Soluzione Salina Bilanciata (BSS) e aliquotato in apposito

device (mini-sacche da circa 0.6 mL per collirio per uso giornaliero). Verranno quindi preparate le confezioni di collirio (30 dosi per confezione) e su ogni confezione verrà riportato:

- codice univoco del paziente,
- codice dell'emocomponente
- collirio da sangue cordonale allogeneico
- temperatura di conservazione
- numero di dosi (30)
- data di produzione e data di scadenza

### **3.3.2. Assegnazione del trattamento**

Il collirio da concentrato piastrinico derivato da sangue cordonale validato per uso non trapiantologico è stato assegnato al paziente (omogruppo o gruppo compatibile) in confezioni da 30 dosi giornaliere per 30 giorni da utilizzare presso il proprio domicilio secondo indicazioni dettagliate e specifiche.

La via di somministrazione è topica: 1 goccia per occhio 3 – 6 volte/die per occhio nel periodo di veglia.

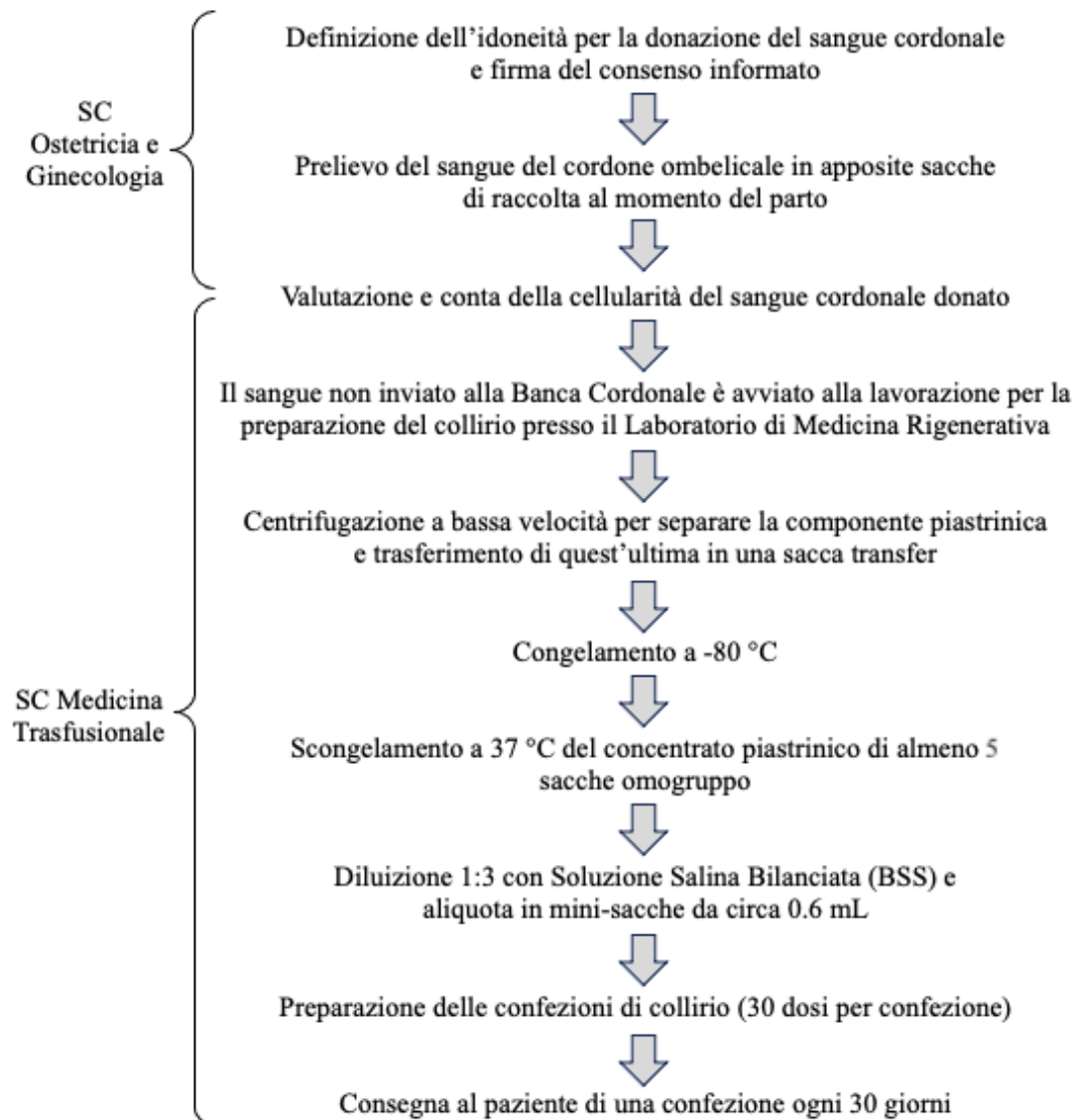
Il trattamento ha una durata di 4 mesi; tuttavia, in caso di recidiva o ulteriore peggioramento della zona danneggiata rispetto al basale entro 1 - 2 mesi successivi alla fine del trattamento, è stata prevista la possibilità di assegnare un ulteriore mese di trattamento.

Ciascun paziente arruolato ha ricevuto ogni 30 giorni, secondo lo schema del protocollo, la confezione contenente 30 dosi giornaliere per il primo trattamento ed il diario paziente e la prima volta che ha ritirato il collirio è stato istruito all'utilizzo del device e gli sono state consegnate le istruzioni per l'uso cartacee. Al termine di ogni step, il paziente ha ritirato la confezione successiva per il mantenimento del trattamento, salvo interruzioni/incidenti non previsti che hanno portato alla sospensione dello stesso.

### **3.3.3. Schema di consegna prodotto**

- T0 – consegna confezione n°1 (N1) con 30 monodosi giornaliere (1g - 30g);
- T1 – consegna confezione n°2 (N2) con 30 monodosi giornaliere (31g -60g);
- T2 – consegna confezione n°3 (N3) con 30 monodosi giornaliere (61g - 90g);
- T3 – consegna confezione n°4 (N4) con 30 monodosi giornaliere (91g - 120g).

**Figura 7.** Procedura di preparazione del collirio



### 3.4. Criteri e schema di valutazione

All'arruolamento e a 1 - 2 - 4 mesi di trattamento sono state valutate la variazione di parametri della superficie oculare (tramite Oxford scheme, BUT test, Schirmer test) e la variazione dei sintomi di discomfort oculare (con OSDI e VAS).

All'arruolamento a tutti i pazienti è stato sottoposto un questionario per la raccolta dei dati demografici e dell'anamnesi. Inoltre, è stata eseguita una valutazione dell'estensione del danno corneale e del discomfort.



Allegata alla scheda di ogni paziente vi è la determinazione del gruppo sanguigno e a ciascuno di essi è stato assegnato un codice univoco per consentirne la tracciabilità in anonimato definito con:

- codice centro: AL
- numero progressivo (da 01 a 34 secondo la data di arruolamento).

Il programma di valutazione è stato così suddiviso:

*Visita 1 – T0:* il paziente è stato valutato con uno screening presso l'ambulatorio di ematologia trapianti e gli è stato sottoposto il questionario (OSDI), per poi essere inviato all'ambulatorio di oculistica per la prima visita (V1) per la valutazione dell'estensione del danno corneale e dei sintomi. Ai pazienti ritenuti idonei, quindi, è stato sottoposto il consenso allo studio. Successivamente alla firma del consenso, i pazienti sono stati inviati al laboratorio di Medicina Rigenerativa della SC Medicina Trasfusionale per il ritiro della prima dose di trattamento (N1) di collirio (30 monodosi giornaliere x 30g).

*Visita 2 – T1:* a 30 g dalla prima somministrazione, presso l'ambulatorio di ematologia trapianti è nuovamente stato sottoposto al paziente il questionario (OSDI) per la valutazione dopo il primo ciclo di trattamento. Il paziente è stato poi inviato all'ambulatorio di oculistica per la visita (V2), sono state annotate le eventuali variazioni di terapia ed è stata effettuata una rivalutazione del danno oculare e del BUT e dello *Schirmer test*. Successivamente, è avvenuto il ritiro della seconda dose di trattamento (N2) di collirio (30 monodosi giornaliere x 30g).

*Visita 3 - T4 - endpoint:* dopo quattro cicli di trattamento (120 giorni), presso l'ambulatorio di ematologia trapianti è stato proposto ancora una volta al paziente il questionario (OSDI) per la valutazione di fine trattamento ed è successivamente stato inviato all'ambulatorio di oculistica per la visita finale (V3), nella quale sono state annotate le eventuali variazioni di terapia (o interruzioni del trattamento) ed è stata effettuata una rivalutazione del danno oculare e del BUT e dello *Schirmer test*.

*Visita 4:* se non si sono manifestati sintomi di recidive, al massimo a 180 g (range  $\pm 10$  g) dalla fine del trattamento, i pazienti sono stati sottoposti ad una visita di controllo e compilazione del questionario OSDI.

**Tabella 4.** Programma di valutazione

	T0 – visita 1	T1 – visita 2	T2	T3	T4 -Visita 3	Visita 4
Timing	Selezione / visita / reclutamento Consegna prima dose trattamento (N1 – 30g)	Visita 2 e seconda consegna trattamento (N2 – 30g)	Consegna terza dose trattamento (N3 – 30g)	Consegna quarta dose trattamento (N4 – 30 g)	Visita 3 – fine trattamento (120g) Valutazione finale (endpoint)	Controllo (180g max)
Criteria inclusione / esclusione	X					
Consenso informato	X					
Dati demografici Assegnazione di codice unico	X					
Questionario OSDI	X	X			X	X
Storia clinica / anamnesi generale – anamnesi oculare	X					
Sintomatologia oculare (VAS score)	X	X			X	X

Gruppo sanguigno (presso SIMT)	X					
Consegna collirio	X	X	X	X	X	
BUT	X	X			X	
Test di Schirmer	X	X			X	
Valutazione di tollerabilità		X				
Incidenti		X	X	X		
Motivi di sospensione / interruzione		X	X	X		

### 3.5. Tempi dello studio

Inizio arruolamento: 01 giugno 2019

Fine arruolamento: 15 giugno 2023

Fine studio: 15 dicembre 2023

### 3.6. Raccolta dati

I dati derivati dai questionari ed i risultati derivati dalle visite previste sono stati raccolti in schede raccolta dati (CRF) appositamente predisposte per lo studio.

Elenco delle variabili raccolte:

- data di nascita
- patologia di base
- trapianto allogenico sì/no
- secchezza oculare moderata/severa
- GVHD oculare sì/no
- grado GVHD oculare
- performance status
- data insorgenza sintomi

- terapie precedenti per patologia oculare, quale da/a
- questionario OSDI
- VAS
- BUT
- test di Schirmer
- eventi avversi
- data consegna collirio
- quantità consegnata
- reso
- sospensione sì/no e motivo della sospensione
- giorni di sospensione
- continua trattamento sì/no
- perché in caso di risposta negativa
- recidiva

Tutte le valutazioni sono state raccolte ed analizzate in relazione all'andamento del singolo paziente e dell'intera casistica.

I risultati raccolti sono stati valutati attraverso statistiche descrittive e su base non parametrica adeguate alla numerosità del campione valutato.

Per la dimensione del campione non sono state eseguite analisi statistiche, ma, sulla base della casistica dell'AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria, è stato arbitrariamente stabilito un arruolamento di un numero di pazienti non inferiore a 30.

### **3.7. Analisi statistica**

Le variabili sono riportate come mediane e intervalli interquartili (IQR) per le variabili continue e come numeri e proporzioni per quelle categoriche, rispettivamente.

La sopravvivenza complessiva (OS) è stata stimata utilizzando il metodo di Kaplan-Meier e confrontata utilizzando il test del log-rank.

I criteri di risposta per la cGVHD oculare sono stati misurati in base al miglioramento, alla stabilità o al peggioramento del punteggio NIH.

I test soggettivi e oggettivi sono stati analizzati utilizzando il test U di Mann-Whitney.

Tutti i valori p riportati sono a due code al livello di significatività convenzionale dello 0,05. Gli intervalli di confidenza sono stati riportati al livello del 95%.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software statistico NCSS 11 (NCSS, LCC. Kaysville, UT, USA).

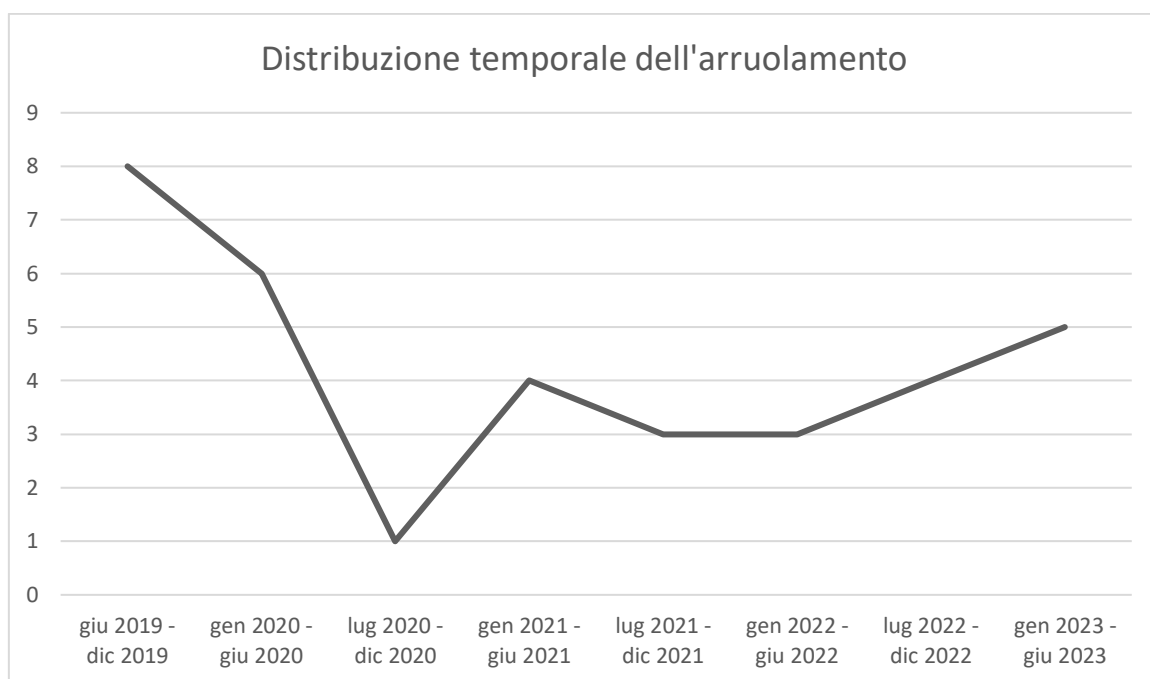
## 4. RISULTATI

### 4.1. Arruolamento

Sulla base dei criteri di inclusione stabiliti nel protocollo dello studio, sono stati arruolati 34 pazienti con un quadro di cheratopatia moderata-severa, 25 dei quali affetti da cGVHD con coinvolgimento oculare, e quindi inviati a valutazione oculistica per il riscontro di un peggioramento durante il follow-up ematologico post-HSCT; i 9 restanti sono stati inclusi con diagnosi di Sindrome di Sjögren, di pertinenza immuno-reumatologica.

L'arruolamento si è distribuito lungo un periodo di quattro anni, dal giugno 2019 al giugno 2023, con un parziale ritardo rispetto alle aspettative dovuto alla pandemia da COVID-19 e alla conseguente riduzione degli accessi ospedalieri per le visite ambulatoriali.

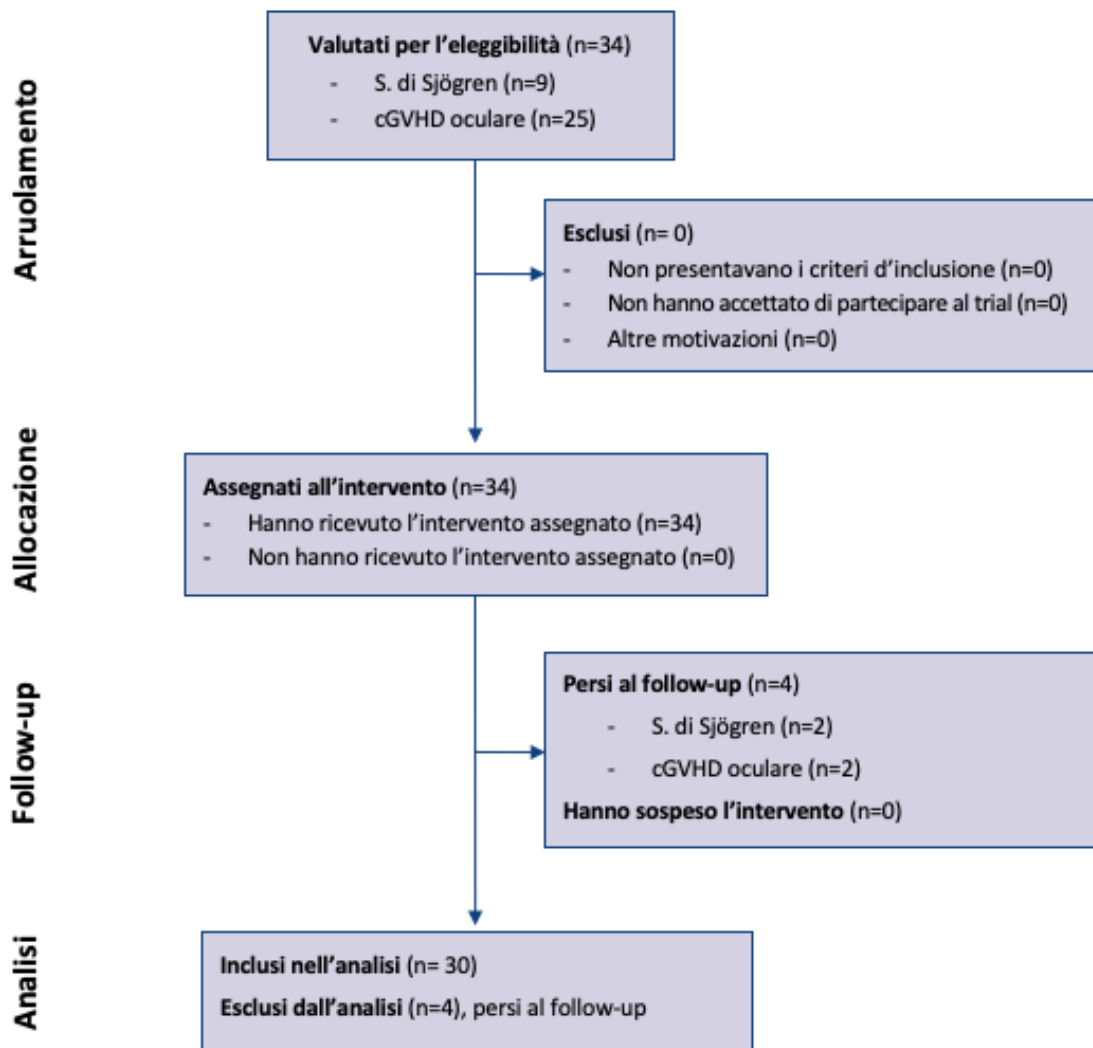
**Figura 8.** Distribuzione temporale dell'arruolamento allo studio CPCB19



Dei 34 pazienti arruolati, 30 hanno completato lo studio; infatti, sono stati persi al follow-up 2 pazienti affetti da Sindrome di Sjögren e 2 pazienti con cGVHD oculare, i quali sono quindi stati esclusi dall'analisi statistica per mancanza dei dati al T4.

Figura 9. Diagramma di flusso

CONSORT (CONSolidated Standards of Reporting Trials).



## **4.2. Caratteristiche cliniche dei pazienti**

Tutti i 34 pazienti inclusi nello studio presentavano caratteristiche comuni dal punto di vista oculistico, in quanto risultavano affetti da cheratopatia moderata-severa correlata a cGVHD o a malattie autoimmuni (Sindrome di Sjögren) e si sono dimostrati refrattari al trattamento farmacologico convenzionale o non idonei/refrattari al trattamento con lisato piastrinico autologo (83).

L'età media all'arruolamento dei pazienti inclusi nello studio era di 52 anni (range 21 – 78), con una sostanziale differenza a seconda della diagnosi di base:

- 49 anni nei venticinque pazienti con cGVHD oculare (range 21 – 76);
- 62 anni nei nove pazienti affetti da Sindrome di Sjögren (range 32 – 78).

Dei 34 pazienti arruolati, 18 (53%) erano di sesso maschile e 16 (47%) erano di sesso femminile; in particolare:

- 18 pazienti (72%) di sesso maschile e 7 pazienti (28%) di sesso femminile nel caso della cGVHD oculare;
- 9 pazienti (100%) di sesso femminile tra quelli con diagnosi di Sindrome di Sjögren, a testimonianza della maggior incidenza di malattie autoimmuni nel sesso femminile rispetto a quello maschile.

### **4.2.1. Pazienti con cGVHD oculare**

Come indicato in Tabella 5, le patologie ematologiche da cui erano affetti i 25 pazienti con cGVHD oculare inclusi nello studio erano le seguenti:

- Leucemia Mieloide Acuta (LAM) in 11 pazienti (44%);
- Leucemia Linfoblastica Acuta (ALL) in 3 pazienti (12%);
- Linfoma Non Hodgkin in 3 pazienti (12%), di cui 2 (8%) con Linfoma Mantellare (MCL) e 1 (4%) con Linfoma a Grandi Cellule B (DLBCL);
- Mieloma Multiplo (MM) in 3 pazienti (12%);
- Neoplasia a Cellule Dendritiche Plasmocitoidi Blastiche (BPDCN) in 2 pazienti (8%);
- Mielofibrosi (MF), Leucemia Mielomonocitica Cronica (LMMC) e Morbo di Cooley in 1 paziente (4%), rispettivamente.



Il regime di condizionamento pre-trapianto è stato eseguito con intento mieloablativo (MAC) in 13 pazienti (52%), mentre nei restanti 12 (48%) è stato preferito un regime a ridotta intensità (RIC), il quale generalmente viene attuato in pazienti anziani, debilitati, con comorbidità importanti o con malattie non troppo aggressive, in modo da ridurre al minimo la tossicità del trattamento pre-trapianto. Questo risultato è reso possibile da una riduzione pari ad almeno il 30% della dose di agenti alchilanti o della total body irradiation (TBI) utilizzata nei regimi MAC convenzionali (123) (124). La scelta è stata effettuata caso per caso da un team multidisciplinare di specialisti, in considerazione della età e delle comorbidità di ogni specifico paziente.

Le cellule staminali da trapiantare sono state ricavate dal sangue periferico a seguito di mobilitazione dal midollo osseo del donatore in 23 casi (92%); nei 2 casi restanti (8%), è stato eseguito un prelievo del sangue midollare direttamente dalla cresta iliaca del donatore con un intervento in anestesia generale (sedazione profonda) o epidurale.

Il 36% dei pazienti in oggetto ha ricevuto cellule staminali provenienti da un fratello/sorella compatibile, il 16% da un familiare aploidentico, il 44% da un cosiddetto Matched Unrelated Donor (MUD), ovvero un donatore dalla banca internazionale, mentre il donatore non è noto nel caso di un paziente che è stato trapiantato presso altro centro ed è poi afferrito all'AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria per il peggioramento della sintomatologia da cGVHD oculare e successiva inclusione nello studio.

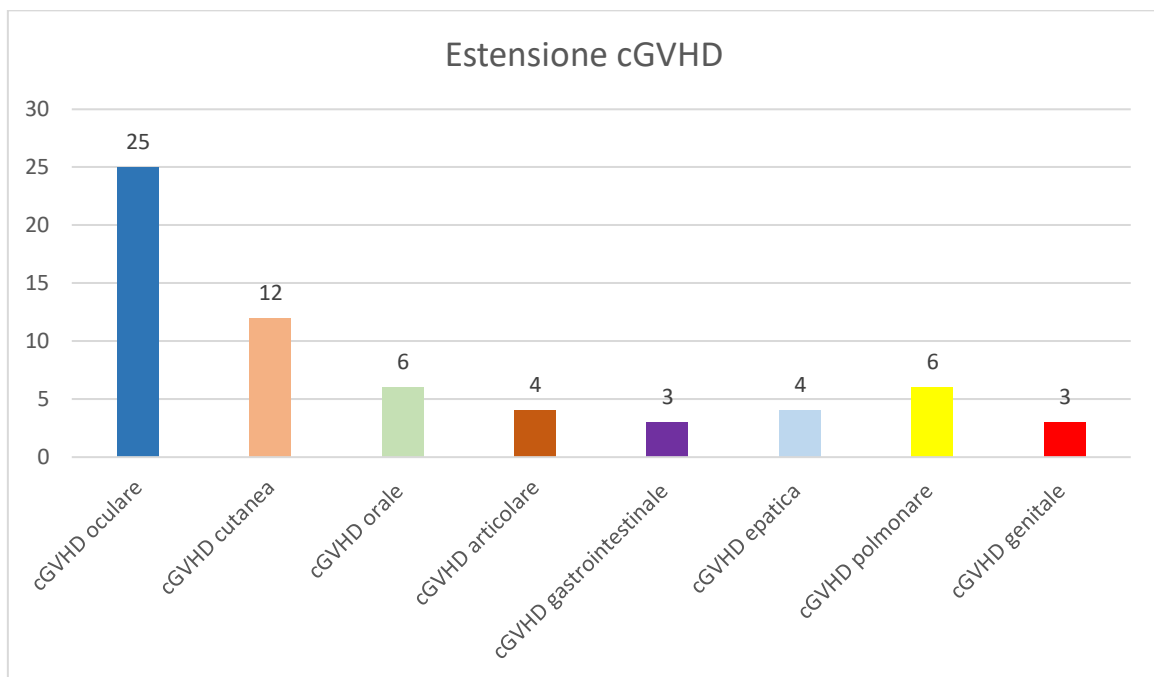
La cGVHD di 12 di questi pazienti (48%) è stata preceduta da una aGVHD nei primi 100 giorni dal trapianto, mentre in 11 di essi (44%) è comparsa de novo. In due casi (8%) non è noto se vi sia stata o meno una forma acuta di GVHD (sempre a causa di trapianto avvenuto presso altro centro).

Per quanto riguarda la cGVHD, invece, solo 9 (36%) dei pazienti in oggetto hanno avuto una localizzazione oculare isolata, mentre i restanti 16 (64%) hanno manifestato un'estensione della cGVHD anche ad altre sedi, con un'associazione fino a sei distretti contemporaneamente (incluso il comparto oculare).

In particolare:

- cGVHD cutanea (12 pazienti)
- cGVHD cavo orale (6 pazienti)
- cGVHD articolare (4 pazienti)
- cGVHD gastrointestinale (3 pazienti)
- cGVHD epatica (4 pazienti)
- cGVHD polmonare (6 pazienti)
- cGVHD genitale (3 pazienti)

**Figura 10.** Altre sedi di cGVHD nei 25 pazienti con cGVHD oculare



A livello oculare è stato attribuito al T0 uno score NIH della cGVHD pari a 1 in 4 pazienti (16%), 2 in 20 pazienti (80%), 3 in 1 paziente (4%).

Lo score globale della cGVHD al T0, invece, è stato definito come *severo* in 9 pazienti (36%), *moderato* in 15 pazienti (60%) e *lieve* solamente in 1 caso (4%).

Di tutti i pazienti sottoposti a HSCT, solo 1 di essi (4%) ha avuto una recidiva di malattia, la quale ha portato al decesso a distanza di pochi mesi.

**Tabella 5.** Caratteristiche dei pazienti con diagnosi di cGVHD oculare

<b>Gender</b>	Male	18 (72%)
	Female	7 (28%)
<b>Diagnosis</b>	LAM	11 (44%)
	ALL	3 (12%)
	NHL	3 (12%)
	- MCL	- 2 (8%)
	- DLBCL	- 1 (4%)
	MM	3 (12%)
	BPDCN	2 (8%)
	MF	1 (4%)
	LMMC	1 (4%)
	Cooley's anemia	1 (4%)
<b>Conditioning regimen</b>	Myeloablative	13 (52%)
	Reduced intensity (RIC)	12 (48%)
<b>Source of stem cells</b>	PB	23 (92%)
	BM	2 (8%)
<b>Type of donor</b>	Sibling donors	9 (36%)
	MUD	11 (44%)
	Haploidentical	4 (16%)
	Unknown	1 (4%)
<b>aGVHD</b>	Yes	12 (48%)
	No	11 (44%)
	Unknown	2 (8%)
<b>cGVHD other than eyes</b>	Yes	16 (64%)
	No	9 (36%)
<b>Relapse after HSCT</b>	Yes	1 (4%)
	No	24 (96%)
<b>Death</b>	Yes	2 (8%)
	No	23 (92%)
		- 1 TRM
		- 1 other

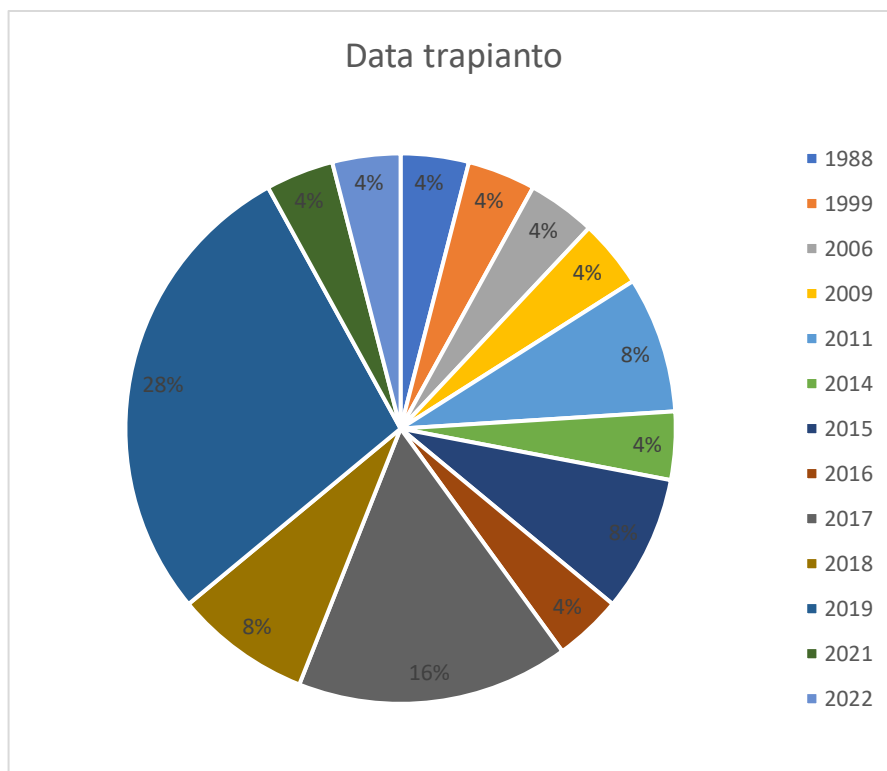
**Tabella 6.** Caratteristiche cliniche all'arruolamento dei pazienti con cGVHD oculare

<b>Patient</b>	<b>Disease</b>	<b>Gender</b>	<b>Age at enrollment</b>	<b>Source of stem cells</b>	<b>Type of donor</b>	<b>cGVHD other than eyes</b>	<b>Ocular NIH score</b>	<b>Global scoring of GVHD</b>
3	LAM	M	73	PB	Sibling	Skin	2	Moderate
5	LAM	F	64	PB	Haploidentical	NO	2	Moderate
7	LAM	F	26	PB	Haploidentical	Mouth	2	Moderate
8	Cooley's anemia	M	41	PB	Unknown	NO	2	Moderate
10	ALL	M	27	PB	MUD	Skin, joints, GI	2	Moderate
11	NHL	M	52	PB	Sibling	NO	2	Moderate
12	MM	M	49	PB	Sibling	Skin, mouth, liver	2	Severe
13	NHL	M	22	PB	MUD	Skin, lungs	2	Severe
14	LAM	F	54	PB	MUD	Skin	2	Moderate
15	LAM	M	22	PB	MUD	NO	2	Moderate
16	LAM	M	34	PB	Haploidentical	Skin, joints	1	Severe
17	LAM	M	73	BM	MUD	NO	2	Moderate
19	LAM	M	40	PB	MUD	Skin	2	Moderate
20	LAM	M	23	PB	MUD	NO	2	Moderate
21	ALL	F	22	PB	MUD	Skin	2	Moderate
22	ALL	F	53	PB	Sibling	Skin, mouth, joints, lungs	2	Severe
23	NHL	M	41	PB	Sibling	Skin, joints, lungs	2	Severe
24	BPDCN	M	69	PB	Sibling	NO	2	Moderate
25	MM	M	66	PB	MUD	Liver, genitalia	2	Severe
26	LAM	M	21	PB	Haploidentical	Skin, mouth, liver, lungs	1	Severe
27	MF	M	74	BM	Sibling	Mouth, lungs	1	Moderate
28	BPDCN	M	69	PB	Sibling	NO	2	Moderate
29	MM	M	76	PB	MUD	NO	1	Mild
32	LMMC	F	70	PB	MUD	Skin, mouth, GI, genitalia	3	Severe
33	LAM	F	62	PB	Sibling	Mouth, GI, liver, lungs, genitalia	2	Severe

A dimostrazione della possibilità di protrarsi a lungo nel tempo delle manifestazioni croniche della GVHD, è stato osservato come in alcuni dei pazienti arruolati nello studio fossero ancora presenti sintomi da cGVHD oculare anche a distanza di anni dal trapianto allogenico, con un range che varia dal 1988 (HSCT in età pediatrica) al 2022.

In particolare, il tempo intercorso tra il trapianto di cellule staminali e l'arruolamento nello studio clinico è stato in media di 73 mesi (6 anni), con un range che spazia tra i 7 mesi e i 31 anni e 6 mesi. La mediana è stata calcolata a 45 mesi (3 anni e 9 mesi).

**Figura 11.** Distribuzione temporale del trapianto allogenico dei pazienti arruolati



#### 4.2.2. Pazienti con Sindrome di Sjögren

Nove pazienti sono stati arruolati nello studio clinico con una diagnosi di Sindrome di Sjögren, 5 dei quali (56%) in forma primitiva, 3 (33%) in forma secondaria (di cui un caso secondario ad Artrite Reumatoide (AR), uno a Lupus Eritematoso Sistemico (LES) e uno a Sclerosi Sistemica (SS)); l'ultimo paziente (11%) risulta, invece, essere affetto da una sindrome secca da concomitante tiroidite e terapia antidepressiva con *sertralina*, appartenente alla categoria degli Inibitori Selettivi della Ricaptazione della Serotonina (SSRI), fra i cui effetti collaterali di frequente riscontro vi è proprio la xeroftalmia: si tratta quindi di un caso con autoimmunità negativa.

Di questi 9 pazienti, 7 hanno completato il trial clinico, in quanto 2 di essi sono stati persi al follow-up e, di conseguenza, non sono stati inclusi nell'analisi statistica per la valutazione dell'efficacia del collirio a base di sangue cordonale a causa della mancanza di dati al T4.

Oltre al riscontro di positività a SSA e SSB, anticorpi patognomonicamente della Sindrome di Sjögren, sono state rilevate altre positività anticorpali, in particolare:

- ANA (Anticorpi Anti-Nucleo con pattern centromerico o granulare), i quali risultano spesso essere presenti nelle patologie autoimmuni, con una particolare frequenza riscontrata nel Lupus Eritematoso Sistemico;
- ENA (Antigeni Nucleari Estraiibili, tra i quali i più utilizzati nello screening sono Ro, La, Sm, RNP, Scl-70 e Jo1), spesso coinvolti nella patogenesi di malattie autoimmuni, tra le quali il Lupus Eritematoso Sistemico, l'Artrite Reumatoide e la Sclerodermia;
- Fattore Reumatoide, correlato ad una positività al Reuma Test (o RA test), il quale può dare risultato positivo non solo in caso di Artrite Reumatoide, ma spesso anche nella Sindrome di Sjögren e, con minor frequenza, Lupus Eritematoso Sistemico e Sclerodermia;
- Anti-CENP-B (Anticorpi anti-Proteina B Centromerica), associati alla presenza di Sclerodermia;
- Anti-MPO (Anticorpi anti-Mieloperossidasi, appartenenti al gruppo degli Anticorpi Citoplasmatici Anti-Neutrofili (ANCA)), spesso correlati a patologie di natura

vasculitica, come la granulomatosi con poliangioite (ex granulomatosi di Wegener), poliangioite microscopica e granulomatosi eosinofila con poliangioite (Sindrome di Churg-Strauss).

La positività ad anticorpi ulteriori rispetto a SSA e SSB può essere tipica delle forme secondarie (come anticipato, nello studio in oggetto sono stati inclusi 1 caso secondario ad Artrite Reumatoide, 1 caso secondario a Lupus Eritematoso Sistemico e 1 caso secondario a Sclerosi Sistemica), ma riscontrabile anche in caso di forme primitive, come sottolineato per la positività al Reuma Test anche in pazienti affetti da Sindrome di Sjögren.

Tutti i pazienti valutati sono stati candidati al trattamento con sangue cordonale in quanto non sufficientemente responsivi alle terapie convenzionali, con la persistenza di sintomatologia invalidante e fortemente impattante sulla qualità di vita. Oltre all'utilizzo di presidi oclusivi oculari notturni, i precedenti tentativi terapeutici farmacologici di questi pazienti includono:

- *Hyló Dual*: collirio lubrificante a base di ialuronato di sodio, ectoina, acido borico, borace e acqua;
- *Hyló Night*: pomata oftalmica a base di retinolo palmitato (vitamina A), paraffina, paraffina liquida leggera, lanolina e vaselina bianca;
- *Siccafluid*: gel oftalmico che agisce come sostituto lacrimale contenente un lubrificante chiamato Carbomer 974P;
- *Ketofit*: gel oftalmico a base di ketotifene fumarato;
- *Lacricomplex*: soluzione oftalmica lubrificante, protettiva, idratante, lenitiva e antiossidante, contenente GlicoPro, un complesso multimolecolare a base di proteine, glicosaminoglicani solforati e non solforati veicolati da una base mucinica costituita da idrossipopolimetilcellulosa (HPMC);
- *Vitan*: unguento oftalmico lubrificante a base di retinolo (vitamina A);
- *Artelac*: collirio lubrificante a base di ialuronato di sodio;
- *Adalimumab*: anti TNF- $\alpha$  (somministrato a una paziente con Sindrome di Sjögren secondaria ad Artrite Reumatoide).

### **4.3. Risposta al trattamento**

Considerando sia i pazienti con diagnosi di cGVHD oculare sia di Sindrome di Sjögren, 30 dei 34 pazienti inclusi hanno portato a termine il trial clinico (23 con cGVHD e 7 con Sindrome di Sjögren).

Al T0 sono stati valutati diversi parametri, sia relativi alla sintomatologia percepita soggettivamente (tramite scala VAS e OSDI score), sia misurazioni oggettive a livello di entrambi gli occhi, non necessariamente coinvolti in egual misura, attuate attraverso Schirmer test e BUT test per quanto riguarda la componente lacrimale e tramite Oxford score per la valutazione del danno corneale.

Dopo 120 giorni di trattamento (T4) sono state ripetute le stesse valutazioni allo scopo di definire se l'applicazione del collirio a base di sangue cordonale con adeguata compliance abbia determinato o meno un miglioramento oggettivabile e della sintomatologia percepita dai pazienti.

#### **4.3.1. Sintomatologia oculare**

##### 4.3.1.1. Scala VAS

Dopo 120 giorni di trattamento, rivalutando la sintomatologia soggettiva confrontando il punteggio VAS con quello che era stato segnalato al T0, sono stati registrati miglioramenti sostanziali, specialmente nella qualità di vita dei pazienti:

- al T0 il valore medio dei 34 pazienti arruolati era di 6,53 (intervallo 2 - 10), con una mediana di 6 (IQR 5 - 8);
- al T4 è il valore medio registrato sui 30 pazienti che hanno completato lo studio è stato 2,4 (intervallo 0 - 8), con una mediana di 2 (IQR 0 - 4,25).

Quindi, dal confronto T0 – T4 è emerso che la differenza media rispetto al basale è stata 4,13 (CI 95% 2,95 - 5,30; p value <0,001).

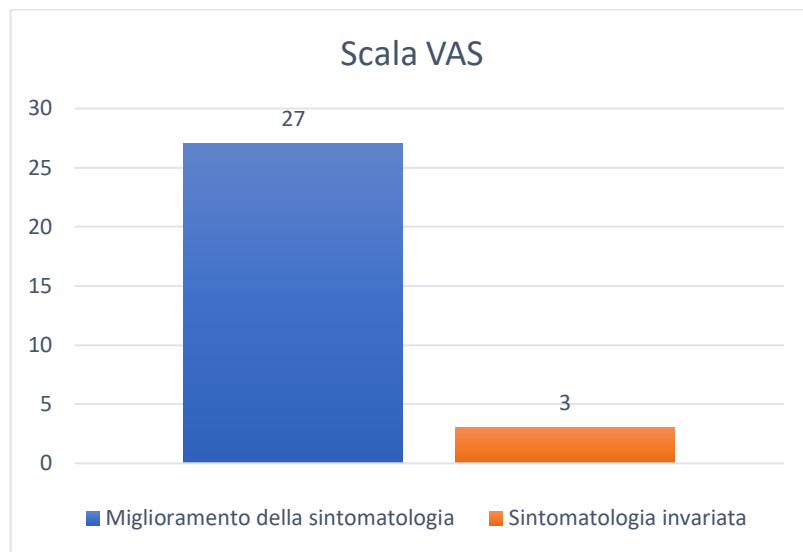


**Tabella 7.** Confronto scala VAS T0 vs T4

	<b>VAS T0</b>	<b>VAS T4</b>
AL01	6	1
AL02	8	/
AL03	10	8
AL04	5	5
AL05	8	0
AL06	7	1
AL07	7	6
AL08	10	/
AL09	10	1
AL10	9	2
AL11	6	3
AL12	6	2
AL13	2	0
AL14	3	/
AL15	6	5
AL16	6	3
AL17	7	4
AL18	9	0
AL19	10	0
AL20	3	0
AL21	8	4
AL22	9	8
AL23	8	3
AL24	5	2
AL25	6	2
AL26	4	0
AL27	5	0
AL28	2	2
AL29	6	0
AL30	5	0
AL31	5	0
AL32	8	5
AL33	5	5
AL34	8	/
	<i>Media 6,53</i>	<i>Media 2,4</i>
	<i>Mediana 6</i>	<i>Mediana 2</i>

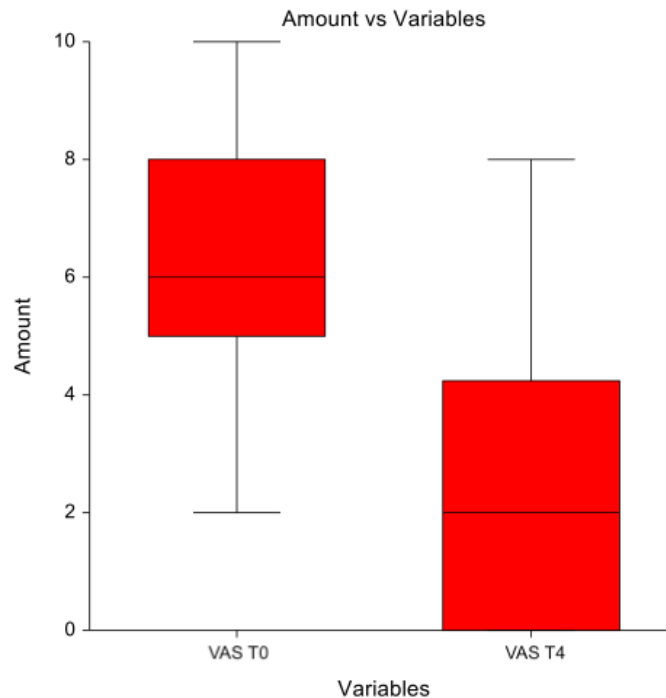
I valori registrati sottoponendo ai pazienti la scala VAS, come è possibile osservare nella tabella sopraripotata, dimostrano come in 27 pazienti sui 30 arrivati al T4 (90%) vi sia stato un miglioramento della sintomatologia e in nessuno di essi sia stato riscontrato un peggioramento; infatti, nei restanti 3 pazienti (10%) il valore registrato al T0 e al T4 è stato sovrapponibile.

**Figura 12.** Miglioramento della sintomatologia oculare registrato con scala VAS



La scala VAS, insieme all'OSDI score, è stata uno dei parametri che ha registrato le variazioni statisticamente più significative tra T0 e T4. Nella figura seguente sono illustrati i plot relativi alla scala VAS.

**Figura 13.** Variazioni dei punteggi VAS pre e post-trattamento (Plot)



#### 4.3.1.2. OSDI score

Il punteggio OSDI, anch'esso finalizzato ad una valutazione della sintomatologia soggettiva e del suo impatto sulla qualità di vita, è coerente con i risultati osservati con il confronto della scala VAS T0-T4, passando da un valore medio di 68,9 e una mediana di 68,46 (IQR 60,13 – 81,25) al T0, ad una media di 24,2 e una mediana di 16,70 (IQR 8,33 - 36,46) al T4.

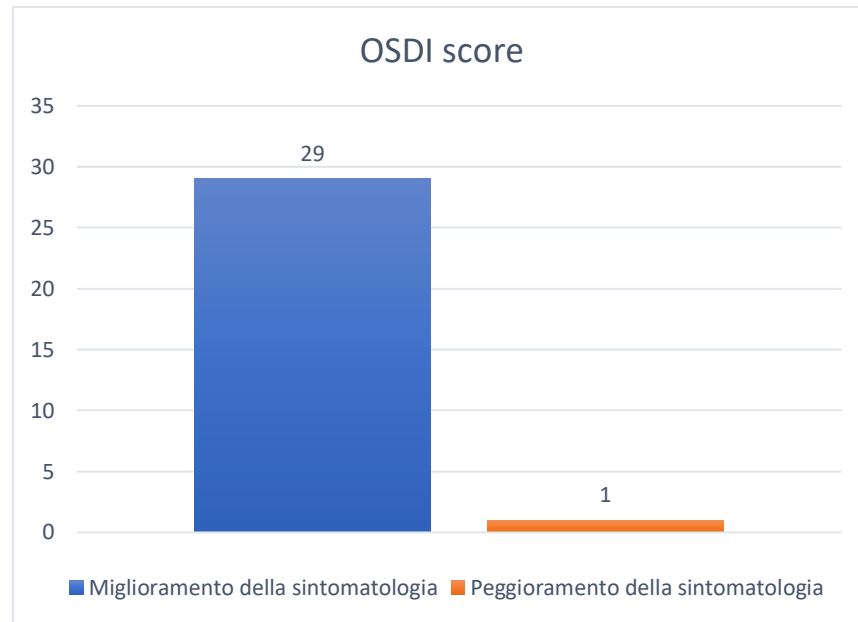
Dal confronto T0 – T4 è emerso che la differenza media rispetto al basale è stata 44,65 (CI 95% 34,14 - 55,17; p value <0,001).

**Tabella 8.** Confronto OSDI score T0 vs T4

	<b>OSDI T0</b>	<b>OSDI T4</b>
AL01	62,5	58,33
AL02	52,08	/
AL03	89,58	40
AL04	80,55	77,08
AL05	38,64	8,33
AL06	68,18	8,33
AL07	80	15,91
AL08	97,73	/
AL09	87,5	22,92
AL10	79,17	8,33
AL11	65,91	4,17
AL12	60	34,09
AL13	62,5	35,42
AL14	79,17	/
AL15	87,5	85,42
AL16	60,42	18,75
AL17	77,08	8,33
AL18	92,5	10,42
AL19	77,27	10,42
AL20	25	39,58
AL21	55	45,83
AL22	92,5	61,36
AL23	83,33	5
AL24	68,75	2,08
AL25	64,58	22,92
AL26	64,58	12,5
AL27	80	10
AL28	18,18	8,33
AL29	68,18	0
AL30	55	20
AL31	77,5	31,82
AL32	60,42	17,5
AL33	33,33	4,17
AL34	97,92	/
	<i>Media 68,9</i>	<i>Media 24,2</i>
	<i>Mediana 68,46</i>	<i>Mediana 16,70</i>

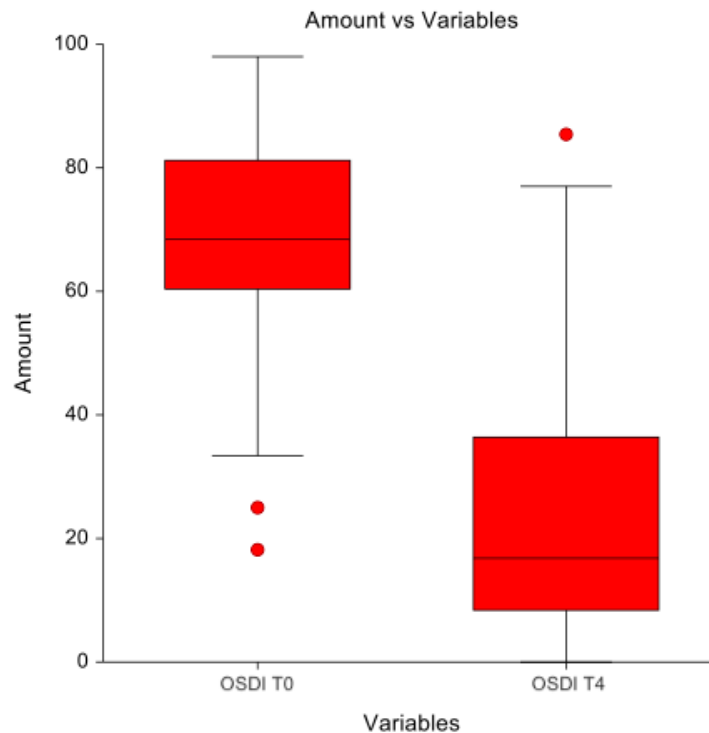
Dai dati soprariportati è possibile osservare come 29 dei 30 pazienti rivalutati al T4 (96,7%) abbiano registrato un miglioramento dello score, mentre solo 1 di essi (3,3%) abbia descritto un peggioramento della sintomatologia dopo 120 giorni.

**Figura 14.** Miglioramento della sintomatologia oculare registrato con OSDI score



Come anticipato per la scala VAS, i dati relativi alla sintomatologia soggettiva, e quindi anche l'OSDI score, sono stati i due parametri che hanno registrato le variazioni statisticamente più significative tra T0 e T4. Nella figura seguente sono illustrati i plot relativi all'OSDI score.

**Figura 15.** Variazioni OSDI score pre e post-trattamento (Plot)



Inoltre, l'OSDI score è stato riproposto anche in un'ulteriore visita a 180 giorni, allo scopo di valutare se dopo il termine del trattamento con il collirio a base di sangue cordonale vi fosse un mantenimento dei risultati ottenuti dal punto di vista sintomatologico oppure un ritorno alle condizioni di partenza. L'analisi ha dimostrato che il netto miglioramento rilevato al T4 (120 giorni) non ha subito variazioni, con un valore medio di 23,2 a 180 giorni (contro il 24,2 calcolato al T4).

**Tabella 9.** Follow-up OSDI score a 180gg

	<b>OSDI a 120 gg (T4)</b>	<b>OSDI a 180 gg</b>
AL01	58,33	39,58
AL02	/	/
AL03	40	36,36
AL04	77,08	79,16
AL05	8,33	5
AL06	8,33	8,33
AL07	15,91	36,36
AL08	/	/
AL09	22,92	22,92
AL10	8,33	10,42
AL11	4,17	4,17
AL12	34,09	12,5
AL13	35,42	56,25
AL14	/	/
AL15	85,42	70,83
AL16	18,75	8,33
AL17	8,33	12,5
AL18	10,42	16,67
AL19	10,42	18,75
AL20	39,58	45,83
AL21	45,83	45,83
AL22	61,36	86,11
AL23	5	0
AL24	2,08	4,17
AL25	22,92	12,5
AL26	12,5	10,42
AL27	10	0
AL28	8,33	9,09
AL29	0	6,82
AL30	20	4,55
AL31	31,82	6,82
AL32	17,5	10,42
AL33	4,17	14,58
AL34	/	/
	<i>Media 24,2</i>	<i>Media 23,2</i>

### **4.3.2. Misurazioni oggettive**

Relativamente alla componente lacrimale, le misurazioni oggettive eseguite tramite Schirmer test e BUT test hanno dimostrato differenze più lievi rispetto alla sintomatologia percepita soggettivamente dai pazienti (come descritto per la scala VAS e per l'OSDI score) e al miglioramento del danno corneale (si rimanda alla sezione successiva dedicata all'Oxford score).

#### 4.3.2.1. Schirmer test

Il test di Schirmer eseguito al T0 ha registrato un valore medio di 3,9 mm (nello specifico, 3,6 mm per l'occhio sinistro e 4,3 mm per l'occhio destro) al termine dei 5 minuti dal posizionamento della striscia reattiva tra la congiuntiva palpebrale inferiore e la congiuntiva bulbare, coerente con uno stato di carenza lacrimale da ambo i lati.

La mediana al T0 è stata di 2,25 mm (IQR 0 – 5,25) per l'occhio sinistro e di 3 mm (IQR 1 - 5) per l'occhio destro.

Al T4 è stata ripetuta la misurazione sui 30 pazienti che hanno portato a termine lo studio clinico e il risultato ottenuto è compatibile con un lieve miglioramento, con un valore medio registrato pari a 4,6 mm (4 mm per l'occhio sinistro e 5,2 mm per l'occhio destro, quest'ultimo con un valore borderline, appena al di sopra del cut-off di 5 mm definito per un quadro francamente patologico, ma non ancora incluso nel range di normalità, con cut-off stabilito a 10 mm).

La mediana al T4 è stata di 2,75 mm (IQR 0,5 – 5,25) per l'occhio sinistro e di 3 mm (IQR 1 – 7,6) per l'occhio destro.

Dal confronto T0 – T4 è emerso che la differenza media rispetto al basale è stata 0,30 mm (CI 95% -2,7 - 2,09; p value 0,28) per l'occhio sinistro e 0,88 mm (CI 95% -3,71 – 1,94; p value 0,46) per l'occhio destro, a dimostrazione di una differenza non statisticamente significativa tra i due gruppi di confronto.



**Tabella 10. Confronto Schirmer test T0 vs T4**

	Schirmer test T0		Schirmer test T4	
	os	od	os	od
AL01	5 mm	11 mm	4 mm	8 mm
AL02	11 mm	18 mm	/	/
AL03	7 mm	10 mm	10 mm	10 mm
AL04	25 mm	25 mm	21 mm	22 mm
AL05	3 mm	2 mm	5 mm	8 mm
AL06	4 mm	1 mm	6 mm	7,5 mm
AL07	0 mm	0,5 mm	1 mm	0 mm
AL08	0 mm	1 mm	/	/
AL09	0 mm	0 mm	2 mm	3 mm
AL10	0 mm	5 mm	13 mm	22 mm
AL11	0 mm	0 mm	3 mm	2 mm
AL12	5 mm	5 mm	0 mm	0 mm
AL13	1 mm	1 mm	0 mm	0 mm
AL14	1 mm	2 mm	/	/
AL15	3,5 mm	4,5 mm	5 mm	12 mm
AL16	0 mm	6 mm	5 mm	15 mm
AL17	4 mm	3 mm	7 mm	7,5 mm
AL18	3 mm	5 mm	3 mm	1 mm
AL19	6 mm	3 mm	2,5 mm	1,5 mm
AL20	2,5 mm	5 mm	0 mm	1 mm
AL21	0 mm	0 mm	0 mm	3 mm
AL22	10,3 mm	10,6 mm	5 mm	6 mm
AL23	0 mm	2 mm	0,5 mm	3 mm
AL24	6 mm	4 mm	1 mm	0 mm
AL25	0 mm	3 mm	0,5 mm	0 mm
AL26	10 mm	3 mm	0 mm	1 mm
AL27	6 mm	3,5 mm	3 mm	3 mm
AL28	1 mm	1 mm	7 mm	6 mm
AL29	4 mm	1,5 mm	8 mm	5 mm
AL30	1 mm	1 mm	1,5 mm	1,5 mm
AL31	0 mm	0 mm	1 mm	1 mm
AL32	1 mm	2 mm	0 mm	5 mm
AL33	2 mm	5 mm	2 mm	0 mm
AL34	0 mm	1 mm	/	/
	<i>Media 3,6 mm</i>	<i>Media 4,3 mm</i>	<i>Media 4 mm</i>	<i>Media 5,2 mm</i>
	<i>Mediana 2,25 mm</i>	<i>Mediana 3 mm</i>	<i>Mediana 2,75 mm</i>	<i>Mediana 3 mm</i>

#### 4.3.2.2. BUT test

Un'altra delle misurazioni oggettive effettuata al T0 e riproposta al T4 è rappresentata dal Break Up Time (BUT), il quale è stato misurato sui 34 pazienti arruolati al T0 ottenendo un valore medio prima di iniziare il trattamento pari a 5,1 secondi intercorsi tra l'ultimo ammiccamento completo e la comparsa della prima area di rottura del film lacrimale a livello della superficie oculare (in media 5,5 s per l'occhio sinistro e 4,7 s per l'occhio destro).

La mediana del BUT test al T0 è stata di 5,35 s (IQR 2,9 – 7,37) per l'occhio sinistro e di 4,25 s (IQR 2,95 - 6,85) per l'occhio destro.

Rivalutato al T4, il BUT ha fornito un risultato compatibile con un lieve miglioramento, seppur non ancora all'interno di un range di normalità, con un valore medio misurato pari a 8,4 secondi (più precisamente 8,7 s per l'occhio sinistro e 8,1 s per l'occhio destro).

La mediana del BUT test al T4 è stata di 7,9 s (IQR 5,7 - 10) per l'occhio sinistro e di 6,95 s (IQR 5 - 10) per l'occhio destro.

Dal confronto T0 – T4 è emerso che la differenza media rispetto al basale è stata 3,25 s (CI 95% 1,24 – 4,99; p value 0,98) per l'occhio sinistro e 3,37 s (CI 95% 1,45 – 5,31; p value 0,99) per l'occhio destro, a dimostrazione di una differenza non statisticamente significativa tra i due gruppi di confronto.

**Tabella 11. Confronto BUT T0 vs T4**

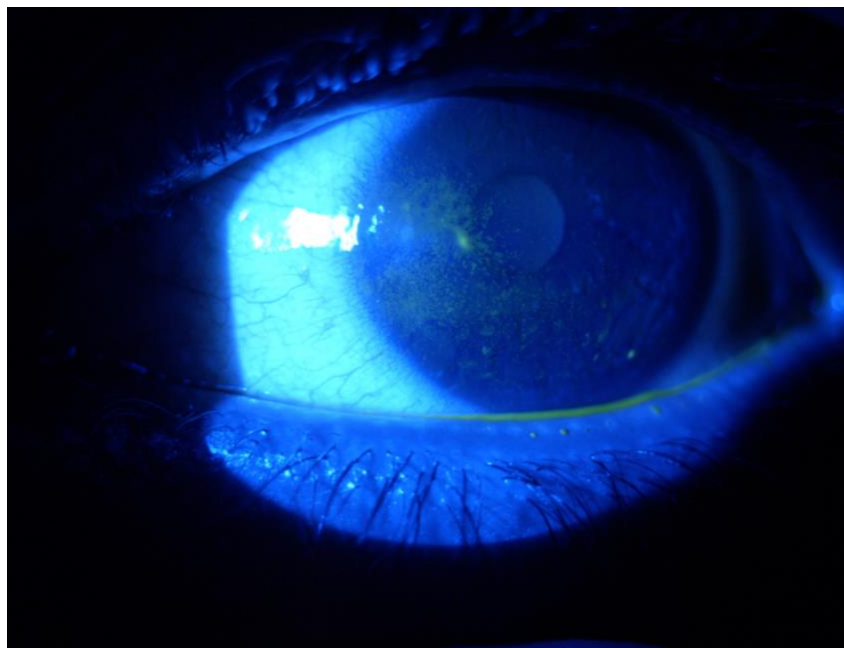
	BUT T0		BUT T4	
	os	od	os	od
AL01	6 s	2 s	5 s	5 s
AL02	5 s	8 s	/	/
AL03	8 s	7 s	10 s	10 s
AL04	5,7 s	3 s	11,8 s	5 s
AL05	5,7 s	5,6 s	7 s	8 s
AL06	1 s	0 s	8,7 s	8,1 s
AL07	1 s	1 s	10 s	10 s
AL08	2 s	2 s	/	/
AL09	6,3 s	6,8 s	10,6 s	14,5 s
AL10	1 s	1 s	12 s	8,6 s
AL11	3 s	3 s	5 s	9 s
AL12	3,6 s	3 s	5,7 s	6,8 s
AL13	1 s	1 s	10 s	10 s
AL14	3 s	4 s	/	/
AL15	2,6 s	5,3 s	7,4 s	3,3 s
AL16	1 s	3 s	9,5 s	5,3 s
AL17	4 s	4 s	6,8 s	5,7 s
AL18	4 s	5 s	10,8 s	20 s
AL19	6 s	2,8 s	8,6 s	5,7 s
AL20	10 s	5 s	17 s	17 s
AL21	3,6 s	4,5 s	20 s	20 s
AL22	0 s	0 s	4,3 s	7,1 s
AL23	9,3 s	10,1 s	5,7 s	2,9 s
AL24	6 s	4,8 s	8,8 s	9,5 s
AL25	3,2 s	3,7 s	7,4 s	10,3 s
AL26	8,5 s	3,4 s	8,4 s	6,3 s
AL27	10,8 s	14,2 s	6,6 s	3,6 s
AL28	7,3 s	5,7 s	5,9 s	6,7 s
AL29	10,8 s	3,8 s	4 s	4,7 s
AL30	6,9 s	7 s	4,5 s	6 s
AL31	6,9 s	7 s	4,5 s	4,6 s
AL32	20 s	7,9 s	20 s	7,2 s
AL33	5 s	4,8 s	5,7 s	2,8 s
AL34	7,6 s	12 s	/	/
	<i>Media 5,5 s</i>	<i>Media 4,7 s</i>	<i>Media 8,7 s</i>	<i>Media 8,1 s</i>
	<i>Mediana 5,35 s</i>	<i>Mediana 4,25 s</i>	<i>Mediana 7,9 s</i>	<i>Mediana 6,95 s</i>

#### 4.3.2.3. Oxford score

Infine, la valutazione con lampada a fessura gradata attraverso l'Oxford score ha consentito di effettuare un confronto tra il danno corneale in termini di disepitelizzazione presente al T0 e al T4, rilevando un miglioramento oggettivo. Infatti, al T0 tutti i 34 pazienti arruolati avevano almeno una classificazione di grado 2 (in un solo caso è stato raggiunto un grado 3), mentre, al T4, fra i 30 pazienti che hanno portato a termine lo studio clinico, 25 (83,3%) hanno raggiunto un grado 0 bilateralmente e solo in 5 casi è stato registrato un grado 1 (4 dei quali a livello di un solo occhio).

La mediana dei valori registrati al T0 è stata 2, mentre al T4 è stata 0, con una differenza media rispetto al baseline di 2 (p value < 0,001).

**Figura 16.** Disepitelizzazione corneale

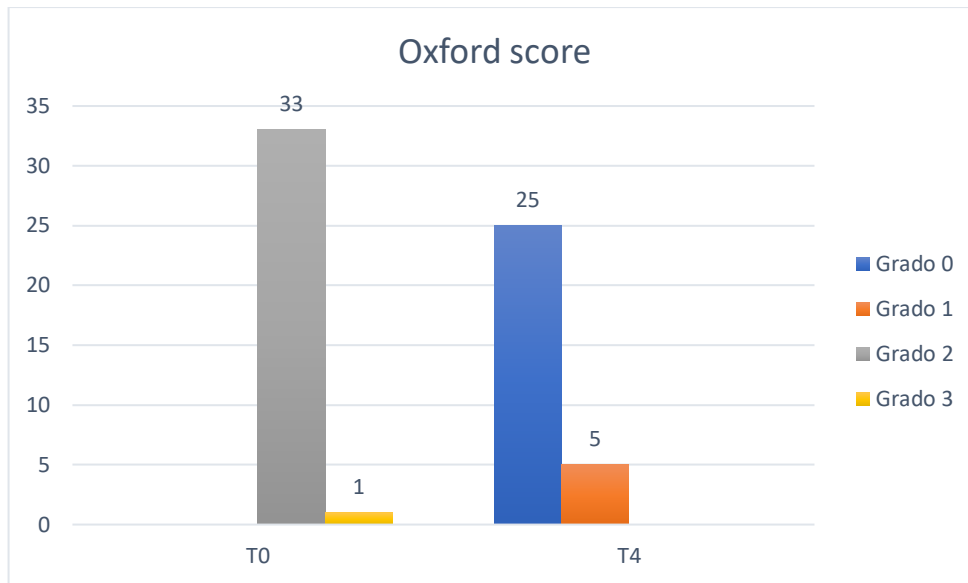


[Azienda Ospedaliero-Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria – SC Oculistica. Paziente AL21: disepitelizzazione corneale dell'occhio sinistro di grado 2 secondo Oxford score in paziente con oGVHD osservata al T0]

**Tabella 12.** Confronto Oxford score T0 vs T4

	Oxford score T0		Oxford score T4	
	os	od	os	od
AL01	2	2	0	1
AL02	2	2	/	/
AL03	2	2	0	0
AL04	2	2	0	0
AL05	2	2	0	0
AL06	2	2	0	0
AL07	2	2	0	1
AL08	2	2	/	/
AL09	2	2	0	0
AL10	2	2	0	0
AL11	2	2	0	0
AL12	2	2	1	0
AL13	2	2	0	0
AL14	2	2	/	/
AL15	2	2	0	0
AL16	2	2	0	0
AL17	2	2	0	0
AL18	2	2	0	0
AL19	2	2	0	0
AL20	2	2	0	0
AL21	2	2	0	0
AL22	2	2	1	1
AL23	2	2	0	0
AL24	2	2	0	0
AL25	2	2	0	0
AL26	2	2	0	1
AL27	2	2	0	0
AL28	2	2	0	0
AL29	2	2	0	0
AL30	2	2	0	0
AL31	2	2	0	0
AL32	2	2	0	0
AL33	2	2	0	0
AL34	3	2	/	/
	<i>Mediana 2</i>		<i>Mediana 0</i>	

**Figura 17.** Miglioramento del danno corneale secondo Oxford score



**Tabella 13.** Risultati soggettivi e oggettivi dei pazienti trattati

	Score T0	Score T4	Mean difference with baseline	P value
VAS	6 (IQR 5-8)	2 (IQR 0-4.25)	4.13 (CI 95% 2.95-5.30)	<0.001
OSDI score	68.46 (IQR 60.13-81.25)	16,70 (IQR 8,33-36,46)	44.65 (CI 95% 34,14-55,17)	<0.001
Schirmer test OS	2,25 (IQR 0-5.25)	2,75 (IQR 0.5-5.25)	0,30 (CI 95% -2,7-2,09)	0.28
Schirmer test OD	3 (IQR 1-5)	3 (IQR 1-7.6)	0,88 (CI 95% -3,71-1.94)	0.46
SBUT test OS	5,35 (IQR 2.9-7.37)	7.9 (IQR 5.7-10)	3.25 (CI 95% 1.24-4.99)	0.98
SBUT test OD	4,25 (IQR 2,95-6,85)	6.95 (IQR 5-10)	3.37 (CI 95% 1.45-5.31)	0.99
<b>OXFORD score (both eyes)</b>	2	0	2	<0.001

#### **4.4. Focus sulla cGVHD**

Per quanto riguarda l'efficacia del collirio in termini di miglioramento della sintomatologia clinica e misurazioni oggettive del danno corneale e del film lacrimale, i risultati ottenuti nei 25 pazienti con diagnosi di cGVHD sono coerenti con quelli misurati nella restante popolazione in studio, come descritto nella precedente sezione dedicata.

Tuttavia, in questa specifica categoria di pazienti è possibile approfondire l'analisi relativa al grado della cGVHD e al cambiamento della terapia immunosoppressiva successivamente al trattamento con collirio da sangue cordonale.

##### **4.4.1. Grado della cGVHD oculare**

Focalizzandosi sui 25 pazienti con cGVHD, è stato possibile effettuare un confronto tra lo score NIH attribuito alla cGVHD oculare al T0 e al T4.

Al momento dell'arruolamento nello studio (T0):

- 4 pazienti avevano ottenuto un punteggio NIH pari a 1
- 20 avevano un punteggio NIH di 2
- 1 aveva un punteggio NIH uguale a 3.

Al termine dei 120 giorni di trattamento, la rivalutazione al T4 ha consentito di attribuire un punteggio migliore nella maggior parte dei casi:

- 2 pazienti hanno raggiunto un punteggio NIH pari a 0
- 19 hanno ottenuto un punteggio NIH uguale a 1
- 2 avevano un punteggio NIH di 2.

Inoltre, tra i 23 pazienti con cGVHD che hanno effettuato il trattamento con adeguata compliance (2 pazienti con diagnosi di cGVHD non hanno completato lo studio) solamente 6 (26,1%) non hanno riscontrato un miglioramento dello score.

Pertanto, sulla base di questi dati, si può definire che il 73,9% dei pazienti che hanno completato lo studio ha registrato un miglioramento dello score NIH della cGVHD oculare e, in particolare, un punteggio pari a 0 è stato raggiunto dall'8,7% di essi.

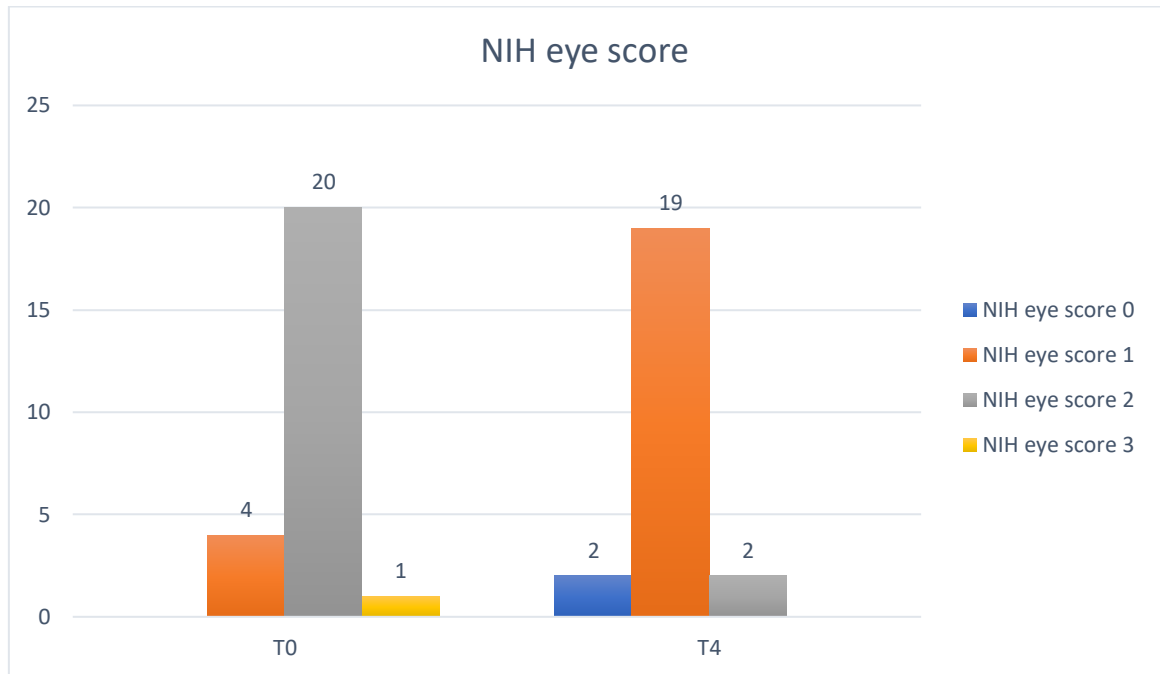
La mediana del punteggio NIH della cGVHD oculare al basale è stata 2, mentre si è ottenuto un valore di 1 al T4 (p value <0,001), con un risultato statisticamente significativo.

**Tabella 14.** Confronto NIH eye score T0 vs T4

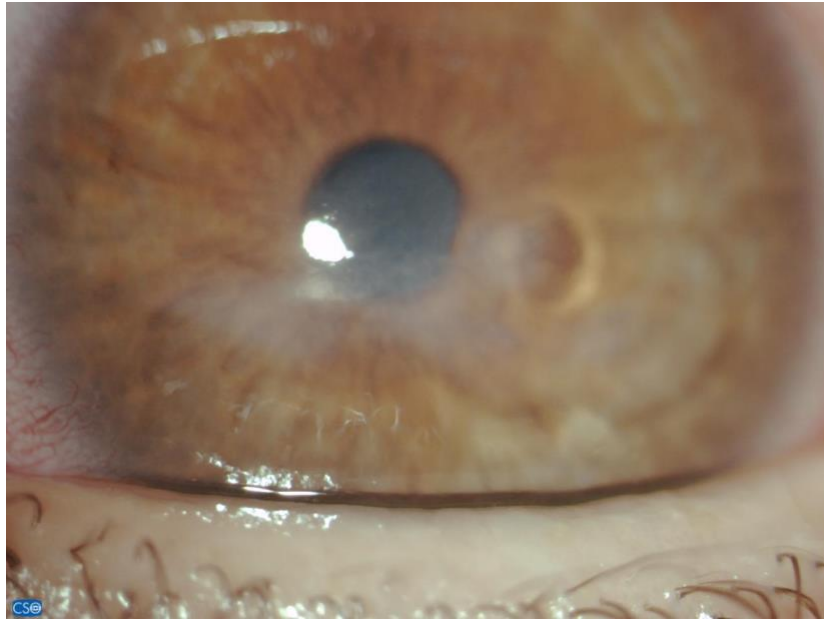
Score oGVHD T0	Score oGVHD T4
2	2
2	0
2	1
2	/
2	1
2	1
2	1
2	1
2	/
2	1
1	1
2	1
2	2
2	1
2	1
2	1
2	1
2	1
2	1
1	1
1	1
2	1
1	1
3	1
2	0



**Figura 18.** Miglioramento della cGVHD oculare post-trattamento secondo NIH eye score



**Figura 19.** Ulcera corneale



[Azienda Ospedaliero-Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria – SC Oculistica. Paziente AL15: ulcera corneale osservata al T0]

**Figura 20.** Rivalutazione dell'ulcera corneale post-trattamento



[Azienda Ospedaliero-Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria – SC Oculistica. Paziente AL15: risoluzione dell'ulcera corneale dello stesso paziente dell'immagine precedente osservata al termine dei 120 giorni di terapia con collirio a base di sangue cordonale.]

#### 4.4.2. Terapia immunosoppressiva

Per quanto riguarda l'immunosoppressione sistemica, si è cercato di comprendere se il trattamento con il collirio a base di lisato piastrinico da sangue cordonale potesse avere un ruolo in una eventuale riduzione o sospensione dell'immunosoppressione stessa, tenendo conto di quanto sia difficile mantenere un corretto equilibrio nel dosaggio farmacologico in modo da bilanciare una adeguata efficacia con una minimizzazione degli effetti collaterali.

Considerando il rischio di insorgenza di cGVHD anche a distanza di tempo dal trapianto, si segnala che 15 pazienti (60%) non assumevano più una terapia immunosoppressiva sistemica al T0, ma sono stati arruolati a causa della presenza di una sintomatologia fortemente impattante sulla qualità di vita.

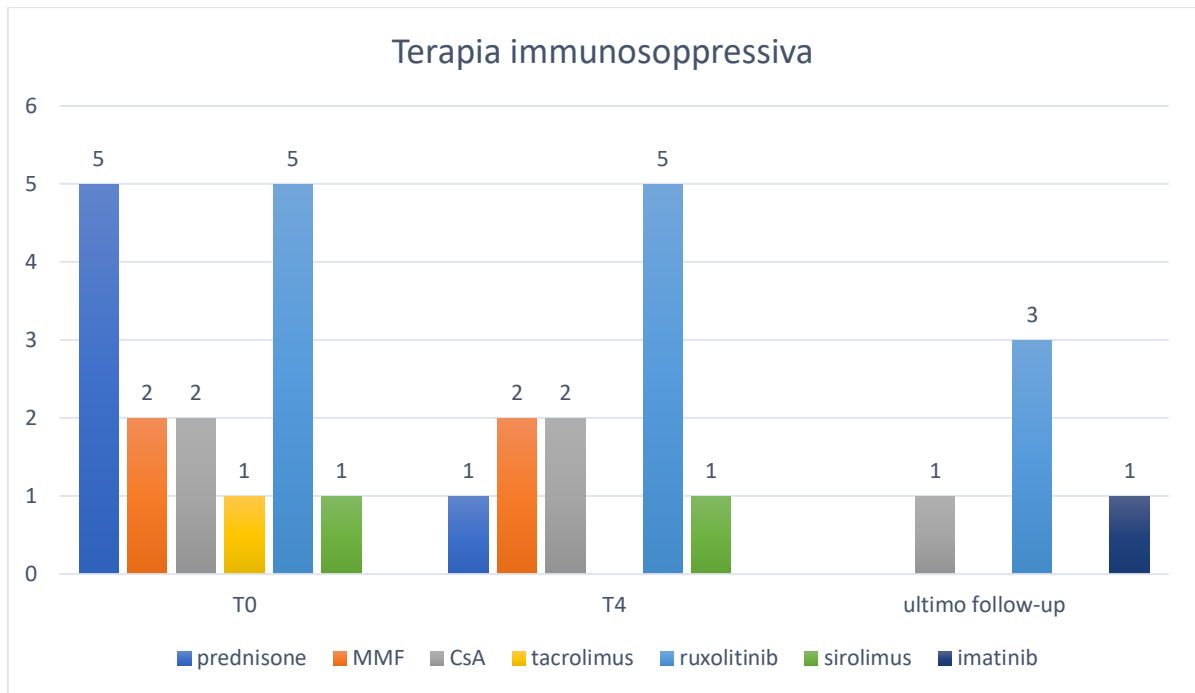
I restanti 10 pazienti (40%) arruolati con diagnosi di cGVHD oculare assumevano ancora una terapia immunosoppressiva sistemica al T0, con farmaci quali *prednisone*, *ciclosporina*, *micofenolato mofetile*, *tacrolimus*, *sirolimus* e *ruxolitinib*, assunti singolarmente oppure in associazione.

Fra questi ultimi, solo 2 pazienti (20%) sono arrivati a sospendere totalmente l'immunosoppressione al T4, mentre in altri 3 casi (30%) è stato possibile ridurre il dosaggio e/o il numero di farmaci assunti in associazione; nei restanti 5 pazienti (50%) è stata mantenuta invariata la terapia al T4.

L'impossibilità di sospendere completamente la terapia immunosoppressiva nella maggior parte di questi pazienti può essere dovuta in parte all'intervallo temporale di soli 120 giorni tra il T0 e il T4, ma anche alla coesistenza di altri siti di interessamento della cGVHD oltre a quello oculare, sui quali ovviamente non può aver avuto un effetto la terapia topica con il lisato piastrinico da sangue cordonale.

Fra coloro che avevano già sospeso l'immunosoppressione al T4, solo 1 paziente ha avuto la necessità di reintrodurre una terapia immunosoppressiva, ma a causa di valori spirometrici ingravescenti dovuti ad una cGVHD polmonare di grado 2, cosa che ha portato ad intraprendere una terapia con *imatinib* allo scopo di tentare di ottenere un migliore controllo del quadro.

**Figura 21.** Follow-up della terapia immunosoppressiva



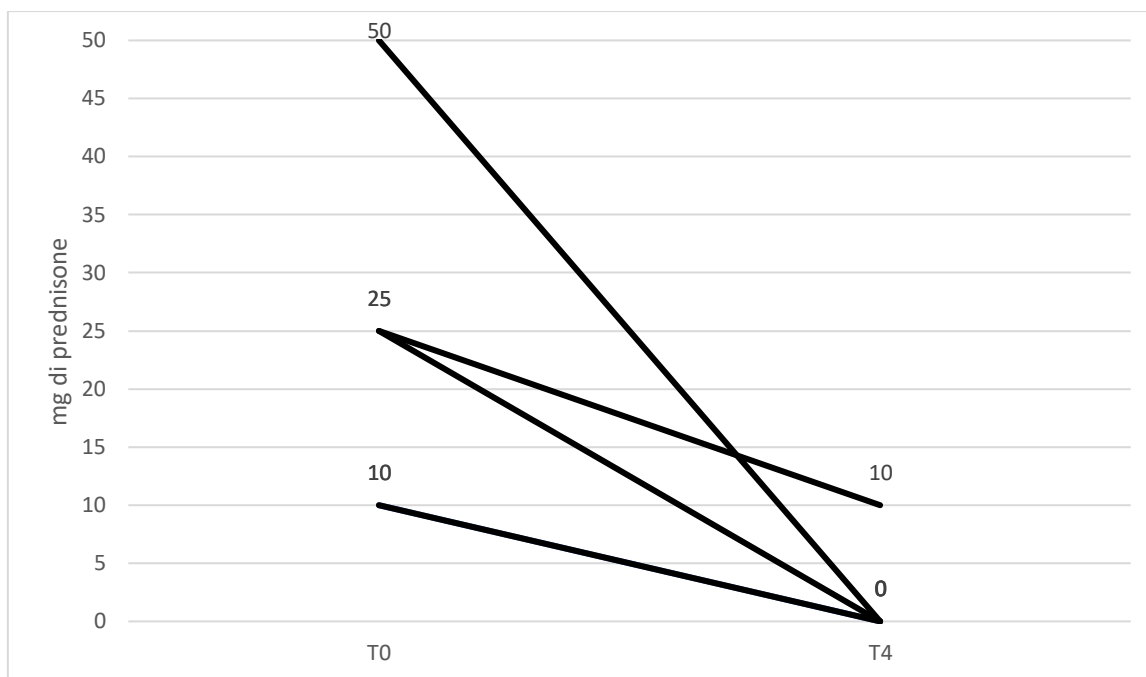
Il vero miglioramento in termini di riduzione della terapia attribuibile al trattamento con il lisato piastrinico da sangue cordonale, però, è quello riferito alla terapia steroidea, la quale è l'unica ad avere una correlazione diretta dovuta al suo impiego per la potenziale efficacia sul distretto oculare.

In particolare, al T0 erano 5 i pazienti che assumevano una terapia sistemica con *prednisone* (singolarmente o in associazione ad altri farmaci immunosoppressori), con un range variabile da 10 mg/die a 50 mg/die, mentre al T4 solamente 1 di essi lo assumeva ancora, pur avendone comunque diminuito il dosaggio da 25 mg/die a 10 mg/die, come osservabile nella tabella mostrata di seguito.

**Tabella 15.** Riduzione della terapia steroidea T0 vs T4

<i>prednisone</i> al T0	<i>prednisone</i> al T4	n° pazienti
10 mg/die	/	2
25 mg/die	/	1
50 mg/die	/	1
25 mg/die	10 mg/die	1

**Figura 22.** Riduzione della terapia steroidea T0 vs T4



#### 4.4.3. Effetto *graft-versus-tumor* (GVT)

Uno degli aspetti più importanti da considerare è la presenza di una sola recidiva di malattia (4%) tra i 25 pazienti trapiantati che sono stati arruolati nello studio clinico, dato molto inferiore rispetto alla media, in un follow-up mediano dell'intera coorte di 35,9 mesi (IQR 18,8 - 52,14 mesi), calcolato tra il T0 e l'ultimo follow-up.

Come spiegato in fase introduttiva, la GVHD è sicuramente una condizione piuttosto invalidante per il paziente, con un forte impatto sulla qualità di vita, ma è contemporaneamente un segnale di attività delle cellule del donatore con un effetto *graft versus leukemia / lymphoma* concomitante, il quale consente di sopprimere l'attività delle cellule neoplastiche residue nel ricevente.

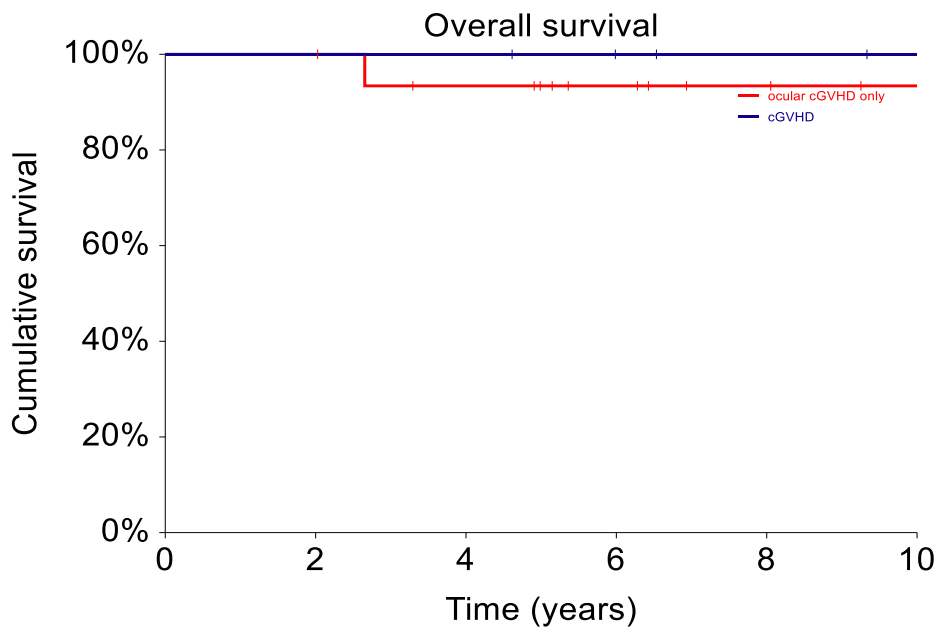
La presenza di una GVHD in atto in tutti questi pazienti, a prescindere dal fatto che essa fosse limitata al distretto oculare o estesa a coinvolgere altri organi e apparati, ha sicuramente determinato un effetto protettivo sul rischio di ripresa della malattia di base, come dimostrato dall'osservazione che 24 su 25 pazienti non abbiano avuto recidiva di malattia, con un'ottima overall survival (OS) e progression free survival (PFS).

A sostegno di quanto detto, la sopravvivenza a 10 anni per la coorte di pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) è stata del 95,8% (IC 95% 87,8 - 100%), con una sopravvivenza a 10 anni del 100% per i pazienti affetti da cGVHD sistemica e del

93,3% (IC 95% 80,71 - 100%) nei pazienti che hanno sviluppato solo una cGVHD oculare (p=0,29), come illustrato nel grafico Kaplan-Meier nella figura seguente.

In questo contesto va comunque considerato che i pazienti arruolati per cGVHD erano già sopravvissuti ad almeno 100 giorni dal trapianto, superando quindi la fase più critica post-procedura. Inoltre, come anticipato, l'alto tasso di sopravvivenza registrato può essere correlato alla presenza dell'effetto *graft versus tumor* (GVT) della GVHD più che al ruolo del collirio a base di lisato piastrinico da sangue cordonale, in quanto la sua comprovata efficacia a livello topico, verosimilmente, non può essere responsabile di un tale effetto sulla sopravvivenza dei pazienti arruolati, agendo solo su un aspetto del quadro generale.

**Figura 23.** Overall survival



## 5. DISCUSSIONE

La patologia da occhio secco, comunemente nota come *sindrome secca*, è una condizione tipicamente determinata da un quadro di autoimmunità, più nello specifico dalla Sindrome di Sjögren, le cui manifestazioni più rappresentative risultano essere xerostomia e xeroftalmia. Presentazioni simili sono riscontrate nel contesto della cGVHD oculare, che è a tal proposito considerata al pari di una malattia autoimmune.

La cGVHD è una complicanza comune del trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (allo-HSCT) per i pazienti che sopravvivono oltre i 100 giorni e ha implicazioni negative significative sulla qualità della vita, in quanto determina una compromissione dello stato funzionale e spesso porta alla ripresa della terapia immunosoppressiva o alla sua intensificazione, tanto che la cGVHD rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità non correlata alla recidiva (NRM).

I sintomi oculari si sviluppano in una percentuale significativa di pazienti dopo allo-HSCT e rappresentano spesso una delle manifestazioni più invalidanti. Infatti, la cGVHD oculare porta frequentemente a sintomi oculari gravi, risultando in una diminuzione della qualità della vita e limitazioni nelle attività quotidiane, proprio come riscontrato anche nei pazienti affetti da Sindrome di Sjögren.

Il trattamento della cGVHD oculare non è ad oggi ancora standardizzato, in quanto tutte le terapie finora proposte presentano dati di efficacia di qualità moderata. I trattamenti raccomandati si basano su studi retrospettivi e pochi piccoli studi prospettici.

Studi precedenti sulla cGVHD oculare hanno affrontato l'efficacia di trattamenti topici come *acido retinoico* (125), inibitori topici della calcineurina come *ciclosporina* 0,05% (126) e colliri al *tacrolimus* 0,03% (127), oltre a trattamenti immunosoppressori sistemici e approcci di tipo chirurgico, come occlusioni puntali (85) e tarsorrafie, tutti con risultati non del tutto risolutivi.

In particolare, per quanto riguarda il trattamento topico a base di *ciclosporina* 0,05%, era stato dimostrato come l'inizio del trattamento topico con *CsA* già a partire da un mese prima del TMO potesse ridurre la risposta infiammatoria nelle ghiandole lacrimali, la quale può essere responsabile dello sviluppo della cheratocongiuntivite secca post-TMO (126). Tuttavia,

L'utilizzo della *CsA* topica potrebbe essere limitato a causa di una ridotta tolleranza dovuta a una sensazione di bruciore all'applicazione (29). Per cercare di contrastare questa problematica, è stato effettuato uno studio prospettico che prevedeva l'instillazione topica di *tacrolimus* 0,03% una volta al giorno per tre mesi nei pazienti che mostravano intolleranza topica o sistemica alla *ciclosporina* e nei quali tentativi terapeutici precedenti con lacrime artificiali, colliri a base di siero autologo al 50% e occlusione dei punti lacrimali non avevano determinato un reale beneficio. I risultati di questo studio hanno suggerito che il *tacrolimus* topico 0,03% mostra ottima tolleranza (compliance alla terapia pari al 92,8%) e risultati incoraggianti in termini di miglioramento di Schirmer test, FBUT e fluorescein test, senza però raggiungere la significatività statistica rispetto all'applicazione topica di *CsA* 0,05%; inoltre, il fatto di essere molto più costoso rispetto alla *CsA* topica (costo della confezione circa 20 volte maggiore), fa sì che il collirio a base di *tacrolimus* possa essere considerato una valida alternativa in caso di intolleranza alla *CsA*.

Per quanto riguarda gli approcci chirurgici, quelli maggiormente descritti sono rappresentati dall'occlusione permanente dei punti lacrimali (eseguita qualora i punctal plugs non fossero tollerati e ripetutamente espulsi, attraverso cauterizzazione, coagulazione laser o sutura puntiforme (86)) e tarsorrafie temporanee o complete o ptosi protettiva indotta dalla tossina botulinica (29) (93), eseguite al fine di proteggere la cornea e guadagnare tempo quando il trattamento immunomodulatorio sistemico non è ancora completamente risolutivo. In questo contesto, oltre ai dati di efficacia di qualità moderata, non è da sottovalutare il fatto che le procedure chirurgiche rappresentano un approccio invasivo per i pazienti.

Gli approcci più innovativi si riferiscono all'utilizzo di colliri a base di siero autologo (AS) per il trattamento della sindrome secca correlata alla cGVHD, i cui benefici erano già stati riportati più di vent'anni fa su una piccola casistica da Rocha et al. (107), presumendo che il siero potesse replicare la funzione del fluido lacrimale. Infatti, i colliri AS sono una ricca fonte di fattori di crescita (GF), in particolare fattore di crescita epiteliale (EGF), che induce la proliferazione e limita l'apoptosi, proteine del siero (fibronectina e vitamina A) e citochine che migliorano la guarigione dell'epitelio corneale e della congiuntiva. Gli studi più recenti con questo tipo di approccio sono stati condotti da Tahmaz et al. (111) e Azari et al. (112), rispettivamente su 17 e su 35 pazienti. Nonostante la piccola coorte di pazienti, i risultati dello studio di Tahmaz et al. appaiono particolarmente incoraggianti, in quanto dimostrano che il



collirio a base di siero autologo al 100% è in grado migliorare significativamente il danno a livello della superficie oculare e di conseguenza anche l'acuità visiva. Anche lo studio di Azari et al. (112) riportava un miglioramento (55%) o stabilità (45%) della sintomatologia a livello oculare. Tuttavia, nello studio di Azari et al. veniva segnalato un caso di cheratite fungina fra i trentacinque pazienti sottoposti a trattamento topico con AS; inoltre, va anche sottolineato che tale procedura non ha avuto un ulteriore utilizzo su ampia scala per il rischio di accumulo di complessi immuni e per i potenziali livelli sierici tossici di immunosoppressori conseguenti al concomitante utilizzo sistemico e a livello della superficie oculare.

Oltre ai colliri a base di siero autologo, sono poi stati studiati nuovi prodotti in cui il ruolo delle piastrine assumeva un'importanza cruciale nell'implementare l'efficacia del trattamento con AS. Nello studio di Pezzotta et al. (82) sono stati arruolati 23 pazienti con cGVHD oculare refrattaria sui quali è stato testato un collirio a base di siero autologo arricchito di fattori di crescita piastrinici (PDGF), con un riscontro promettente in termini di efficacia e sicurezza, in quanto il 73,9% dei pazienti sono stati classificati come "responders", con una risposta che è stata mantenuta nel tempo e senza la segnalazione di eventi avversi gravi.

Nello studio di Zallio et al. (83) sono poi stati sottolineati gli ulteriori vantaggi dei colliri da lisato piastrinico autologo (PClys) rispetto ai colliri AS. In particolare, la loro maggiore concentrazione di GF derivati dalle piastrine, quali fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), fibronectina, fattore di crescita epidermico (EGF) e trasformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), può stimolare una più rapida riepitelizzazione corneale. Infatti, all'azione delle proteine essenziali per la lubrificazione della superficie oculare contenute nella componente plasmatica, si aggiungono i fattori di crescita donati dalle piastrine, che inducono la rigenerazione tissutale necessaria per accelerare la guarigione. Lo studio ha rivelato come già dopo 30 giorni di terapia il 91% dei pazienti avesse riscontrato un miglioramento della sintomatologia e nel 32% dei casi siano state riscontrate differenze oggettive e misurabili a livello della superficie oculare; nell'86% dei pazienti arruolati è stata definita una remissione del danno corneale. I risultati dello studio hanno dimostrato che il collirio biologico derivato da lisato piastrinico rappresenta un'opzione terapeutica sicura, pratica e ben tollerata, la quale garantisce sostanziali benefici alla maggior parte dei pazienti affetti da cGVHD oculare.

Se per quanto riguarda il trattamento della cGVHD oculare al momento è presente solo un numero esiguo di piccoli studi, più vasta è la letteratura sul trattamento della patologia da occhio secco da Sindrome di Sjögren, anche relativamente all'utilizzo di siero autologo o lisato piastrinico, come descritto nello studio di Min-Ji Kang et al. (128), un trial randomizzato in doppio cieco finalizzato al confronto di efficacia e sicurezza dei colliri a base di siero autologo (AS) e platelet-rich plasma (PRP) in pazienti con Sindrome di Sjögren primaria, che definisce il PRP come una valida alternativa per il trattamento di questi pazienti, anche in considerazione del minor tempo di preparazione; tuttavia, nonostante il miglioramento registrato in entrambi i bracci, non sono state osservate differenze statisticamente significative fra i due gruppi di confronto (AS e PRP).

Sulla base dell'esperienza pregressa con il collirio a base di lisato piastrinico autologo e dei suoi promettenti risultati, così come dei primi studi su colliri ottenuti da sangue cordonale, come quello di Yoon et al. (129), che già ne suggeriva sicurezza ed efficacia in termini sintomatologici, ma meno relativamente alla lacrimazione, è stato concepito un nuovo studio clinico prospettico monocentrico pilota. L'obiettivo è stato quello di valutare l'efficacia dell'utilizzo di un collirio biologico preparato da sangue cordonale (CPCB) nella stessa categoria di pazienti affetti da cheratopatia moderata-severa associata a cGVHD o malattie autoimmuni (in particolare, la Sindrome di Sjögren) e refrattari al trattamento farmacologico convenzionale e non idonei o refrattari al trattamento con lisato piastrinico autologo, anche in considerazione dei probabili alti livelli in circolo di cataboliti e molecole pro-infiammatorie che possono inficiare l'uso di una terapia biologica autologa in pazienti chemioterzati.

I risultati dello studio prospettico pilota CPCB19, incentrato sull'utilizzo di colliri a base di derivati piastrinici estratti da sangue cordonale per trattare la cGVHD oculare, convergono nell'indicare come essi siano stati un'opzione terapeutica sicura, efficace e ben tollerata, portando a benefici significativi per la maggior parte dei pazienti sottoposti al trattamento.

L'esito favorevole nei pazienti in cui la localizzazione oculare rappresentava il sintomo più grave della loro cGVHD estesa anche ad altri organi o apparati suggerisce che questi pazienti siano candidati ideali per questo trattamento topico, insieme a quelli affetti da Sindrome di Sjögren.

La fattibilità d'uso e la tollerabilità sono state eccellenti: nessun paziente ha avuto una reazione locale ai colliri di entità tale da interrompere il trattamento e non sono state osservate infezioni oculari.

I risultati ottenuti confermano l'efficacia del trattamento sperimentale, con un miglioramento di tutti i sintomi correlati alla cGVHD oculare o alla xerofthalmia da Sindrome di Sjögren che varia tra il 90% dei casi valutati con la scala VAS e il 96,7% secondo l'OSDI score. I dati più significativi, infatti, si riferiscono proprio alla sintomatologia percepita soggettivamente, relativamente alla quale è stato descritto un miglioramento che è stato rapido e persistente, portando ad un netto beneficio sulla qualità della vita nella maggior parte dei casi.

Per quanto riguarda le misurazioni oggettive relative all'entità della lacrimazione, il miglioramento dei valori registrati sia attraverso Schirmer test che BUT test non è stato sufficiente per definire una differenza statisticamente significativa, confermando ciò che era già stato osservato nel precedente studio di Yoon et al. (129), con un test di Schirmer che non rilevava una differenza statisticamente significativa, in contrapposizione con il netto miglioramento dei parametri sintomatologici riferiti e del danno corneale misurato.

Al contrario, la valutazione del danno corneale tramite Oxford score ha consentito di riscontrare un significativo miglioramento della disepitelizzazione che era presente al basale e scomparsa nell'83,3% dei pazienti al T4.

Focalizzandosi sui pazienti con una patologia ematologica di base, è stato riscontrato anche un notevole miglioramento dello score NIH della cGVHD oculare, in quanto, tra i 23 pazienti con cGVHD che hanno effettuato e completato il trattamento con adeguata compliance, il 73,9% ha registrato un miglioramento dello score e, in particolare, un punteggio pari a 0 è stato raggiunto dall'8,7% di essi.

Infine, risulta significativa anche la possibilità di riduzione della terapia steroidea attribuibile al trattamento con il lisato piastrinico da sangue cordonale, passando da 5 pazienti che assumevano una terapia sistemica con *prednisone* al T0 ad un solo paziente che lo assumeva ancora al T4, pur avendone comunque diminuito il dosaggio.

Dei 10 pazienti con cGVHD oculare che assumevano ancora una terapia immunosoppressiva sistemica al T0, solo 2 pazienti (20%) sono arrivati a sospendere totalmente l'immunosoppressione al T4, mentre in altri 3 casi (30%) è stato possibile ridurre il dosaggio e/o il numero di farmaci assunti in associazione; nei restanti 5 pazienti (50%) è stata mantenuta invariata la terapia al T4. L'impossibilità di sospendere completamente la terapia immunosoppressiva nella maggior parte di questi pazienti può essere spiegata in parte dall'intervallo temporale di soli 120 giorni intercorrenti tra il T0 e il T4, ma anche dalla coesistenza in gran parte di questi pazienti di un coinvolgimento di altre sedi oltre al comparto oculare da parte della cGVHD, sulle quali certamente non può aver sortito alcun effetto la terapia topica con il lisato piastrinico da sangue cordonale.

Tutti i dati analizzati convergono quindi nel suggerire un chiaro beneficio derivante dall'uso dei colliri preparati da sangue cordonale, sia in considerazione dei migliori risultati riscontrati in termini di qualità di vita descritta dai pazienti sia di riepitelizzazione corneale e conseguente riduzione dello score NIH della cGVHD, cosa che ha consentito una riduzione/cessazione della terapia corticosteroidica sistemica assunta cronicamente dai pazienti. Inoltre, gli eventi avversi che in linea teorica possono verificarsi, ma che fra i 34 pazienti trattati non sono comunque stati registrati, sono sovrapponibili a quelli che si possono verificare con l'uso del collirio biologico preparato da piastrine da sangue autologo che viene preparato dalla AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria. Infine, il collirio da sangue cordonale consente di risolvere sia la problematica relativa alla refrattarietà al trattamento farmacologico convenzionale e la non idoneità o refrattarietà al trattamento con lisato piastrinico autologo, sia la criticità dei probabili alti livelli in circolo di cataboliti e molecole pro-infiammatorie che possono inficiare l'uso di una terapia biologica autologa in pazienti chemiotrattati.

In conclusione, i punti di forza dello studio CPCB19 sono rappresentati:

1. dalla presenza di un protocollo standardizzato;
2. dalla gestione da parte di un team multidisciplinare (composto da ematologi dell'Unità Terapie Cellulari, specialisti dell'Ambulatorio Patologie Corneali, Servizio di Medicina Trasfusionale e Divisione di Ginecologia e Ostetricia);
3. dall'utilizzo di misure di outcome oggettive e validate;

4. dal fatto che, nonostante la relativamente breve durata del trattamento (120 giorni), un lungo follow-up dei pazienti ha permesso di effettuare un monitoraggio anche su un'eventuale necessità di reintroduzione della terapia immunosoppressiva.

Lo studio CPCB19 presenta però anche alcune limitazioni: le esigue dimensioni del campione, la mancanza di validazione multicentrica e l'assenza di un braccio di controllo. Tuttavia, va specificato che, in questo ambito, nella maggior parte dei casi si tratta di studi monocentrici con un arruolamento relativamente basso di pazienti, e questo perché è necessaria la multidisciplinarietà dell'unità e la presenza alle spalle di un centro trasfusionale attrezzato per la parte di manifattura.

In considerazione dei risultati estremamente incoraggianti, questo studio, interamente *no profit*, potrebbe rappresentare una base per uno studio randomizzato multicentrico, in modo da ampliare la casistica e, conseguentemente, la significatività statistica dei dati ottenuti. Infatti, anche se richiede la presenza di un team multidisciplinare, il protocollo standardizzato non prevede alti costi di amministrazione: il collirio da sangue cordonale è un prodotto biologico che non induce costi di produzione aggiuntivi rispetto al prodotto autologo o allogeneo. Inoltre, le analisi a cui viene sottoposto il sangue cordonale per la realizzazione del collirio sono le medesime che verrebbero effettuate routinariamente al momento della donazione del sangue cordonale. Considerando che tutte le sacche di sangue cordonale donate vengono analizzate per valutarne l'idoneità a scopi trapiantologici, l'impiego per la preparazione dei colliri rappresenta un potenziale utilizzo alternativo anche per quelle sacche la cui conta cellulare non raggiunge il quantitativo minimo per lo stoccaggio.

A fronte delle nuove normative e linee e guida del CNS (*Centro Nazionale Sangue*) che si stanno delineando, i prodotti derivati da sangue cordonale stanno diventando sempre più sfruttabili e destinabili alla Medicina Rigenerativa. I colliri, come anche le medicazioni avanzate, a fronte di risultati sempre più manifesti, saranno presto annoverati tra le terapie biologiche evidence based; pertanto, il Centro Trasfusionale dell'AOU SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria, già definito come estensione della rete delle Banche dei Tessuti e sangue cordonale Piemontesi, sarà presto riconosciuto centro di produzione di collirio derivato da sangue cordonale allogeneo. L'assegnazione di questi prodotti verrà effettuata in

base alle regole di compatibilità di gruppo e il prodotto consegnato al paziente è congelato in dosi giornaliere, senza vincoli territoriali, ma solo di trasporto a temperatura controllata.

Questo prodotto, essendo derivato da sangue, per definizione legislativa non ha costi diretti, ma unicamente indiretti; perciò, è ipotizzabile che venga presto definita una tariffazione attualmente non in essere.

Come noto, la donazione di sangue cordonale in Italia è gratuita e non dedicata e l'impiego di sangue cordonale a scopi trapiantologici è attualmente molto limitato; pertanto, si apre così una nuova frontiera per l'utilizzo di queste risorse biologiche per la ricerca e per la Medicina Rigenerativa.

## BIBLIOGRAFIA

1. Giuliani N., Olivieri A. Ematologia. Idelson Gnocchi, editor. 2020.
2. Arnaout K, Patel N, Jain M, El-Amm J, Amro F, Tabbara IA. Complications of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cancer Invest.* 2014 Aug 9;32(7):349–62.
3. Ringdén O, Karlsson H, Olsson R, Omazic B, Uhlin M. The allogeneic graft- *versus* -cancer effect. *Br J Haematol.* 2009 Dec 6;147(5):614–33.
4. Valcárcel D, Martino R, Caballero D, Martin J, Ferra C, Nieto JB, et al. Sustained Remissions of High-Risk Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome After Reduced-Intensity Conditioning Allogeneic Hematopoietic Transplantation: Chronic Graft-Versus-Host Disease Is the Strongest Factor Improving Survival. *Journal of Clinical Oncology.* 2008 Feb 1;26(4):577–84.
5. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *The Lancet.* 2009 May;373(9674):1550–61.
6. Levine JE, Paczesny S, Sarantopoulos S. Clinical Applications for Biomarkers of Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2012 Jan;18(1):S116–24.
7. Martinez-Cibrian N, Zeiser R, Perez-Simon JA. Graft-versus-host disease prophylaxis: Pathophysiology-based review on current approaches and future directions. *Blood Rev.* 2021 Jul;48:100792.
8. Steven Z., Pavletic MD, Georgia B., Vogelsang MD. Thomas' Hematopoietic Stem Cell transplantation. Chronic Graft-versus-Host Disease: Clinical Manifestation and Therapy. fourth edition. Vol. 87. 2009.
9. Higman MA, Vogelsang GB. Chronic graft versus host disease. *Br J Haematol.* 2004 May 19;125(4):435–54.
10. Hymes SR, Turner ML, Champlin RE, Couriel DR. Cutaneous Manifestations of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2006 Nov;12(11):1101–13.
11. Treister N, Duncan C, Cutler C, Lehmann L. How we treat oral chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2012 Oct 25;120(17):3407–18.
12. Pavletic SZ, Martin P, Lee SJ, Mitchell S, Jacobsohn D, Cowen EW, et al. Measuring Therapeutic Response in Chronic Graft-versus-Host Disease: National Institutes of

- Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IV. Response Criteria Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2006 Mar;12(3):252–66.
13. Chien JW, Madtes DK, Clark JG. Pulmonary function testing prior to hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Mar 1;35(5):429–35.
  14. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005 Dec;11(12):945–56.
  15. Carreras E., Dufour C., Mothy M., Kröger N. *The EBMT Handbook. Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. seventh edition. Springer Nature, editor. 2019.
  16. Flowers MED, Parker PM, Johnston LJ, Matos AVB, Storer B, Bensinger WI, et al. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood*. 2002 Jul 15;100(2):415–9.
  17. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, et al. Reduced Mortality after Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2010 Nov 25;363(22):2091–101.
  18. Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *New England Journal of Medicine*. 2017 Dec 28;377(26):2565–79.
  19. Arora M, Klein JP, Weisdorf DJ, Hasebroek A, Flowers MED, Cutler CS, et al. Chronic GVHD risk score: a Center for International Blood and Marrow Transplant Research analysis. *Blood*. 2011 Jun 16;117(24):6714–20.
  20. Fraser CJ, Scott Baker K. The management and outcome of chronic graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2007 Jul 22;138(2):131–45.
  21. Ruutu T, Gratwohl A, de Witte T, Afanasyev B, Apperley J, Bacigalupo A, et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT–ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Feb 29;49(2):168–73.
  22. Zeiser R, Polverelli N, Ram R, Hashmi SK, Chakraverty R, Middeke JM, et al. Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Chronic Graft-versus-Host Disease. *New England Journal of Medicine*. 2021 Jul 15;385(3):228–38.



23. Hui L, Qi L, Guoyu H, Xuliang S, Meiao T. Ruxolitinib for treatment of steroid-refractory graft-versus-host disease in adults: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Hematol*. 2020 May 3;13(5):565–75.
24. Drexler B, Buser A, Infanti L, Stehle G, Halter J, Holbro A. Extracorporeal Photopheresis in Graft-versus-Host Disease. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2020;47(3):214–25.
25. Miklos D, Cutler CS, Arora M, Waller EK, Jagasia M, Pusic I, et al. Ibrutinib for chronic graft-versus-host disease after failure of prior therapy. *Blood*. 2017 Nov 23;130(21):2243–50.
26. Cutler C, Lee SJ, Arai S, Rotta M, Zoghi B, Lazaryan A, et al. Belumosudil for chronic graft-versus-host disease after 2 or more prior lines of therapy: the ROCKstar Study. *Blood*. 2021 Dec 2;138(22):2278–89.
27. Appelbaum FR, Forman SI, Negrin RS, Blume KG. Thomas' hematopoietic cell transplantation. fourth edition. 2009.
28. Maedler-Kron C, Marcus VA, Michel RP. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: *Pathology of Transplantation*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 401–49.
29. Tappeiner C, Heiligenhaus A, Halter JP, Miserocchi E, Bandello F, Goldblum D. Challenges and concepts in the diagnosis and management of ocular graft-versus-host disease. *Front Med (Lausanne)*. 2023 Feb 16;10.
30. Shikari H, Amparo F, Saboo U, Dana R. Onset of Ocular Graft-Versus-Host Disease Symptoms After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cornea*. 2015 Mar;34(3):243–7.
31. Saito T, Shinagawa K, Takenaka K, Matsuo K, Yoshino T, Kiura K, et al. Ocular Manifestation of Acute Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. *Int J Hematol*. 2002 Apr 1;75(3):332–4.
32. Westeneng AC, Hettinga Y, Lokhorst H, Verdonck L, van Dorp S, Rothova A. Ocular Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Cornea*. 2010 Jul;29(7):758–63.
33. Nassiri N, Eslani M, Panahi N, Mehravaran S, Ziaei A, Djalilian AR. Ocular graft versus host disease following allogeneic stem cell transplantation: a review of current knowledge and recommendations. *J Ophthalmic Vis Res*. 2013 Oct;8(4):351–8.

34. Sun YC, Chai X, Inamoto Y, Pidala J, Martin PJ, Flowers MED, et al. Impact of Ocular Chronic Graft-versus-Host Disease on Quality of Life. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015 Sep;21(9):1687–91.
35. Alio JL, Colecha JR, Pastor S, Rodriguez A, Artola A. Symptomatic Dry Eye Treatment with Autologous Platelet-Rich Plasma. *Ophthalmic Res*. 2007;39(3):124–9.
36. Ogawa Y, Okamoto S, Wakui M, Watanabe R, Yamada M, Yoshino M, et al. Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Ophthalmology*. 1999 Oct 1;83(10):1125–30.
37. Pathak M, Diep PP, Lai X, Brinch L, Ruud E, Drolsum L. Ocular findings and ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation without total body irradiation. *Bone Marrow Transplant*. 2018 Jul 30;53(7):863–72.
38. Shimizu E, Aketa N, Yazu H, Uchino M, Kamoi M, Sato Y, et al. Corneal higher-order aberrations in eyes with chronic ocular graft-versus-host disease. *Ocul Surf*. 2020 Jan;18(1):98–107.
39. Saboo US, Amparo F, Abud TB, Schaumberg DA, Dana R. Vision-Related Quality of Life in Patients with Ocular Graft-versus-Host Disease. *Ophthalmology*. 2015 Aug;122(8):1669–74.
40. Sinha S, Singh RB, Dohlman TH, Wang M, Taketani Y, Yin J, et al. Prevalence of Persistent Corneal Epithelial Defects in Chronic Ocular Graft-Versus-Host Disease. *Am J Ophthalmol*. 2020 Oct;218:296–303.
41. Majhail<sup><sup></sup></sup>, Navneet Singh, Rizzo JD, Lee SJ, Aljurf M, Atsuta Y, Bonfim C, et al. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(2):109–33.
42. Inamoto Y, Valdés-Sanz N, Ogawa Y, Alves M, Berchicci L, Galvin J, et al. Ocular graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation: Expert review from the Late Effects and Quality of Life Working Committee of the CIBMTR and Transplant Complications Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2019 May 7;54(5):662–73.
43. Hessen M, Akpek EK. Ocular graft-versus-host disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012 Oct;12(5):540–7.

44. Tabbara KF, Al-Ghamdi A, Al-Mohareb F, Ayas M, Chaudhri N, Al-Sharif F, et al. Ocular Findings after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Ophthalmology*. 2009 Sep;116(9):1624–9.
45. Kim SK. Update on ocular graft versus host disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006 Aug;17(4):344–8.
46. Perez VL, Mousa HM, Soifer M, Beatty C, Sarantopoulos S, Saban DR, et al. Meibomian Gland Dysfunction: A Route of Ocular Graft-Versus-Host Disease Progression That Drives a Vicious Cycle of Ocular Surface Inflammatory Damage. *Am J Ophthalmol*. 2023 Mar;247:42–60.
47. Kamoi M, Ogawa Y, Uchino M, Tatematsu Y, Mori T, Okamoto S, et al. Donor–recipient gender difference affects severity of dry eye after hematopoietic stem cell transplantation. *Eye*. 2011 Jul 8;25(7):860–5.
48. Allan EJ, Flowers MED, Lin MP, Bensinger RE, Martin PJ, Wu MC. Visual Acuity and Anterior Segment Findings in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Cornea*. 2011 Dec;30(12):1392–7.
49. Rapoport Y, Freeman T, Koyama T, Engelhardt BG, Jagasia M, Savani BN, et al. Validation of International Chronic Ocular Graft-Versus-Host Disease (GVHD) Group Diagnostic Criteria as a Chronic Ocular GVHD-Specific Metric. *Cornea*. 2017 Feb;36(2):258–63.
50. Jabs DA. The Eye in Bone Marrow Transplantation. *Archives of Ophthalmology*. 1989 Sep 1;107(9):1343.
51. Herretes S, Ross DB, Duffort S, Barreras H, Yaohong T, Saeed AM, et al. Recruitment of Donor T Cells to the Eyes During Ocular GVHD in Recipients of MHC-Matched Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplants. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015 Apr 10;56(4):2348.
52. Carreno-Galeano JT, Dohlman TH, Kim S, Yin J, Dana R. A Review of Ocular Graft-versus-Host Disease: Pathophysiology, Clinical Presentation and Management. *Ocul Immunol Inflamm*. 2021 Aug 18;29(6):1190–9.
53. Hong YQ, Wan B, Li XF. Macrophage regulation of graft-vs-host disease. *World J Clin Cases*. 2020 May 26;8(10):1793–805.
54. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Annu Rev Immunol*. 2007 Apr 1;25(1):139–70.

55. Herretes S, Ross DB, Duffort S, Barreras H, Yaohong T, Saeed AM, et al. Recruitment of Donor T Cells to the Eyes During Ocular GVHD in Recipients of MHC-Matched Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplants. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015 Apr 10;56(4):2348.
56. Levy RB, Mousa HM, Lightbourn CO, Shiuey EJ, Latoni D, Duffort S, et al. Analyses and Correlation of Pathologic and Ocular Cutaneous Changes in Murine Graft versus Host Disease. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 24;23(1):184.
57. Bastian D, Wu Y, Betts BC, Yu XZ. The IL-12 Cytokine and Receptor Family in Graft-vs.-Host Disease. *Front Immunol*. 2019 May 8;10.
58. Wolff D, Radojcic V, Lafyatis R, Cinar R, Rosenstein RK, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IV. The 2020 Highly morbid forms report. *Transplant Cell Ther*. 2021 Oct;27(10):817–35.
59. Mirza N, Zierhut M, Korn A, Bornemann A, Vogel W, Schmid-Horch B, et al. Graft versus self (GvS) against T-cell autoantigens is a mechanism of graft–host interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Nov 29;113(48):13827–32.
60. Milosevic S, Bachnick B, Karim K, Bornkamm GW, Witter K, Gerbitz A, et al. Identification of MHC II-Restricted Minor Histocompatibility Antigens After HLA-Identical Stem-Cell Transplantation. *Transplantation*. 2010 Nov 15;90(9):1030–5.
61. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, et al. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2235–41.
62. Newman RG, Ross DB, Barreras H, Herretes S, Podack ER, Komanduri K V., et al. The allure and peril of hematopoietic stem cell transplantation: overcoming immune challenges to improve success. *Immunol Res*. 2013 Dec 23;57(1–3):125–39.
63. Ogawa Y, Kuwana M. Dry Eye as a Major Complication Associated with Chronic Graft-Versus-Host Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cornea*. 2003 Oct;22(Supplement 1):S19–27.
64. Ogawa Y, Shimmura S, Dogru M, Tsubota K. Immune Processes and Pathogenic Fibrosis in Ocular Chronic Graft-Versus-Host Disease and Clinical Manifestations after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cornea*. 2010 Nov;29(11):S68–77.

65. Na KS, Yoo Y sik, Hwang K yeon, Mok JW, Joo CK. Tear Osmolarity and Ocular Surface Parameters as Diagnostic Markers of Ocular Graft-Versus-Host Disease. *Am J Ophthalmol.* 2015 Jul;160(1):143-149.e1.
66. Shulman HM, Kleiner D, Lee SJ, Morton T, Pavletic SZ, Farmer E, et al. Histopathologic Diagnosis of Chronic Graft-versus-Host Disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2006 Jan;12(1):31–47.
67. Nassar A, Tabbara KF, Aljurf M. Ocular manifestations of graft-versus-host disease. *Saudi Journal of Ophthalmology.* 2013 Jul;27(3):215–22.
68. Shen Z, Ma J, Peng R, Hu B, Zhao Y, Liu S, et al. Biomarkers in Ocular Graft-Versus-Host Disease: Implications for the Involvement of B Cells. *Transplant Cell Ther.* 2022 Nov;28(11):749.e1-749.e7.
69. Giannaccare G, Pellegrini M, Bernabei F, Scorcia V, Campos E. Ocular surface system alterations in ocular graft-versus-host disease: all the pieces of the complex puzzle. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2019 Jul 3;257(7):1341–51.
70. Inamoto Y, Chai X, Kurland BF, Cutler C, Flowers MED, Palmer JM, et al. Validation of Measurement Scales in Ocular Graft-versus-Host Disease. *Ophthalmology.* 2012 Mar;119(3):487–93.
71. Yang J, Zhao W, Liao Y, Wu S, Li J, Jin L, et al. Ocular surface disease index questionnaire as a sensitive test for primary screening of chronic ocular graft-versus-host disease. *Ann Transl Med.* 2022 Aug;10(16):855–855.
72. Tatematsu Y, Ogawa Y, Abe T, Kamoi M, Uchino M, Saijo-Ban Y, et al. Grading criteria for chronic ocular graft-versus-host disease: Comparing the NIH eye score, Japanese dry eye score and DEWS 2007 score. *Sci Rep.* 2014 Oct 22;4(1):6680.
73. Brott NR, Ronquillo Y. Schirmer Test. 2024.
74. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2015 Mar;21(3):389-401.e1.

75. Balasubramaniam SC, Raja H, Nau CB, Shen JF, Schornack MM. Ocular Graft-Versus-Host Disease. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*. 2015 Sep;41(5):256–61.
76. Figus M, Agnifili L, Lanzini M, Brescia L, Sartini F, Mastropasqua L, et al. Topical preservative-free ophthalmic treatments: an unmet clinical need. *Expert Opin Drug Deliv*. 2021 Jun 3;18(6):655–72.
77. Bruscolini A, Gharbiya M, Sacchetti M, Plateroti R, Ralli M, Moramarco A, et al. Involvement of ocular surface in graft-versus-host disease: An update from immunopathogenesis to treatment. *J Cell Physiol*. 2021 Sep 28;236(9):6190–9.
78. Robinson MR, Lee SS, Rubin BI, Wayne AS, Pavletic SZ, Bishop MR, et al. Topical corticosteroid therapy for cicatricial conjunctivitis associated with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2004 May 1;33(10):1031–5.
79. Kiang E, Tesavibul N, Yee R, Kellaway J, Przepiorka D. The use of topical cyclosporin A in ocular graft-versus-host-disease. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Jul 1;22(2):147–51.
80. Abud TB, Amparo F, Saboo US, Di Zazzo A, Dohlman TH, Ciolino JB, et al. A Clinical Trial Comparing the Safety and Efficacy of Topical Tacrolimus versus Methylprednisolone in Ocular Graft-versus-Host Disease. *Ophthalmology*. 2016 Jul;123(7):1449–57.
81. Ogawa Y, Okamoto S, Mori T, Yamada M, Mashima Y, Watanabe R, et al. Autologous serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2003 Apr 1;31(7):579–83.
82. Pezzotta S, Fante C Del, Scudeller L, Cervio M, Antoniazzi ER, Perotti C. Autologous platelet lysate for treatment of refractory ocular GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Dec 23;47(12):1558–63.
83. Zallio F, Mazzucco L, Monaco F, Astori MR, Passera R, Drago G, et al. A Single-Center Pilot Prospective Study of Topical Application of Platelet-Derived Eye Drops for Patients with Ocular Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2016 Sep;22(9):1664–70.
84. Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Ghavamzadeh L, Ghavamzadeh A, Tohidast-Acrad Z. Effect of pilocarpine hydrochloride on unstimulated whole saliva flow rate and

- composition in patients with chronic graft-versus-host disease (cGVHD). *Bone Marrow Transplant*. 2007 Apr 19;39(7):431–4.
85. Sabti S, Halter JP, Braun Fränkl BC, Goldblum D. Punctal occlusion is safe and efficient for the treatment of keratoconjunctivitis sicca in patients with ocular GvHD. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Jul 31;47(7):981–4.
  86. Yaguchi S, Ogawa Y, Kamoi M, Uchino M, Tatematsu Y, Ban Y, et al. Surgical management of lacrimal punctal cauterization in chronic GVHD-related dry eye with recurrent punctal plug extrusion. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Nov 19;47(11):1465–9.
  87. Behrens A, Doyle JJ, Stern L, Chuck RS, McDonnell PJ, Azar DT, et al. Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations. *Cornea*. 2006 Sep;25(8):900–7.
  88. Korb DR, Blackie CA. Using goggles to increase periocular humidity and reduce dry eye symptoms. *Eye Contact Lens*. 2013 Jul;39(4):273–6.
  89. Inamoto Y, Valdés-Sanz N, Ogawa Y, Alves M, Berchicci L, Galvin J, et al. Ocular graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation: Expert review from the Late Effects and Quality of Life Working Committee of the CIBMTR and Transplant Complications Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2019 May 7;54(5):662–73.
  90. Jacobs DS, Rosenthal P. Boston Scleral Lens Prosthetic Device for Treatment of Severe Dry Eye in Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Cornea*. 2007 Dec;26(10):1195–9.
  91. Wolff D, Fatobene G, Rocha V, Kröger N, Flowers ME. Steroid-refractory chronic graft-versus-host disease: treatment options and patient management. *Bone Marrow Transplant*. 2021 Sep 3;56(9):2079–87.
  92. Smith VA. Doxycycline--a role in ocular surface repair. *British Journal of Ophthalmology*. 2004 May 1;88(5):619–25.
  93. Adams GGW, Kirkness CM, Lee JP. Botulinum toxin A induced protective ptosis. *Eye*. 1987 Sep;1(5):603–8.
  94. Schuerch K, Baeriswyl A, Frueh BE, Tappeiner C. Efficacy of Amniotic Membrane Transplantation for the Treatment of Corneal Ulcers. *Cornea*. 2020 Apr 7;39(4):479–83.
  95. Xu Y, Wang YM, Sun ZT, Yang XL, Zhuang XY, Ren YR, et al. Corneal perforation associated with ocular graft-versus-host disease. *Front Oncol*. 2022 Sep 15;12.

96. Komai S, Inatomi T, Nakamura T, Ueta M, Horiguchi G, Teramukai S, et al. Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial transplantation for fornix reconstruction in chronic cicatrising diseases. *British Journal of Ophthalmology*. 2022 Oct;106(10):1355–62.
97. Riemens A, te Boome L, Imhof S, Kuball J, Rothova A. Current insights into ocular graft-versus-host disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2010 Nov;21(6):485–94.
98. Baer AN, Walitt B. Update on Sjögren Syndrome and Other Causes of Sicca in Older Adults. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2018 Aug;44(3):419–36.
99. Bjordal O, Norheim KB, Rødahl E, Jonsson R, Omdal R. Primary Sjögren’s syndrome and the eye. *Surv Ophthalmol*. 2020 Mar;65(2):119–32.
100. Fox RI, Fox CM, Gottenberg JE, Dörner T. Treatment of Sjögren’s syndrome: current therapy and future directions. *Rheumatology*. 2021 May 14;60(5):2066–74.
101. Azari AA, Rapuano CJ. Autologous Serum Eye Drops for the Treatment of Ocular Surface Disease. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*. 2015 May;41(3):133–40.
102. Quinto GG, Campos M, Behrens A. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(6 Suppl):47–54.
103. Mazzucco L, Balbo V, Guaschino R. “Reasonable compromise” to define the quality standards of platelet concentrate for non-transfusion use (CPunT). *Transfusion and Apheresis Science*. 2012 Oct;47(2):207–11.
104. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden A. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004 Nov 30;91(01):4–15.
105. Martínez-Zapata MJ, Martí-Carvajal A, Solà I, Bolibar I, Ángel Expósito J, Rodríguez L, et al. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. *Transfusion (Paris)*. 2009 Jan 23;49(1):44–56.
106. Özcürü F, Aydın S, Helvacı MR. Ocular Surface Disease Index for the Diagnosis of Dry Eye Syndrome. *Ocul Immunol Inflamm*. 2007 Jan 8;15(5):389–93.
107. Rocha E, Pelegrino F, de Paiva C, Vigorito A, de Souza C. GVHD dry eyes treated with autologous serum tears. *Bone Marrow Transplant*. 2000 May 1;25(10):1101–3.
108. Versura P, Buzzi M, Giannaccare G, Grillini M, Terzi A, Pagliaro P, et al. Cord blood serum-based eye drops: the impact of donor haematological and obstetric factors on the



- variability of epidermal growth factor levels. *Blood Transfus.* 2014 Jan;12 Suppl 1(Suppl 1):s44-50.
109. Chiang CC, Lin JM, Chen WL, Tsai YY. Allogeneic Serum Eye Drops for the Treatment of Severe Dry Eye in Patients With Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Cornea.* 2007 Aug;26(7):861–3.
  110. Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G. Epitheliotropic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: a potential agent for the treatment of ocular surface defects? *Transfusion (Paris).* 2004 Dec 2;44(12):1724–31.
  111. Tahmaz V, Gehlsen U, Sauerbier L, Holtick U, Engel L, Radojska S, et al. Treatment of severe chronic ocular graft-versus-host disease using 100% autologous serum eye drops from a sealed manufacturing system: a retrospective cohort study. *British Journal of Ophthalmology.* 2016 Jun 6;bjophthalmol-2015-307666.
  112. Azari AA, Karadag R, Kanavi MR, Nehls S, Barney N, Kim K, et al. Safety and efficacy of autologous serum eye drop for treatment of dry eyes in graft-versus-host disease. *Cutan Ocul Toxicol.* 2017 Apr 3;36(2):152–6.
  113. Valentini CG, Nuzzolo ER, Orlando N, Metafuni E, Bianchi M, Chiusolo P, et al. Cytokine profile of autologous platelet-derived eye drops in patients with ocular chronic graft-versus-host disease. *Vox Sang.* 2016 Feb 18;110(2):189–92.
  114. Tahmaz V, Wiesen MHJ, Gehlsen U, Sauerbier L, Stern ME, Holtick U, et al. Detection of systemic immunosuppressants in autologous serum eye drops (ASED) in patients with severe chronic ocular graft versus host disease. *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2021 Jan 19;259(1):121–8.
  115. Versura P, Buzzi M, Giannaccare G, Terzi A, Fresina M, Velati C, et al. Targeting growth factor supply in keratopathy treatment: comparison between maternal peripheral blood and cord blood as sources for the preparation of topical eye drops. *Blood Transfus.* 2016 Mar;14(2):145–51.
  116. Versura P, Profazio V, Buzzi M, Stancari A, Arpinati M, Malavolta N, et al. Efficacy of Standardized and Quality-Controlled Cord Blood Serum Eye Drop Therapy in the Healing of Severe Corneal Epithelial Damage in Dry Eye. *Cornea.* 2013 Apr;32(4):412–8.

117. Buzzi M, Versura P, Grigolo B, Cavallo C, Terzi A, Pellegrini M, et al. Comparison of growth factor and interleukin content of adult peripheral blood and cord blood serum eye drops for cornea and ocular surface diseases. *Transfusion and Apheresis Science*. 2018 Aug;57(4):549–55.
118. Geremicca W, Fonte C, Vecchio S. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. *Blood Transfus*. 2010 Apr;8(2):107–12.
119. “Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti.” DM 2 novembre 2015.
120. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading Of Corneal and Conjunctival Staining in the Context of Other Dry Eye Tests. *Cornea*. 2003 Oct;22(7):640–50.
121. Giannaccare G, Bonifazi F, Sessa M, Dan E, Arpinati M, Fresina M, et al. Ocular surface analysis in hematological patients before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: implication for daily clinical practice. *Eye*. 2017 Oct 19;31(10):1417–26.
122. Aprili G, Gandini G, Guaschino R, Mazzucco L, Salvaneschi L, Vaglio S, et al. SIMTI recommendations on blood components for non-transfusional use. *Blood Transfus*. 2013 Oct;11(4):611–22.
123. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, et al. Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2009 Dec;15(12):1628–33.
124. Spyridonidis A, Labopin M, Savani BN, Niittyvuopio R, Blaise D, Craddock C, et al. Redefining and measuring transplant conditioning intensity in current era: a study in acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplant*. 2020 Jun 1;55(6):1114–25.
125. Murphy PT, Sivakumaran M, Fahy G, Hutchinson RM. Successful use of topical retinoic acid in severe dry eye due to chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1996 Sep;18(3):641–2.
126. Malta JB, Soong HK, Shtein RM, Musch DC, Rhoades W, Sugar A, et al. Treatment of Ocular Graft-Versus-Host Disease With Topical Cyclosporine 0.05%. *Cornea*. 2010 Dec;29(12):1392–6.

127. Sanz-Marco E, Udaondo P, García-Delpech S, Vazquez A, Diaz-Llopis M. Treatment of refractory dry eye associated with graft versus host disease with 0.03% tacrolimus eyedrops. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013 Oct;29(8):776–83.
128. Kang MJ, Lee JH, Hwang J, Chung SH. Efficacy and safety of platelet-rich plasma and autologous-serum eye drops for dry eye in primary Sjögren’s syndrome: a randomized trial. *Sci Rep.* 2023 Nov 7;13(1):19279.
129. Yoon KC, Jeong IY, Im SK, Park YG, Kim HJ, Choi J. Therapeutic effect of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of dry eye associated with graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Feb;39(4):231–5.

# RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo elaborato, desidero esprimere la mia più sincera gratitudine a tutti coloro che hanno reso possibile la realizzazione di questa Tesi di Laurea.

In primo luogo, un sentito ringraziamento va al mio Relatore, il Prof. Marco Ladetto, per avermi permesso, con grande disponibilità e continuo incoraggiamento, di svolgere un percorso formativo non solo dal punto di vista didattico, ma anche professionale, che sono certa mi sarà utile nel prossimo futuro. A tal proposito, desidero ringraziare sinceramente anche il Dott. Francesco Zallio, per la sua costante guida, pazienza e supporto, non solo nello svolgimento di questo progetto di tesi, ma anche nel trasmettermi la passione per questo lavoro. Grazie. Grazie anche alla Dott.ssa Sara Butera e alla Dott.ssa Lucia Brunello, per i loro preziosi consigli, e alle infermiere del Centro Trapianti, Betty e Simona, per la loro dolcezza e premura: grazie a persone come voi ho imparato tanto.

Grazie a mamma e papà, per i loro sacrifici, per i loro insegnamenti e per il loro esempio; per avermi mostrato cosa significa Famiglia e come rialzarsi prendendosi per mano per fronteggiare i problemi veri della vita, di fronte ai quali tutto il resto non conta più. Grazie per avermi trasmesso la perseveranza, la responsabilità delle mie decisioni e il coraggio di affrontare nuove sfide, non accontentandosi mai e spingendosi sempre un po' più in là. Grazie per avermi sempre lasciata libera di scegliere e anche di sbagliare, ma con la consapevolezza di avere costantemente qualcuno al mio fianco pronto a difendermi, ma anche a farmi conoscere e affrontare il mondo restando sempre un passo indietro. Grazie per avermi lasciata credere nel futuro e nei miei sogni, che piano piano si stanno avverando, soprattutto grazie a voi. Ma grazie anche a chi mi ha permesso di essere qui oggi insieme al mio papà e alla mia mamma: spero mi senta e possa essere orgoglioso di me. Mi auguro di poter diventare un giorno un medico bravo quasi quanto lui.

Ai miei nonni e a tutta la mia famiglia, da sempre i miei più grandi ammiratori spesso non troppo segreti, per essere in grado di riempirmi il cuore con un sorriso sincero o con un "*gratun*" o un "*tesör*" sussurrato dall'alto.

Ad Alessandro, la persona che più di ogni altra ha vissuto con me questi sei anni. Per aver portato luce nella mia quotidianità e per avermi regalato la spensieratezza di cui ogni tanto ho bisogno. Per aver condiviso con me gioie e frustrazioni, che fin dal primo giorno abbiamo affrontato insieme, prima per caso e poi per scelta. Grazie per aver stretto forte la mia mano e

avermi donato certezze. Sono sicura sarai il medico e il compagno di vita che tutti vorrebbero avere.

Grazie ad Aurora e Ludovica, compagne di studio, future colleghe e anche sorelle che non ho mai avuto. Grazie per le chiacchierate infinite, per le sessioni di studio ancora più lunghe, le risate, le crisi esistenziali, il gelato a mezzanotte e tutti i ricordi che abbiamo costruito insieme in questi anni vivendo quasi in simbiosi. Grazie per essere state la mia casa e per avermi fatto vivere i valori più puri di un'Amicizia che da oggi assumerà nuova forma. Sono certa che riuscirete a raggiungere tutti i successi che vi meritate, sia come medici, sia nella vita. CD. Sempre.

Grazie a tutto il resto di San Baudolino: grazie a Jasmine, Stefano, Matteo e Lorenzo. Grazie per essere stati la mia seconda famiglia in questi anni e per tutto l'affetto che siete riusciti a regalarmi, anche se io di abbracci e affetto non ne ho mai voluto sentir parlare. Ovunque ci porterà la vita, per voi ci sarà sempre un posto nel mio cuore (e un risotto sulla mia tavola).

Grazie a Eleonora, mio eterno alter ego e punto fermo senza bisogno di troppe parole. Brilla sempre come sai fare, ma sempre accanto a me.

Grazie a Cecilia, Beatrice e Marta, le mie amiche del cuore. Vicine o lontane, vi ho sempre sentite al mio fianco. Vi voglio bene.

Grazie a Letizia, eterna fonte di sorrisi e leggerezza che mi accompagna da anni senza mai lasciarmi sola. Meriti tutto ciò che di bello la vita abbia da offrirti.

Grazie a Nina e Olivia, per avermi ascoltata per ore e ore nei miei sproloqui per sei anni, sedici sessioni e trentasei esami, fingendovi interessate per accaparrarvi un po' di coccole. La corona d'alloro oggi è anche un po' vostra.

P.S.: Grazie anche al basilico e a Freddie Mercury: senza pasta al pesto e *Don't stop me now* prima di ogni esame, oggi non sarei qui a festeggiare.