Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale

# Dottorato di Ricerca in Oncologia, Ematologia e Patologia

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15

Settore Concorsuale: 06/D3

34° Ciclo

# Metilazione del DNA e Trapianto Allogenico di Cellule Staminali Emopoietiche

**TESI DI DOTTORATO**

Presentata dalla **Dott.ssa Mariarosaria Sessa**

Coordinatrice del Dottorato

**Prof.ssa Manuela Ferracin**

Supervisore

**Chiar.mo Prof. Michele Cavo**

Co-supervisore

**Dott.ssa Francesca Bonifazi**

Esame finale anno 2022

Sommario

*Introduzione* ..... *2*

**Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche** ..... **2**

**Andamento del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche in relazione all'età del ricevente** ..... **4**

**Outcome del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche nei pazienti anziani** ..... **6**

**Valutazione di un paziente candidato a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche** ..... **9**

**La metilazione del DNA come biomarker di invecchiamento** ..... **14**

**La metilazione del DNA e il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche** ..... **18**

*Materiali, metodi e disegno dello studio* ..... *19*

Valutazione dell'età di metilazione del DNA e dell'accelerazione dell'età epigenetica ..... 19

Grading della GVHD ..... 24

Analisi statistica ..... 24

Trattamenti concomitanti e dati clinici ..... 25

*Risultati* ..... *26*

**OS, PFS, NRM** ..... **31**

**GVHD acuta e cronica** ..... **33**

**Analisi di metilazione del DNA** ..... **35**

*Discussione* ..... *39*

*Bibliografia* ..... *41*

# Introduzione

## Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) è una terapia affermata nel trattamento di numerose patologie ematologiche potenzialmente fatali, la maggior parte neoplastiche, ma anche sindromi da insufficienza midollare, immunodeficienze primitive ed errori congeniti del metabolismo. Il principio alla base del trapianto allogenico è duplice: eliminare il midollo emopoietico patologico e il sistema immunitario del paziente per permettere l'attecchimento un prodotto cellulare da donatore adeguatamente compatibile, allo scopo di rimpiazzare completamente l'emopoiesi e il sistema immune, in modo che possa eradicare le cellule neoplastiche eventualmente persistenti nel caso di disordine tumorale.

La sua estensiva applicazione nella pratica clinica è stata permessa dall'ampliamento delle conoscenze sulle basi genetiche dell'istocompatibilità tissutale e dalla creazione di ampi registri di donatori. Oggi le cellule staminali da midollo osseo, da sangue periferico e da sangue cordonale sono tutte ampiamente utilizzate come sorgente per il trapianto di cellule staminali emopoietiche.

Gli studi di Weiden e Thomas negli anni '80 hanno fermamente stabilito l'esistenza di un effetto di tossicità cellulare contro le cellule neoplastiche "graft versus leukemia" nell'uomo (Thomas et al. 1982, Weiden et al. 1979). Nel corso degli anni, molti sforzi sono stati eseguiti per potenziare quest'effetto evitando il più possibile i potenziali eventi avversi del trapianto, come la malattia del trapianto contro l'ospite (Graft versus Host Disease, GVHD), il rigetto, la ricaduta della neoplasia di base e le infezioni.

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche convenzionale richiede un regime chemioterapico ad alta intensità di condizionamento. L'associata tossicità ha limitato storicamente tale terapia a pazienti giovani e in buone condizioni generali. Allo scopo di estendere la terapia anche ai pazienti non fit o

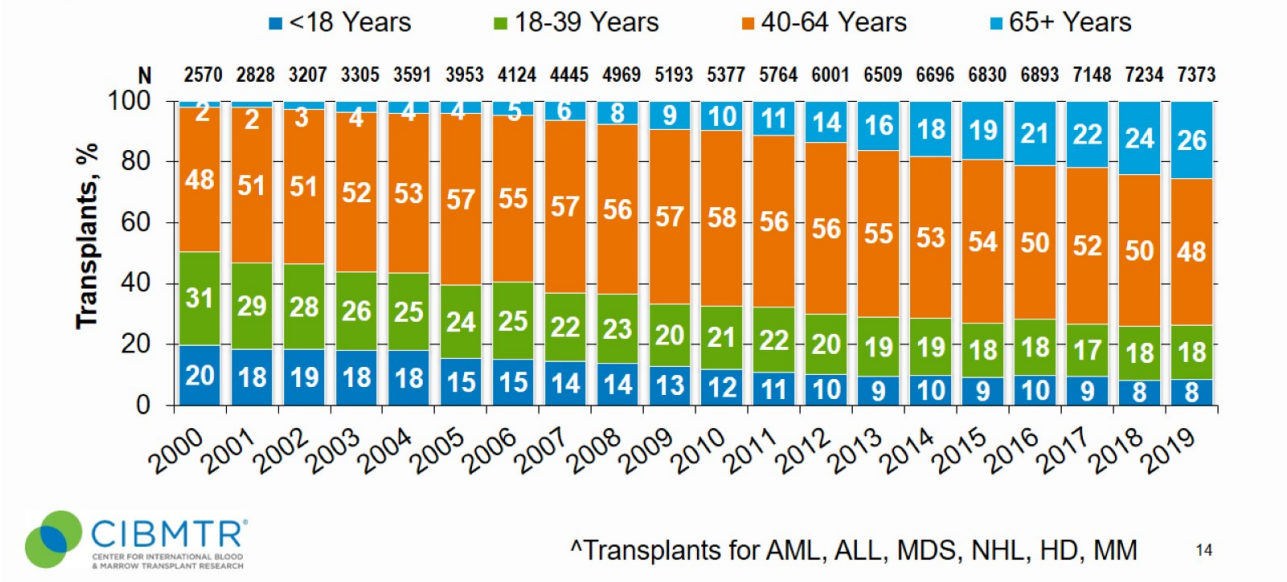
anziani, che rappresentano la maggior parte dei pazienti ematologici, sono stati sviluppati schemi di chemioterapia meno intensivi. I regimi di condizionamento a ridotta intensità (Reduced Intensity Chemotherapy, RIC) sono meglio tollerati, ma associati a un maggior rischio di ricaduta.

I pazienti sottoposti a trapianto allogenico possono andare incontro ad una serie di complicanze a breve e a lungo termine, in grado di alterare sia la durata sia la qualità di vita dei pazienti. La GVHD acuta rimane la principale causa di mortalità a breve termine dopo il trapianto allogenico. Si sviluppa in circa il 40% dei pazienti, ma con un'incidenza che può variare considerevolmente, a seconda delle caratteristiche del donatore e della profilassi utilizzata. La GVHD cronica è invece la principale causa di morbidità e mortalità a lungo temine dopo trapianto allogenico. La mortalità è legata prevalentemente ad eventi infettivi dovuti allo stato di immunodeficienza conseguente alla GVHD o al suo trattamento. Si manifesta con una incidenza molto variabile, tra il 30% e il 70% dei pazienti sottoposti a trapianto.

## Andamento del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche in relazione all'età del ricevente

Gran parte delle neoplasie ematologiche viene generalmente diagnosticata ad un'età mediana superiore ai 65 anni. L'utilizzo del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche in gruppi di età che in passato erano considerati non candidabili alla procedura continua ad aumentare significativamente. Dati derivanti dal CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) mostrano che il numero di trapianti allogenici per il trattamento di neoplasia ematologie è in incremento nei pazienti di età ≥ 65 anni. Nel 2019, negli Stati Uniti il 26% del totale dei riceventi un trapianto allogenico aveva un'età di almeno 65 anni (Figura 1).

Figura 1. Trend dei trapianti allogenici negli Stati Uniti in base all'età del ricevente




Anche in Europa, l'attività di trapianto nei pazienti anziani è incrementata notevolmente nelle ultime decadi. Dati derivanti dai centri EBMT (European Bone Marrow Transplantation) hanno mostrato che il numero di trapianti autologhi in pazienti di età ≥65 anni è aumentata dal 3.4% nel 2000 al 9.8% nel 2014 (Sanchez-Ortega et al. 2016). Allo stesso modo, i trapianti allogenici di cellule staminali

emopoietiche in soggetti di età ≥65 anni è incrementata da <1% nel 2000 al 6.7% nel 2014 (Basak et al. 2016). Recenti dati del GITMO (Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo) hanno mostrato anche in Italia una progressiva crescita del numero di pazienti trapiantati in età ≥60 anni, con incremento dal 9% nel 2010 al 26% nel 2020 (Malagola et al. 2021).

Questa tendenza rappresenta la risposta ad una crescente necessità clinica, legata al globale invecchiamento della popolazione e al miglioramento delle condizioni di salute generali dei soggetti anziani, che sempre più si presentano in condizioni adeguate per il trapianto. Il miglioramento nelle terapie di supporto, nelle tecniche di mobilizzazione e raccolta delle cellule staminali emopoietiche, l'ottimizzazione dei regimi di condizionamento, con l'introduzione di regimi a ridotta intensità, hanno contribuito all'aumento dei tassi di trapianti in età avanzata.

## Outcome del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche nei pazienti anziani

I pazienti anziani tendono ad avere maggiore incidenza di morbidità e mortalità trapianto-relata, a causa dell'elevata prevalenza di comorbidità che alterano lo stato di salute generale e di performance. Inoltre, i pazienti in età più avanzata si presentano spesso con neoplasie ematologiche dalle caratteristiche citogenetiche e molecolari più avverse e sono stati generalmente trattati, prima del trapianto, con regimi di terapia meno aggressivi; ciò è associato ad aumentato rischio di ricaduta.

L'analisi dell'andamento del trapianto in tale popolazione è stata storicamente limitata dal fatto che i pazienti anziani sono poco rappresentati nei trial clinici, pertanto la maggior parte dei dati deriva da piccole serie o analisi di sottogruppi. Più recentemente, gli outcome trapiantologici dei pazienti anziani sono stati analizzati nello specifico in popolazioni selezionate a tale scopo (Chihara et al. 2014, Martínez et al. 2017). Non sono tuttavia disponibili dati provenienti da studi prospettici.

La maggiore esperienza riguardante gli outcome trapiantologici nei pazienti anziani, riportata ad oggi, deriva da due studi dell'EBMT, includenti un totale di 21390 trapianti autologhi e 6046 trapianti allogenici in pazienti di età ≥65 anni, trapiantati tra il 2000 e il 2014 (Basak et al. 2016; Sánchez-Ortega et al. 2016). La Tabella 1 mostra i dati riportati da tali studi.

Tabella 1. Outcome trapiantologici nei pazienti anziani, da dati EBMT.

| Tipo di trapianto e outcome | Tutti i pazienti ≥65 anni | Pazienti tra 65 e 69 anni | Pazienti ≥70 anni |
|---|---|---|---|
| AUTOLOGO | 21930 | 17531 | 3859 |
| - NRM ad 1 anno | 4.9% | 4.6% | 5.9% |
| - OS ad 1 anno | 87% | 88% | 83% |
| - OS a 3 anni | 67% | 69% | 61% |
| ALLOGENICO | 6046 | 4914 | 1132 |
| - NRM ad 1 anno | 27% | 26% | 29% |
| - OS ad 1 anno | 57% | 57% | 53% |
| - OS a 3 anni | 39% | 40% | 35% |

Questi report confermano la fattibilità del trapianto autologo e allogenico nei pazienti anziani, con dati accettabili di Non Relapse Mortality (NRM) e di Overall Survival (OS) ad 1 anno e a 3 anni. Le analisi multivariate in entrambi gli studi hanno mostrato che il performance status, secondo il Karnofsky score, fornisce un impatto indipendente sull'outcome del paziente maggiore dell'età cronologica. Pertanto, questi dati derivanti da una grossa coorte di pazienti anziani indicano che l'età da sola non può essere un criterio di esclusione per considerare il trapianto in questa popolazione. Da ciò, diventa indispensabile valutare attentamente le comorbidità e la fragilità del paziente candidato a trapianto in età avanzata, indipendentemente dalla sua età, per migliorare ulteriormente gli outcome. La Non Relapse Mortality è definita come la mortalità senza ricaduta o progressione della patologia di base dopo un trapianto di cellule staminali. Questo parametro è legato a quattro diversi ordini di complicanze: patologie infettive opportunistiche dovute allo stato di immunodepressione derivante dalla terapia immunosoppressiva, patologie infettive indipendenti dalla terapia immunosoppressiva, tossicità d'organo secondarie alla intensità della chemioterapia di condizionamento, complicanze immunologiche, in particolare la GVHD (Tanaka et al. 2016).

Lo studio retrospettivo di registro del GITMO (Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo) ha fornito i più recenti dati di outcome di 1996 pazienti di età $\geq$ 60 anni sottoposti a trapianto allogenico presso 30 centri in Italia, tra il 2000 e il 2017 (Malagola et al. 2021). I pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi, in base all'anno del trapianto: gruppo A (256 pazienti, trapiantati tra 2000 e 2005), gruppo B (584 pazienti, trapiantati tra 2006 e 2011), gruppo C (1156 pazienti, trapiantati tra 2012 e 2017).
In tabella 2 sono riportati i dati di outcome della popolazione totale e dei tre gruppi (Malagola et al. 2021).
Complessivamente tali dati confermano i precedenti risconti, supportando l'utilizzo del trapianto allogenico nei pazienti in età avanzata, e mostrano il miglioramento continuo degli outcome nel corso del tempo.

Tabella 2. Outcome trapiantologici nei pazienti anziani, da dati GITMO.

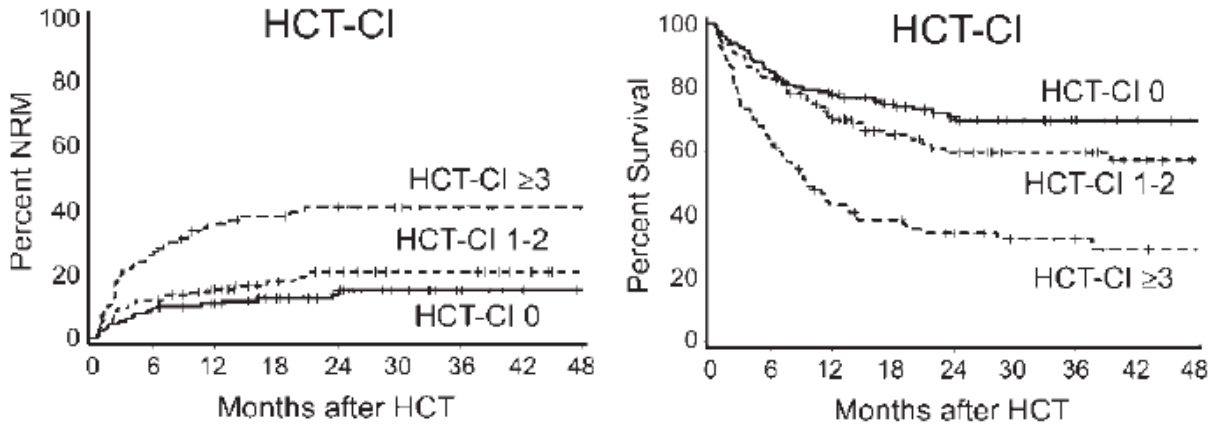
| Outcome | Popolazione totale (1996 pazienti) | A (256 pazienti, 2000-2005) | B (584 pazienti, 2006-2011) | C (1156 pazienti, 2012-2017 |
|---|---|---|---|---|
| - NRM ad 1 anno | 26.3% | - | - | - |
| - NRM a 2 anni | 30.6% | - | - | - |
| - NRM a 5 anni | 35.2% | 32.8% | 36.2% | 35% |
| - OS ad 1 anno | 57.4% | - | - | - |
| - OS a 2 anni | 46.1% | - | - | - |
| - OS a 5 anni | 34.5% | 28.4% | 31.8% | 37.3% |

## Valutazione di un paziente candidato a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche

La valutazione delle comorbidità è essenziale in ogni paziente prima di consideralo candidabile per una procedura trapiantologica, specialmente nei soggetti più anziani.

L'indice di comorbidità sviluppato da Sorror, Hematopoietic Cell Trasplantation - Comorbidity Index (HCT-CI), è lo score maggiormente utilizzato e ampiamente validato per valutare il paziente prima del trapianto (Sorror et al. 2005). Includendo 17 variabili, lo score HCT-CI distingue tre gruppi di pazienti con diversa Non Relapse Mortality e sopravvivenza, diversi tra loro per l'impatto delle comorbidità considerate. Le curve di NRM e sopravvivenza dei tre gruppi sono mostrate in Figura 2.

Figura 2. Incidenza di Non Relapse Mortality e Overall Survival, stratificate mediante lo score HCT-CI

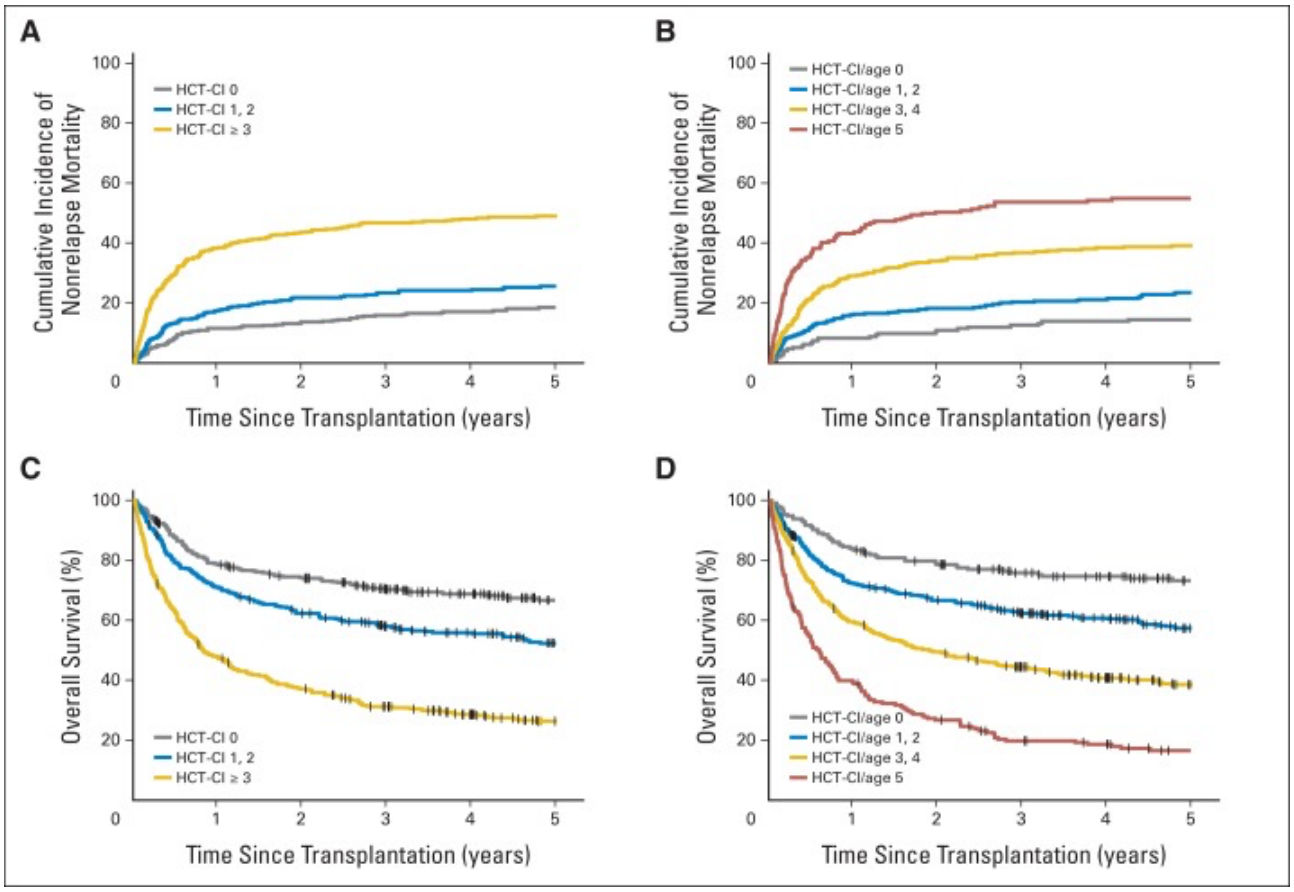



Lo score HCT-CI è stato più recentemente modificato dallo stesso autore per includere l'impatto dell'età sull'outcome, come variabile indipendente (Sorror et al. 2014). Il cosiddetto Comorbidity-Age index include un punto extra da aggiungere al HCT-CI score per i pazienti di età superiore ai 40 anni, definendo un modello con maggiore capacità predittiva sull'outcome in ciascun sottogruppo

(rischio basso, rischio intemedio, rischio alto). La Figura 3 mostra la differente stratificazione rispetto al HCT-CI.

Tali score forniscono chiare indicazioni sulla eventuale necessità di adeguare l'intensità della chemioterapia somministrata prima del trapianto allo scopo di ridurre il rischio di NRM.

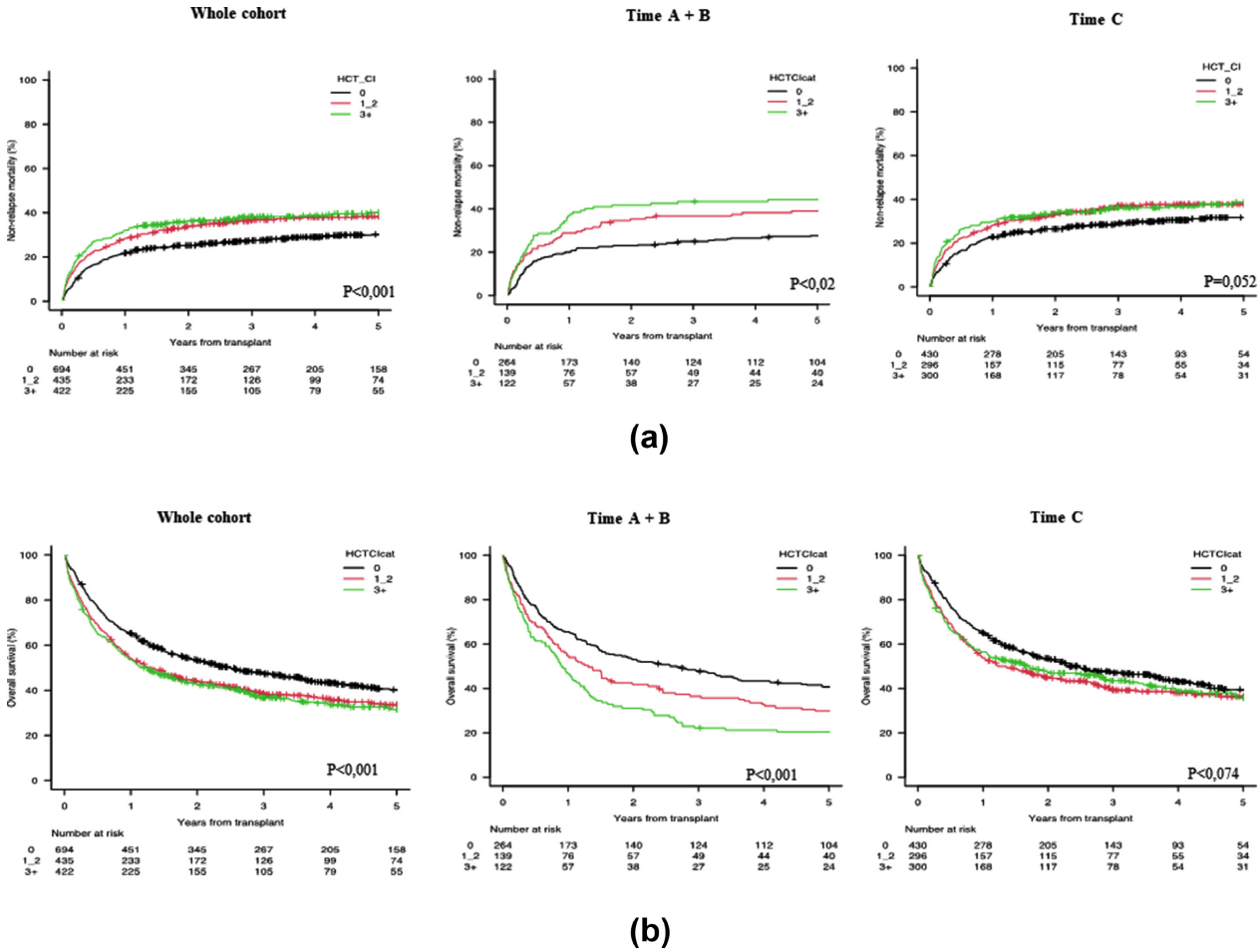
Figura 3. Incidenza cumulativa di Non Relapse Mortality (B) e Overall Survival (D) stratificate mediante lo score HCT-CI/age e confrontate con lo score HCT-CI (A e C).




L'impatto del HCT-CI score sulla Non relapse mortality e sulla sopravvivenza è stato di recente valutato nello studio di registro GITMO sui pazienti anziani. Come mostrato in Figura 4, considerando insieme i gruppi A e B (pazienti trapiantati dal 2000 al 2011), la NRM a 2 anni è significativamente correlata al HCT-CI score: 25.5% nei pazienti con score 0, 33.9% nei pazienti con score 1-2, 36.1% nei pazienti con score ≥3. Tuttavia, nel gruppo C (pazienti trapiantati dopo l'anno

2012) lo score perde il suo potere predittivo sulla NRM. Inoltre, lo score HCT-CI è significativamente correlato anche con la OS dell'intera coorte: 40.2% nei pazienti con score 0, 33.6% nei pazienti con score 1-2, 31.4% nei pazienti con score ≥3. Separando l'analisi nei 3 gruppi il potere predittivo del HCT-CI rimane nei gruppi A+B, mentre si perde nel gruppo C (Malagola et al., 2021).

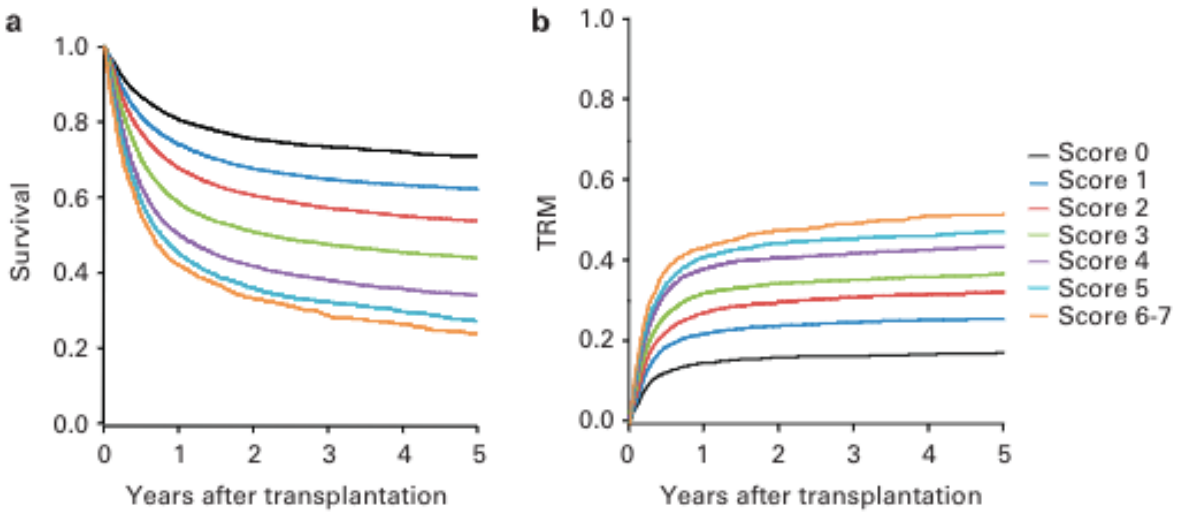
Figura 4. Non Relapse Mortality e Overall Survival rispetto allo score HCT-CI, da dati GITMO.




Lo score di rischio EBMT è un altro semplice strumento utilizzato per predire il rischio trapiantologico. Esso include cinque fattori: l'età del paziente, lo stadio della patologia di base, il tempo intercorso dalla diagnosi, il tipo di donatore e la combinazione di genere tra donatore e ricevente (Gratwohl et al. 1998, 2009, 2015). La sopravvivenza si riduce per i pazienti in età più

avanzata, trapiantati in fase più avanzata, dopo un lungo intervallo dalla diagnosi, all'aumentare dell'incompatibilità HLA con il donatore. I dati di sopravvivenza e Non Relapse Mortality sono mostrati in figura 5.

Figura 5. Overall Survival (a) e Non Relapse Mortality (b) stratificate mediante lo score EBMT.



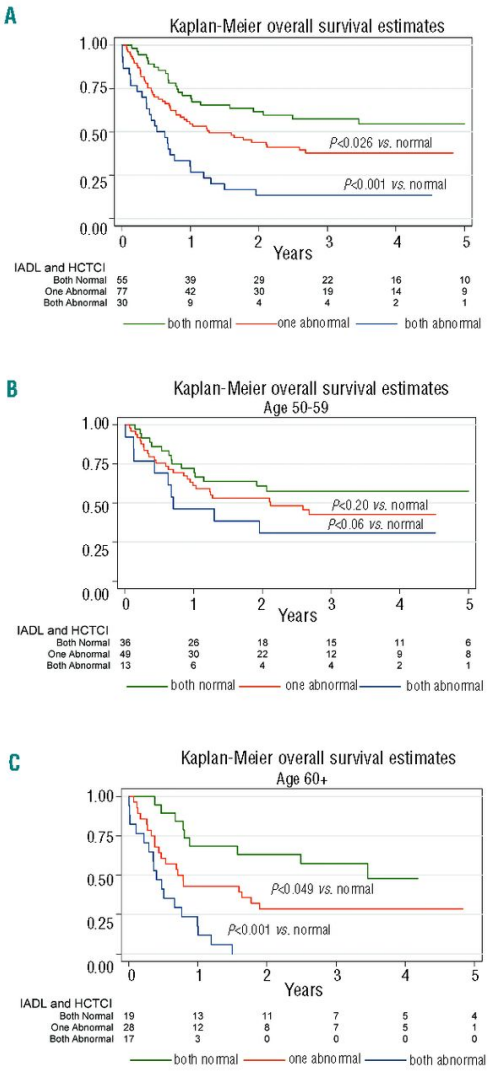

Nonostante la validazione di numerosi indici pre-trapiantologici, non esistono ancora scale geriatriche standard per valutare le condizioni fisiche e funzionali di un paziente anziano candidato a trapianto di cellule staminali.

L'unica scala geriatrica disegnata e validata per i pazienti con neoplasia ematologica è la GAH (Geriatric Assessment in Hematology), tuttavia non ancora validata nel setting trapiantologico (Bonanad et al. 2015). Un unico studio ha valutato specificamente in maniera prospettica la valutazione geriatrica in una coorte di 203 pazienti di età compresa tra i 50 e i 73 anni, un tempo considerata avanzata (Muffly et al. 2014). In questa casistica la valutazione geriatrica comprendeva la determinazione di: Performance Status mediante ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) (Oken et al, 1982), ADL (Activities of Daily Living) score di Katz (Katz et al. 1970), IADL (Instrumental Activities of Daily Living) score di Lawton (Lawton and Brody, 1969), questionario sulla qualità di vita SF36-PCS (Medical Outcomes Short Form 36-Physical Component Summary).

Tra queste valutazioni, la più significativa sull'outcome è risultata la scala IADL; quest'ultima è stata quindi integrata al HCT-CI di Sorror per definire uno score di semplice utilizzo nella pratica clnica per strtificare i pazienti a maggiore o minore rischio trapiantologico. Le curve di correlazione con la sopravvivenza, nel totale dei pazienti e nelle due coorti di età rispettivamente inferiore e superiore a 60 anni, sono mostrate i Figura 6.

La valutazione geriatrica pre-trapianto, integrata all'attenta identificazione delle comorbidità, offre pertanto un valore aggiunto dal punto di vista prognostico, in grado di favorire una appropriata selezione dei candidati al trapianto.

Figura 6. Overall Survival (OS) stratificata per rischio IADL e HCT-CI.



## La metilazione del DNA come biomarker di invecchiamento

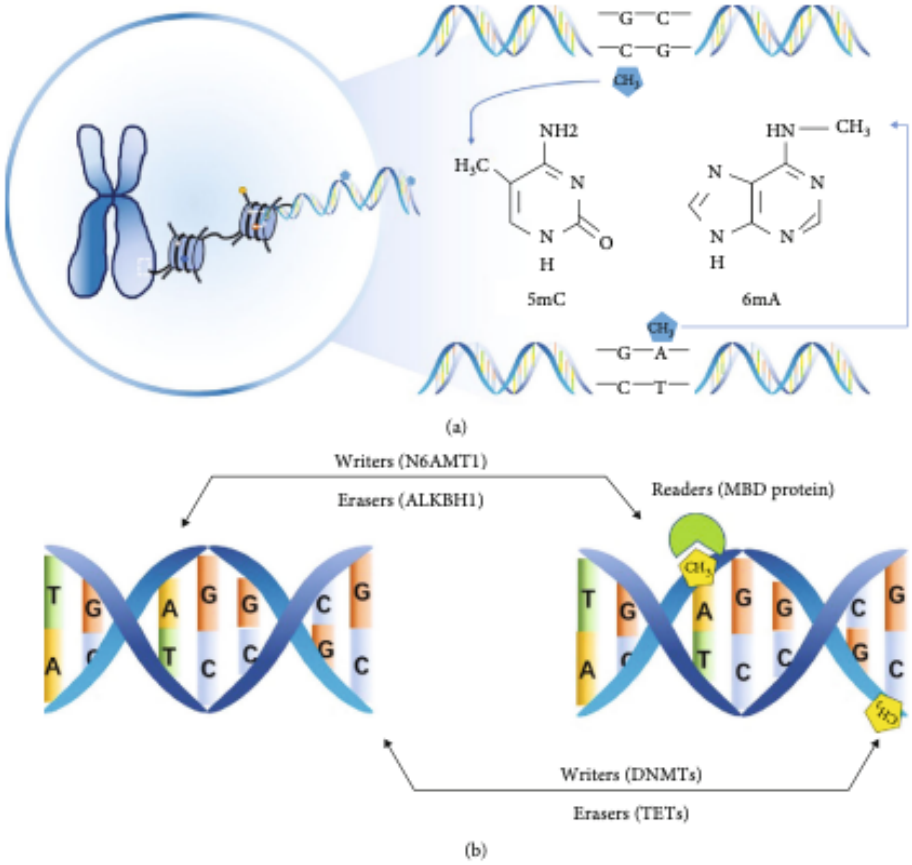
L'invecchiamento consiste nel processo di graduale declino degli organi e tessuti dell'organismo, associato ad aumento della suscettibilità a numerose condizioni patologiche non trasmissibili, tra cui le neoplasie, le patologie cardiovascolari, il diabete, i disordini neurodegenerativi (Kennedy et al 2014, Franceschi et al. 2018). Le patologie età-correlate possono essere considerate un'accelerazione del processo di invecchiamento, una deviazione dalla regolare traiettoria di declino di un individuo.
Numerosi sforzi scientifici sono stati fatti nel tentativo di elucidare i meccanismi coinvolti in questo processo e a tal proposito la ricerca biologica sull'invecchiamento ha focalizzato l'attenzione sulla valutazione della cosiddetta età biologica di un individuo. L'età biologica può essere definita mediante l'identificazione di biomarkers che, pur strettamente correlati all'età cronologica, consentano di esprimere la velocità di invecchiamento di un singolo individuo e, di conseguenza, siano in grado di evidenziare meglio i rischi per la salute età-relati, rispetto alla semplice età anagrafica.

Le modificazioni epigenetiche, in particolare la metilazione del DNA, si sono dimostrate essere cruciali come biomarkers di invecchiamento (Li et al. 2020, Gensous et al. 2017).
La metilazione del DNA è una variazione epigenetica del DNA (un cambio di struttura e funzione che non implica un cambiamento nella sequenza del DNA) in cui un gruppo metile (-CH3) va a legarsi ad una base azotata nella posizione 5 di una citosina (5mC, il tipo principale), oppure alla posizione 6 di una adenina. Nei mammiferi il DNA viene metilato principalmente a livello di alcune regioni ricche in dinucleotidi CpG, anche definite isole GpG, presenti preferenzialmente in regioni regolatorie e promotori di geni. La presenza del gruppo metile impedisce il legame di fattori di trascrizione e sopprime l'espressione genica (Dor and Cedar 2018, Smith and Meissner 2013, Xiao et al. 2018). Il trasferimento dei gruppi metile è mediato dalle DNA metil-transferasi (DNMTs). La

DNMT1 ha un ruolo di mantenimento della metilazione, mentre la metilazione ex novo avviene mediante DNMT3A e DNMT3B, da sole o in combinazione con DNMT3L (Lister et al 2009, Schubeler 2015).

La Figura 7 mostra i meccanismi di modulazione della metilazione del DNA.

Figura 7. Modulazione della metilazione del DNA. Da Jiang e Guo 2020. Nel DNA 5mC-metilato il sito di legame è la posizione 5 di una citosina, mentre nel DNA 6mA-metilato il sito di metilazione è la posizione 6 di una adenina. La metilazione avviene mediante dei enzimi "writers", come le DNMTs e N6AMT1. Le modificazioni vengono lette da proteine "readers", come MBD (metyl-CpG-binding domains). Gli enzimi "erasers", tra i quali TETs e ALKBH1, possono ossidare o rimuovere i gruppi metile.




Lo stato di metilazione del DNA è influenzato sia da fattori genetici sia da fattori ambientali (Jung e Pfeifer 2015).

Cambiamenti continui dello stato di metilazione del DNA, nello specifico la presenza di 5-methyl-cytosine (5mC), sono stati dimostrati essere adattativi rispetto all'età cronologica. Eventuali modificazioni inefficaci potrebbero alterare la velocità del processo di invecchiamento e avere un

impatto sulla funzione dell'individuo. Pertanto, lo studio dello stato di metilazione del DNA può essere utilizzato come un biomarker accurato per stimare l'età biologica, parametro in grado di definire i cambiamenti età-relati dell'organismo (Schubeler 2015, Day et al. 2013, Horvat 2013, Horvat 2015).

L'accuratezza della stima dipende dalla identificazione di specifici profili di metilazione del DNA età-relati, misurabili in specifiche regioni del genoma. Infatti, sono stati sviluppati dei cosiddetti "orologi epigenetici" basati sulla valutazione della metilazione del DNA a livello di specifici siti CpG, in grado di funzionare come biomarkers di età (Field et al. 2019, Bocklandt et al. 2011, Garagnani et al. 2012, Horvath 2013, Hannum et al. 2013).

Il primo orologio epigenetico in grado di predire l'età cronologica fu ideato da Bocklandt utilizzando 88 sequenze CpG da DNA estratto da saliva (Bocklandt et al. 2011). Successivamente vennero sviluppati orologi epigenetici a validità multi-tissutale. L'orologio di Horvath, che consiste di 353 siti CpG, è stato il primo validato su oltre 8000 campioni di diversi tipi cellulari e tissutali, come markers molto accurato di età cronologica (correlazione di 0.96 e un errore mediano di 3.6 anni) (Horvath 2013). Altri orologi hanno mostrato simile accuratezza nella predizione dell'età biologica e nella applicabilità, come l'orologio di Hannum, l'orologio di Zhang e numerosi altri (Hannum et al. 2013, Zhang et al. 2017). Essi hanno mostrato anche potere nel predire il rischio di patologie età-relate e di mortalità. A seguire si sono sviluppati modelli di predizione di età biologica, basati sulla combinazione di parametri di diverso tipo, come ad esempio il cosiddetto PhenoAge (Levine et al 2018). Horvath ha anche dimostrato che l'età di metilazione delle cellule di embrione è vicina allo zero, e aumenta progressivamente con le divisioni cellulari, indicando che l'età indicata dallo stato di metilazione del DNA è assimilabile all'età biologica a livello cellulare (Horvath 2013).

L'accelerazione dell'età di metilazione del DNA è stata definita come la differenza tra l'età di metilazione del DNA e l'età cronologica, ed è stata associata a numerose patologie correlate

all'invecchiamento. Per di più, gli individui con sindromi progeriche (come la sindrome di Werner e la sindrome di Down) presentano un assetto accelerato degli orologi di metilazione (Maierhofer et al. 2017, Horvath et al. 2015). Al contrario, i centenari e i loro discendenti presentano una età di metilazione inferiore rispetto all'età anagrafica (Horvath et al. 2015).

Crescenti evidenze mostrano infine che la metilazione del DNA è associata a condizioni patologiche legate all'invecchiamento. Patologie cardiovascolari, neoplasie, patologie neurodegenerative e condizioni infiammatorie sono state associate alla presenza di alterazioni nello stato di metilazione del DNA. Una recente review sistematica ha analizzato 156 studi e ha identificato una forte associazione tra l'accelerazione dell'orologio epigenetico con la mortalità dell'individuo, oltre che con specifiche condizioni cliniche e sociali (Oblak et al. 2020).

## La metilazione del DNA e il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche

Pochi studi, fino ad oggi, hanno valutato lo stato di metilazione del DNA delle cellule staminali emopoietiche nell'ambito del trapianto allogenico. Nel trapianto le cellule emopoietiche del ricevente vengono eradicate e rimpiazzate da cellule staminali sane da un donatore, che vengono quindi esposte al microambiente midollare del ricevente per numerosi anni.

Un primo studio di Weiden ha analizzato l'età epigenetica in campioni di sangue prima e a distanza di un anno dal trapianto, in coppie ricevente-donatore con elevata differenza di età. Sorprendentemente l'età epigenetica a 1 anno dal trapianto è risultata correlata all'età del donatore, supportando l'ipotesi che l'età di metilazione delle cellule trapiantate dipende solo dal donatore e non dal microambiente midollare del ricevente. Questo studio ha analizzato solo un piccolo numero di CpG (Weiden et al. 2015). L'orologio epigenetico di Horvath è stato utilizzato in un successivo studio di Stolzel, il quale ha confermato la correlazione dell'età epigenetica con l'età originale del donatore, più che con il microambiente del ricevente. Gli autori hanno osservato una iniziale forte decelerazione dell'età di metilazione del DNA (definita "ringiovanimento") entro i primi 6 mesi dal trapianto e poi una successiva accelerazione di 2.4 anni per ciascun anno di età cronologica. Questo studio ha riportato una correlazione significativa tra una accelerazione dell'età di metilazione e la comparsa di GVHD cronica (Stolzel et al. 2017).

Il più recente trial disegnato a tale scopo ha dimostrato che l'età di metilazione delle cellule emopoietiche del donatore reinfuse, valutata mediante il modello dell'orologio epigenetico di Horvath, non è influenzata dal microambiente midollare del ricevente, sia esso più giovane o più anziano, e che l'età di metilazione di tali cellule continua ad aumentare dopo il trapianto nel corpo del ricevente, proprio come se fossero ancora in quello del donatore. L'autore pertanto conclude che l'età epigenetica è una proprietà intrinseca alla cellula ematopoietica, che continua la sua progressione indipendentemente dalle altre cellule del corpo (Soraas et al. 2018).

# Materiali, metodi e disegno dello studio

Il presente studio ha l'obiettivo di valutare l'applicabilità di marcatori innovativi di invecchiamento in ematologia. In particolare, valuta lo studio della metilazione del DNA, come marcatore di età biologica, nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche per qualsiasi indicazione ematologica.

L'obiettivo primario dello studio era la valutazione dello stato di metilazione del DNA in campioni di sangue prelevati da pazienti sottoposti a trapianto allogenico e in campioni dei loro rispettivi donatori. L'obiettivo secondario era di correlare l'età epigenetica (valutata mediante la metilazione del DNA) con indici di comorbidità pre-trapianto e con gli outcome clinici dei pazienti (sopravvivenza globale, Graft versus Host Disease, incidenza di infezioni).

Per ciascun paziente arruolato sono stati raccolti campioni di sangue periferico in time-point predefiniti: prima del trapianto all'ingresso in reparto e al giorno -1; dopo il trapianto al giorno +30, e successivamente a +3, +6, +9, e +12 mesi dal trapianto. Sono stati raccolti anche campioni di sangue periferico dei rispettivi donatori di cellule staminali emopoietiche al momento della donazione.

Ciascun campione di sangue periferico è stato prelevato mediante vacutainer in provetta con EDTA (10 ml) e processato per la separazione di cellule mononucleate, da cui è stato estratto il DNA per l'analisi epigenetica.

## Valutazione dell'età di metilazione del DNA e dell'accelerazione dell'età epigenetica

Il DNA genomico è stato estratto da 250 microlitri di sangue intero, utilizzando il QIAamp 96 DNA Blood Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). La quantificazione del DNA è stata eseguita utilizzando il

Quant-iTTM dsDNA Assay Kit, secondo le istruzioni di fabbrica. Cinquecento nanogrammi di DNA sono stati trattati con bisulfito usando il kit EZ DNA Methylation kit (ZymoResearch).

Per valutare l'età epigenetica, è stato utilizzato un modello locus-specifico basato sull'analisi di metilazione mediante piattaforma EpiTYPER.

Tale modello è stato messo a punto in precedenza dal nostro gruppo e testato su campioni di soggetti apparentemente sani di diverse età anagrafiche (tra 0-98 anni), oltre che su soggetti con sindrome di Down, centenari e loro discendenti. I siti CpG rilevanti sono stati scelti sulla base di una attenta valutazione della letteratura, sulla correlazione tra i loro livelli di metilazione e l'età cronologica, sulla loro associazione con condizioni età-relate.

I siti CpG che compongono il modello locus-specifico per la predizione dell'età epigenetica sono descritti in Tabella 3, che riporta anche la loro localizzazione nel genoma e i rispettivi primers usati per la loro amplificazione.

Tabella 3. Lista e caratteristiche dei geni analizzati

| Amplicon ID | Forward primer | Reverse primer | Genomic Localization |
|---|---|---|---|
| **ELOVL2** | AGGAAGAGAGGTAAATTTGTAGGAATAGAG TTATTTTTTT | CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGC TCCCCTCTCCCACAAAAACC | chr6:11,044,680-11,045,053 |
| **NHLRC1** | TTGAGTTTAGGAGTTTTATGAGGTG | AACAAAAAACAATCCTATTATCCTCA | chr6:18,122,552-18,123,149 |
| **SIRT7 / MAFG** | GAGGGAGGTAGTAGGGATAATATGG | CTTTAACCAAAACCAAATCTCTCAA | chr17:79,877,158-79,877,497 |
| **AIM2** | AAAATTTGGTTGATTGTTGATTTTT | CAATACAAATTCTTATCTTCAAAACA | chr1:159,046,884-159,047,270 |
| **EDARADD** | TTTTTTGGTGATTAGGAGTTTTAGTG | CAAAATTTCAAAAAACAAACCAACT | chr1:236,557,384-236,557,805 |
| **TFAP2E** | TTATTATAATTGGAGTGTATGGAGTAGG | ACAAAAAAATTAAAAAATCCAACAC | chr1:36,038,876-36,039,325 |

ELOVL2 è un gene codificante per la Elongation of very long chain fatty acids protein 2, il cui stato di metilazione è stato in precedenza documentato come altamente correlato all'età nel sangue intero e nella maggior parte dei tessuti umani ed è considerato un robusto marker epigenetico di età (Bacalini et al. 2017; Cho et al. 2017; Florath et al. 2014; Garagnani et al. 2012; Spólnicka et al. 2018; Correia Dias et al. 2019; Zbieć-Piekarska et al. 2015; Luo et al. 2019). L'ipermetilazione di ELOVL2 nel sangue è stata anche associata a potenziale sviluppo di neoplasia mammaria (Durso et al. 2017) e il sito CpG cg16867657 è stato recentemente incluso in un nuovo predittore della lunghezza del telomero basato sulla metilazione del DNA (Lu, Seeboth, et al. 2019).

Il sito CpG cg22736354, associato al gene NHLRC1 (NHL Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1), è incluso in diversi orologi epigenetici pubblicati: l'orologio di Horvath (Horvath 2013), l'orologio di Hannum (Hannum et al. 2013), l'orologio di Levine (Levine et al. 2018) e il nuovo orologio Skin & Blood di Horvath (Horvath, Oshima, et al. 2018); inoltre, il gene NHLRC1 è stato recentemente incluso in un predittore dell'età forense basato sulla metilazione del DNA (Vidaki et al. 2017).

Inoltre, è stato inclusa la valutazione della metilazione del gene SIRT7 (sirtuin 7), considerando il ruolo cruciale delle sirtuine nella senescenza nelle cellule umane (Paredes et al. 2018). Due siti CpG (cg07855221 e cg09253473), associati a SIRT7 e MAFG (MAF BZIP Transcription Factor), sono stati considerati rilevanti e inclusi tra i nostri loci analizzati. Una ipometilazione correlata all'età di SIRT7 è stata trovata anche in fegati dei topi, con un impatto protettivo della restrizione dietetica sui pattern di metilazione (Hahn et al. 2017).

Si è deciso anche di includere nel nostro modello il sito CpG cg10636246, associato al gene AIM2 (Absent in Melanoma 2), che codifica per una proteina indotta dall'interferone gamma implicata nella risposta immunitaria innata. La metilazione del DNA in questo specifico sito CpG è stata associata ai livelli sierici di proteina C reattiva in una metanalisi di studi di associazione su intero epigenoma (Ligthart et al. 2016) ed è anche incluso nell'orologio di Levine (Levine et al. 2018).

Il sito CpG cg09809672, del gene EDARADD (EDAR Associated Death Domain) è incluso in molti dei diversi biomarcatori epigenetici di invecchiamento pubblicati finora (Bocklandt et al. 2011; Horvath 2013; Hannum et al. 2013; Levine et al. 2018; Horvath, Oshima, et al. 2018). EDARADD è stato anche recentemente incluso in un pannello di geni per la predizione dell'età ad uso forense (Correia Dias et al. 2019).

Infine, è stato incluso il sito CpG cg26372517, associato al gene TFAP2E (Transcription Factor AP-2 Epsilon), che codifica per una proteina che agisce come fattore di trascrizione. Questo sito CpG è incluso nell'orologio di Horvath (Horvath 2013) ed è stato trovato metilato in modo differenziale nei nostri set di dati Illumina® Infinium 450K applicati a soggetti centenari e la loro progenie. In questi soggetti è stato dimostrato in precedenza un fenomeno di rallentamento dell'invecchiamento epigenetico (Horvath et al. 2015).

Le 6 regioni genomiche sopra descritte sono state analizzate per la metilazione del DNA mediante il sistema Agena Bioscience EpiTYPER® system (San Diego, CA, USA; in precedenza noto come Sequenom). Il disegno dei primer per amplificare le regioni target è stato eseguito mediante il software Agena Bioscience EpiDesigner® (http://epidesigner.com/), ottimizzato specificamente per il sistema EpiTYPER®.

L'analisi di metilazione del DNA locus-specifica è stata eseguita in accordo con le istruzioni di fabbrica. Dieci nanogrammi di DNA genomico da sangue intero convertito con bisolfito sono stati amplificati utilizzando i primer bisolfito-specifici, in un volume totale di 5 µL utilizzando una piastra a 384 pozzetti. I nucleotidi e i primer non incorporati sono stati quindi rimossi con trattamento mediante Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) ed è stata eseguito clivaggio mediante la trascrittasi inversa/RNasiA. Infine, a ciascun campione sono stati aggiunti 20 µL di ddH2O priva di RNasi e 6 mg di Clean Resin per eliminare i sali di sodio e potassio che avrebbero potuto interferire con le analisi. La distribuzione del campione su uno SpectroCHIP è stata eseguita mediante il Nanodispenser e l'acquisizione finale è stata effettuata con lo spettrometro di massa. I dati di

metilazione sono stati ottenuti utilizzando il software di analisi EpiTYPER®, espressi come valori continui compresi tra 0 e 1 (corrispondenti rispettivamente a 0 e 100% di metilazione).
Per ciascuna regione target, il sistema Agena EpiTYPER® restituisce i dati di metilazione del DNA (espressi come valori β) di un numero specifico numero di unità CpG (cioè regioni contenenti uno o più siti CpG) che sono stati inclusi nel modello predittivo. La distribuzione di CpG analizzate per ciascun gene mediante il sistema Agena EpiTYPER® è stato il seguente: 15 loci CPG per ELOV2, 21 loci CpG per NHLRC1, 6 loci CpG per MAFG/SIRT7, 7 loci CpG per AIM2, 5 CpG loci per EDARADD e 19 CpG loci per TFAP2E.

Per la costruzione del modello e per la predizione dell'età epigenetica dei campioni si è proceduto come segue. Il primo passo consiste nella determinazione dei valori mancanti (riportati come NA dal sistema Agena EpiTYPER®), utilizzando il Pacchetto R MICE (Multivariate Imputation by Chained Equations -Imputazione multivariata mediante equazioni concatenate-) (Buuren & Groothuis-Oudshoorn 2011). In secondo luogo, i valori β di metilazione sono stati convertiti in valori M attraverso una trasformazione logistica inclusa nel pacchetto Bioconductor *lumi* (Du et al. 2008). Il modello di predizione dell'età è stato quindi sviluppato utilizzando un modello di "ridge regression" (Classification and Regression Training) (Kuhn 2008), sui dati di metilazione ottenuti in un gruppo di 277 soggetti di controllo di età compresa tra i 20 e gli 80 anni (che corrisponde alla fascia di età in cui l'età cronologica e l'età epigenetica mostrano una relazione lineare secondo l'orologio di Horvath). Il risultato fornito dal modello è un'età epigenetica predetta, espressa in anni. Il modello così ottenuto è stato applicato all'intera popolazione (controlli, pazienti e donatori) per predire l'età epigenetica. Infine, si è definita una misura dell'accelerazione dell'età epigenetica (denominata Epigenetic Age Acceleration) che viene calcolata come il residuo della regressione tra l'età epigenetica e l'età cronologica nei controlli, al fine di correggere per una possibile dipendenza dell'età epigenetica stimata dall'età cronologica. Un risultato positivo indica un'accelerazione dell'età epigenetica, mentre valori negativi indicano una decelerazione dell'età epigenetica. Ai fini di questo calcolo, per i

campioni raccolti dopo il trapianto è stata utilizzata l'età cronologica del donatore e non quella del ricevente.

### Grading della GVHD

La diagnosi e il grading della GVHD acuta sono stati definiti secondo i criteri standard (Przepiorka D et al. 1995). La GVHD cronica è stata classificata secondo i criteri del NIH (Jagasia et al 2015, Filipovich AH et al. 2015).

### Analisi statistica

La sopravvivenza globale (Overall Survival, OS) è definita come il tempo dal trapianto allogenico alla morte, indipendentemente dalla causa. La sopravvivenza libera da progressione (Progression free survival, PFS) è considerata come la sopravvivenza in assenza di evidenza di ricaduta o progressione. La ricaduta è definita come la ricomparsa della malattia di base secondo i criteri specifici per ciascuna patologia. La morte per qualsiasi causa è stata considerata un evento per la OS, mentre sia la ricaduta sia la morte da qualsiasi causa sono stati considerati eventi per la PFS.

OS, PFS sono state calcolate usando il metodo di Kaplan-Meier. Il metodo dell'incidenza cumulativa è stato applicato per calcolare l'incidenza di NRM e GVHD (acuta e cronica) in un setting di rischio competitivo. La NRM è definita come la morte senza evidenza di ricaduta o progressione, con la ricaduta come evento competitivo. L'incidenza cumulativa di GVHD acuta e di GVHD cronica (entrambe di qualsiasi severità) è stata stimata considerando il tipo corrispondente di GVHD come evento di interesse, la morte in assenza di GVHD come rischio competitivo, con la ricaduta della patologia di base trattata come rischio competitivo nel caso occorresse senza precedente GVHD.

La differenza nella distribuzione di fattori ordinali o numerici è stata definita con il test delle mediane di Kruskal-Wallis o con l'analisi di Pearson, come appropriato.

Le analisi sono state eseguite usando il software SPSS 25.0 (IBM Company).

### Trattamenti concomitanti e dati clinici

I pazienti inclusi nell'analisi hanno ricevuto chemio/radioterapia di condizionamento al trapianto allogenico secondo la pratica clinica corrente. Sono state raccolte per ciascun paziente le principali variabili cliniche: tipo di malattia per cui si è proceduto al trapianto, fase di malattia, tipo di donatore, sesso del ricevente e del donatore, età del ricevente e del donatore, compatibilità HLA, rischio trapiantologico valutato mediante HCT-Comorbidity Index e HCT-CI/Age index (Sorror 2005 e 2014), sierologia per citomegalovirus del ricevente e del donatore, tipo di chemio/radioterapia pre-trapianto, tipo di terapia immunosoppressiva, recupero emopoietico (giorno con neutrofili >0.5 x $10^9$/L e piastrine >20 x $10^9$/L), stato di malattia post trapianto, insorgenza di GVHD acuta e cronica, cause di morte.

# Risultati

Da Novembre 2018 a Settembre 2021 sono stati arruolati consecutivamente 133 pazienti, sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche nel loro regolare percorso di cura, e 100 donatori. Le caratteristiche della popolazione totale dei pazienti sono descritte rispettivamente in Tabella 4.

Di questi pazienti abbiamo ottenuto la valutazione dello stato di metilazione del DNA per una iniziale piccola coorte di 51 pazienti, le cui caratteristiche specifiche sono riportate in Tabella 5. I pazienti sono stati inclusi nello studio prospetticamente, in modo progressivo.
L'età mediana è stata di 59 anni, con range compreso tra 19 e 71 anni. Il 70.4% dei pazienti presentava età >40 anni. Il 62.8% dei pazienti veniva sottoposto al trapianto allogenico per la diagnosi di leucemia acuta. Il 68.8% dei pazienti si presentava al trapianto in fase di remissione completa. La maggior parte dei pazienti (64.7%) ha ricevuto un regime di condizionamento mieloablativo. Nell'80.4% dei casi la sorgente di cellule staminali per il trapianto allogenico è stata costituita da cellule da sangue periferico raccolte mediante aferesi.

Per questa coorte analizzata preliminarmente, sono di seguito riportati in Tabella 6 i dati dei donatori per quali è stato possibile eseguire analisi dello stato di metilazione del DNA.
I donatori presentano una mediana di età inferiore rispetto ai riceventi, pari a 32 anni (range 19-63 anni). Solo il 5.6% di essi si presentava con età >55 anni. Il 77.8% dei donatori era di sesso maschile. Nell'80.6% dei casi si trattava di un donatore non familiare identificato da registro internazionale, nel 11.1% dei casi da donatore familiare HLA-identico, nell'8.3% dei casi da familiare aploidentico.

Tabella 4. Caratteristiche dei pazienti della popolazione totale arruolata (N=133)

| | | |
|---|---|---|
| Età (anni, mediana) | 55 (18-71) | |
| Età > 40 anni | 99 | 74.4% |
| Età > 65 anni | 15 | 11.3% |
| Età > 70 anni | 2 | 1.5% |
| Genere | | |
| M | 84 | 63.2% |
| F | 49 | 36.8% |
| Diagnosi | | |
| LAM | 55 | 41.4% |
| LAL | 25 | 18.8% |
| LA a fenotipo misto | 3 | 2.3% |
| BPCDN | 2 | 1.5% |
| MDS | 10 | 7.5% |
| MF | 5 | 3.8% |
| MDS/MPN | 8 | 4.5% |
| LMC | 3 | 2.3% |
| LH | 8 | 6.0% |
| LNH | 8 | 6.0% |
| MM | 4 | 3.0% |
| AAS | 1 | 0.8% |
| LLC | 1 | 0.8% |
| Fase al trapianto | | |
| CR | 88 | 66.4% |
| non CR | 45 | 33.6% |
| Regime di condizionamento | | |
| MAC | 75 | 56.4% |
| RIC | 58 | 43.6% |
| Profilassi della GVHD | | |
| CNI-MTX-ATLG | 102 | 83.5% |
| CNI-MMF-ATLG | 10 | 7.5% |
| CNI-MMF-Cy | 11 | 8.3% |
| CNI-MTX-Cy | 1 | 0.8% |
| Tipo di donatore | | |
| Non familiare | 107 | 80.5% |
| Familiare HLA-identico | 13 | 9.8% |
| Familiare aploidentico | 12 | 9.0% |
| Non familiare da CB | 1 | 0.8% |
| Sorgente | | |
| BM | 15 | 11.3% |
| PBSC | 117 | 88.0% |
| CB | 1 | 0.8% |
| Matching HLA | | |
| 10/10 | 75 | 56.4% |
| 9/10 | 43 | 32.3% |
| 8/10 | 2 | 1.5% |
| Aploidentico | 12 | 9.0% |
| 4/6 CB | 1 | 0.8% |
| HCT-CI | | |
| 0 (rischio basso) | 56 | 44.8% |
| 1-2 (rischio intermedio) | 28 | 22.4% |
| ≥3 (rischio alto) | 41 | 32.8% |
| HCT-CI/age | | |
| 0 | 24 | 19.2% |
| 1-2 | 44 | 35.2% |
| 3-4 | 35 | 28.0% |
| ≥5 | 22 | 17.6% |

M, maschio; F, femmina; LAM, leucemia acuta mieloide; LAL, leucemia acuta linfoblastica; LA, leucemia acuta; BPCDN, neoplasia a cellule blastiche dendritiche plasmocitoidi; MDS, sindrome mielodisplastica; MF, mielofibrosi; MPN, neoplasia mieloproliferativa; LMC, leucemia mieloide cronica; LH, linfoma di Hodgkin; LNH, linfoma non Hodgkin; MM, mieloma multiplo; AAS, anemia aplastica severa; LLC, leucemia linfatica cronica; CR, remissione completa; MAC, condizionamento mieloablativo; RIC, condizionamento a intensità ridotta; GVHD, malattia del trapianto contro l'ospite; CNI, inibitore della calcineurina; MTX, metotrexate, ATLG, globulina anti-T linfocitaria; MMF, micofenolato mofetile; Cy, ciclofosfamide; CB, cordone ombelicale; BM, midollo osseo; PBSC, cellule staminali da sangue periferico; HLA, antigene leucocitario umano.

Tabella 5. Caratteristiche dei pazienti analizzati per lo stato di metilazione (N=51)

| | | |
|---|---|---|
| Età (anni, mediana) | 53 (19-71) | |
| Età > 40 anni | 38 | 70.4% |
| Età > 65 anni | 9 | 17.6% |
| Età > 70 anni | 2 | 3.9% |
| Genere | | |
| M | 33 | 64.7% |
| F | 18 | 35.3% |
| Diagnosi | | |
| LAM | 24 | 47.1% |
| LAL | 6 | 11.8% |
| LA a fenotipo misto | 2 | 3.9% |
| BPCDN | 0 | 0% |
| MDS | 2 | 3.9% |
| MF | 2 | 3.9% |
| MDS/MPN | 5 | 9.8% |
| LMC | 1 | 2.0% |
| LH | 3 | 5.9% |
| LNH | 3 | 5.9% |
| MM | 3 | 5.9% |
| AAS | 0 | 0% |
| LLC | 0 | 0% |
| Fase al trapianto | | |
| CR | 35 | 68.6% |
| non CR | 16 | 31.4% |
| Regime di condizionamento | | |
| MAC | 33 | 64.7% |
| RIC | 18 | 35.3% |
| Profilassi della GVHD | | |
| CNI-MTX-ATLG | 42 | 82.3% |
| CNI-MMF-ATLG | 4 | 7.8% |
| CNI-MMF-Cy | 5 | 9.8% |
| CNI-MTX-Cy | 0 | 0% |
| Tipo di donatore | | |
| Non familiare | 38 | 74.5% |
| Familiare HLA-identico | 7 | 13.7% |
| Familiare aploidentico | 5 | 9.8% |
| Non familiare da CB | 1 | 2.0% |
| Sorgente | | |
| BM | 9 | 17.6% |
| PBSC | 41 | 80.4% |
| CB | 1 | 2.0% |
| Matching HLA | | |
| 10/10 | 27 | 52.9% |
| 9/10 | 17 | 33.3% |
| 8/10 | 1 | 2.0% |
| Aploidentico | 5 | 9.8% |
| 4/6 CB | 1 | 2.0% |
| HCT-CI | | |
| 0 (rischio basso) | 29 | 56.9% |
| 1-2 (rischio intermedio) | 11 | 21.6% |
| ≥3 (rischio alto) | 11 | 21.5% |
| HCT-CI/age | | |
| 0 | 10 | 19.6% |
| 1-2 | 26 | 51.0% |
| 3-4 | 9 | 17.6% |
| ≥5 | 6 | 11.8% |

M, maschio; F, femmina; LAM, leucemia acuta mieloide; LAL, leucemia acuta linfoblastica; LA, leucemia acuta; BPCDN, neoplasia a cellule blastiche dendritiche plasmocitoidi; MDS, sindrome mielodisplastica; MF, mielofibrosi; MPN, neoplasia mieloproliferativa; LMC, leucemia mieloide cronica; LH, linfoma di Hodgkin; LNH, linfoma non Hodgkin; MM, mieloma multiplo; AAS, anemia aplastica severa; LLC, leucemia linfatica cronica; CR, remissione completa; MAC, condizionamento mieloablativo; RIC, condizionamento a intensità ridotta; GVHD, malattia del trapianto contro l'ospite; CNI, inibitore della calcineurina; MTX, metotrexate, ATLG, globulina anti-T linfocitaria; MMF, micofenolato mofetile; Cy, ciclofosfamide; CB, cordone ombelicale; BM, midollo osseo; PBSC, cellule staminali da sangue periferico; HLA, antigene leucocitario umano.

Tabella 6. Caratteristiche dei donatori della coorte in analisi (N= 36)

| | | |
|---|---|---|
| Età (anni, mediana) | 32 (19-63) | |
| Età > 35 anni | 11 | 30.6% |
| Età > 55 anni | 2 | 5.6% |
| Genere | | |
| M | 28 | 77.8% |
| F | 8 | 22.2% |
| Sorgente | | |
| BM | 6 | 16.7% |
| PBSC | 30 | 83.3% |
| Tipo di donatore | | |
| Non familiare | 29 | 80.6% |
| Familiare HLA-identico | 4 | 11.1% |
| Familiare aploidentico | 3 | 8.3% |

M, maschio; F, femmina; BM, midollo osseo; PBSC, staminali da sangue periferico; HLA, antigene leucocitario umano.

In prima analisi, abbiamo eseguito un test comparativo per confrontare la nostra prima coorte analizzata con il totale della popolazione di pazienti trapiantati nel corso del periodo in esame. La Tabella 7 evidenzia come la nostra coorte di 51 analizzati paziente risulti complessivamente rappresentativa della popolazione totale. Da segnalare tuttavia che, casualmente, i pazienti inclusi nel gruppo analizzato presentano un rischio trapiantologico complessivamente più basso rispetto alla popolazione, sia valutato mediante il HCT-CI score, sia mediante lo stesso score aggiustato per età (HCT-CI/age).

Tabella 7. Confronto della prima coorte di 51 pazienti con il totale dei pazienti trapiantati.

| | popolazione totale | | casi analizzati | | p value |
|---|---|---|---|---|---|
| Età (anni, mediana) | 55 (18-71) | | 53 (19-71) | | ns |
| Età > 40 anni | 99 | 74.4% | 38 | 70.4% | |
| Età > 65 anni | 15 | 11.3% | 9 | 17.6% | |
| Età > 70 anni | 2 | 1.5% | 2 | 3.9% | |
| Genere | | | | | ns |
| M | 84 | 63.2% | 33 | 64.7% | |
| F | 49 | 36.8% | 18 | 35.3% | |
| Diagnosi | | | | | ns |
| LAM | 55 | 41.4% | 24 | 47.1% | |
| LAL | 25 | 18.8% | 6 | 11.8% | |
| LA a fenotipo misto | 3 | 2.3% | 2 | 3.9% | |
| BPCDN | 2 | 1.5% | 0 | 0% | |
| MDS | 10 | 7.5% | 2 | 3.9% | |
| MF | 5 | 3.8% | 2 | 3.9% | |
| MDS/MPN | 8 | 4.5% | 5 | 9.8% | |
| LMC | 3 | 2.3% | 1 | 2.0% | |
| LH | 8 | 6.0% | 3 | 5.9% | |
| LNH | 8 | 6.0% | 3 | 5.9% | |
| MM | 4 | 3.0% | 3 | 5.9% | |
| AAS | 1 | 0.8% | 0 | 0% | |
| LLC | 1 | 0.8% | 0 | 0% | |
| Fase al trapianto | | | | | ns |
| CR | 88 | 66.4% | 35 | 68.6% | |
| non CR | 45 | 33.6% | 16 | 31.4% | |
| Regime di condizionamento | | | | | 0.15 |
| MAC | 75 | 56.4% | 33 | 64.7% | |
| RIC | 58 | 43.6% | 18 | 35.3% | |
| Profilassi della GVHD | | | | | ns |
| CNI-MTX-ATLG | 102 | 83.5% | 42 | 82.3% | |
| CNI-MMF-ATLG | 10 | 7.5% | 4 | 7.8% | |
| CNI-MMF-Cy | 11 | 8.3% | 5 | 9.8% | |
| CNI-MTX-Cy | 1 | 0.8% | 0 | 0% | |
| Tipo di donatore | | | | | ns |
| Non familiare | 107 | 80.5% | 38 | 74.5% | |
| Familiare HLA-identico | 13 | 9.8% | 7 | 13.7% | |
| Familiare aploidentico | 12 | 9.0% | 5 | 9.8% | |
| Non familiare da CB | 1 | 0.8% | 1 | 2.0% | |
| Sorgente | | | | | 0.07 |
| BM | 15 | 11.3% | 9 | 17.6% | |
| PBSC | 117 | 88.0% | 41 | 80.4% | |
| CB | 1 | 0.8% | 1 | 2.0% | |
| Matching HLA | | | | | ns |
| 10/10 | 75 | 56.4% | 27 | 52.9% | |
| 9/10 | 43 | 32.3% | 17 | 33.3% | |
| 8/10 | 2 | 1.5% | 1 | 2.0% | |
| Aploidentico | 12 | 9.0% | 5 | 9.8% | |
| 4/6 CB | 1 | 0.8% | 1 | 2.0% | |
| HCT-CI | | | | | 0.009 |
| 0 (rischio basso) | 56 | 44.8% | 29 | 56.9% | |
| 1-2 (rischio intermedio) | 28 | 22.4% | 11 | 21.6% | |
| ≥3 (rischio alto) | 41 | 32.8% | 11 | 21.5% | |
| HCT-CI/age | | | | | |
| 0 | 24 | 19.2% | 10 | 19.6% | 0.005 |
| 1-2 | 44 | 35.2% | 26 | 51.0% | |
| 3-4 | 35 | 28.0% | 9 | 17.6% | |
| ≥5 | 22 | 17.6% | 6 | 11.8% | |

M, maschio; F, femmina; LAM, leucemia acuta mieloide; LAL, leucemia acuta linfoblastica; LA, leucemia acuta; BPCDN, neoplasia a cellule blastiche dendritiche plasmocitoidi; MDS, sindrome mielodisplastica; MF, mielofibrosi; MPN, neoplasia mieloproliferativa; LMC, leucemia mieloide cronica; LH, linfoma di Hodgkin; LNH, linfoma non Hodgkin; MM, mieloma multiplo; AAS, anemia aplastica severa; LLC, leucemia linfatica cronica; CR, remissione completa; MAC, condizionamento mieloablativo; RIC, condizionamento a intensità ridotta; GVHD, malattia del trapianto contro l'ospite; CNI, inibitore della calcineurina; MTX, metotrexate, ATLG, globulina anti-T linfocitaria; MMF, micofenolato mofetile; Cy, ciclofosfamide; CB, cordone ombelicale; BM, midollo osseo; PBSC, cellule staminali da sangue periferico; HLA, antigene leucocitario umano.

## OS, PFS, NRM

Il rate di OS a 1 e 3 anni è stato del 88.2% e del 82.2%, rispettivamente (Figura 8). Il rate di PFS a 1 e 3 anni è stato del 88.0% e del 84.2 %, rispettivamente (Figura 9). La NRM a 1 e 3 anni è stata del 7.1% e del 8.4%%, rispettivamente (Figura 10).

Figura 8. Sopravvivenza globale (OS)

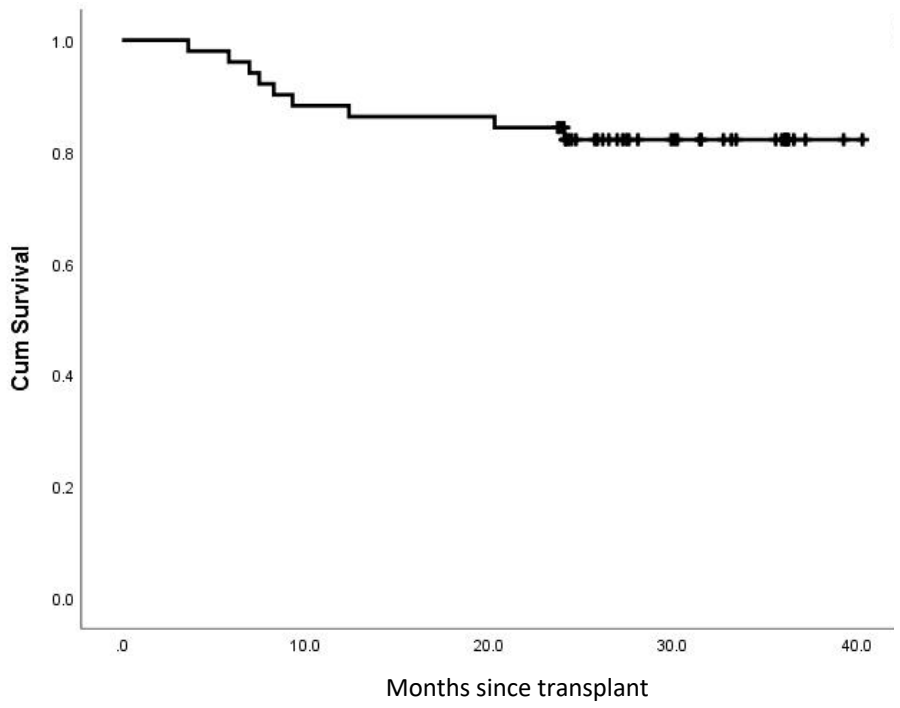


Figura 9. Sopravvivenza libera da progressione (PFS)

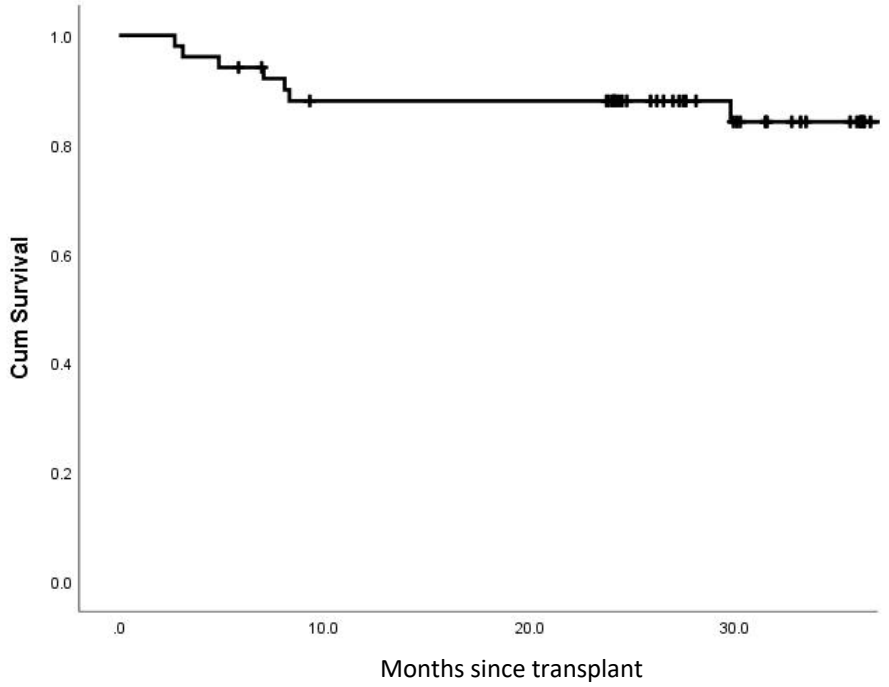
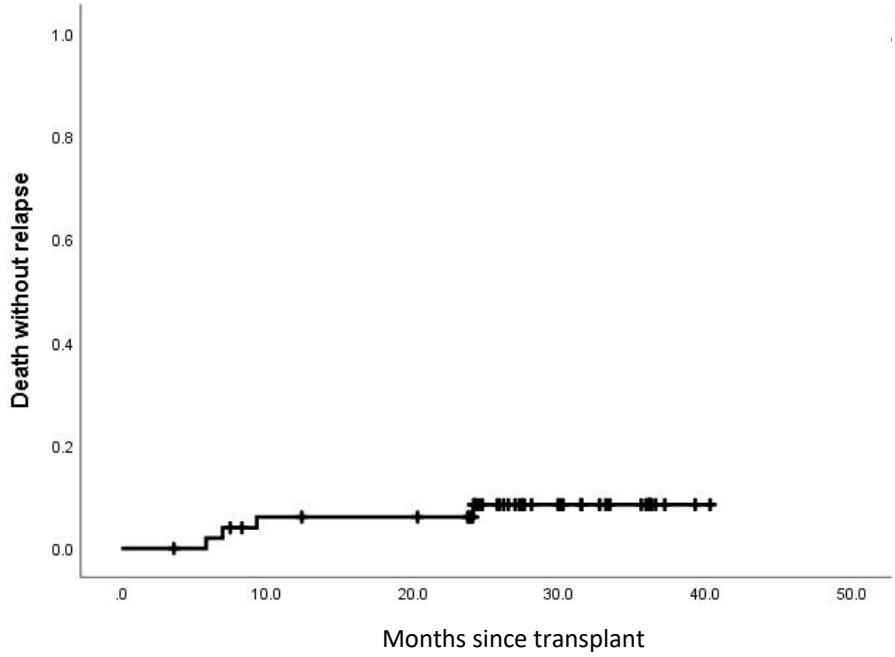


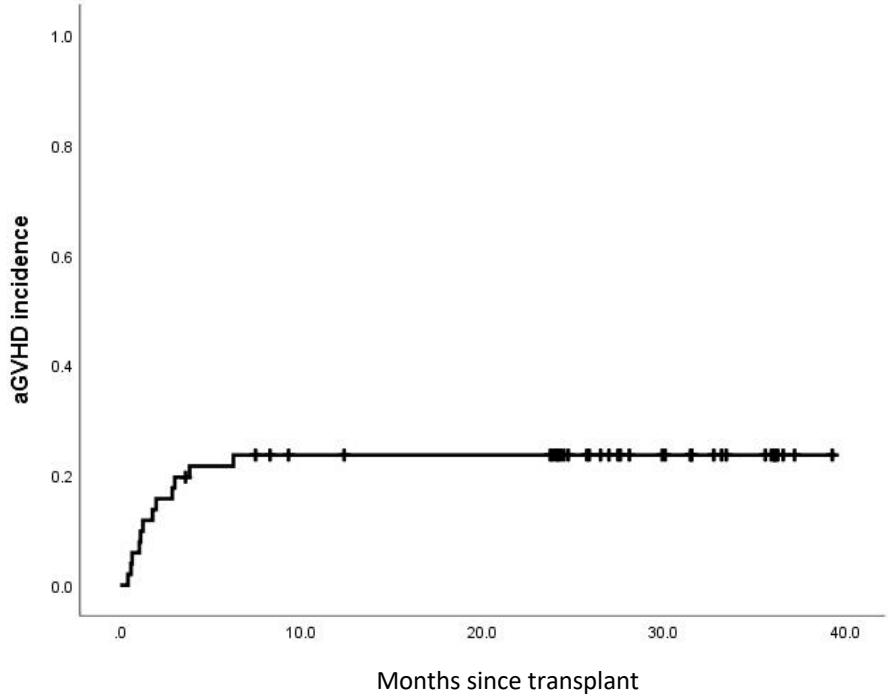

Figura 10. Non Relapse Mortality (NRM)



## GVHD acuta e cronica

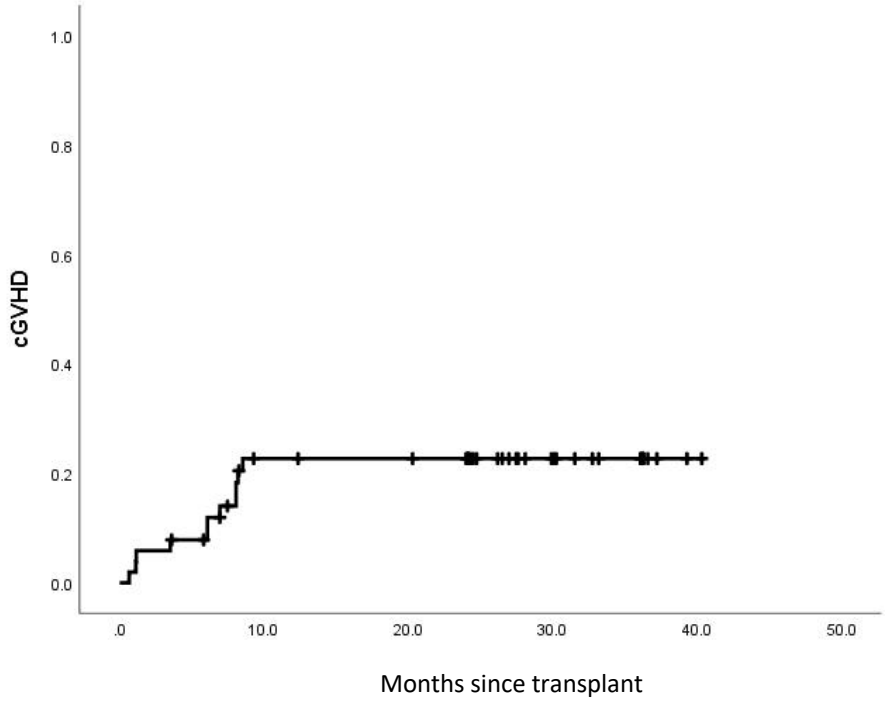
L'incidenza cumulativa a 1 e a 3 anni di GVHD acuta di ogni grado (I-IV) è stata del 23.6% (Figura 11). L'incidenza di GVHD acuta di grado III-IV ha riguardato solo due pazienti.

Figura 11. Incidenza cumulativa di GVHD acuta di ogni grado




L'incidenza cumulativa a 1 e a 3 anni di GVHD cronica globale è stata del 22.7%. Anche per questo parametro l'incidenza di casi di grado severo è stata trascurabile. I dati sono mostrati in Figura 12.

Figura 12. Incidenza cumulativa di GVHD cronica di ogni grado.



## Analisi di metilazione del DNA

Per questa preliminare coorte di 51 pazienti abbiamo iniziato a valutare lo stato di metilazione del DNA secondo le metodiche in precedenza descritte.

L'analisi dei campioni del time-point pre-chemioterapia di condizionamento è stata esclusa dall'analisi statistica per scarsa numerosità. Ci si propone tuttavia di mantenere tale punto di valutazione per i pazienti delle prossime coorti.

Per ciascun paziente e ciascun donatore, in ogni time-point, abbiamo calcolato il profilo di metilazione mediante lo strumento EpiTYPER® e poi utilizzato il modello predittivo in precedenza descritto, già validato sul gruppo di controllo, per definire l'età epigenetica predetta. Infine, per ciascun campione è stata definita l'accelerazione dell'età epigenetica (Epigenetic Age Acceleration), indice di quanto l'età epigenetica si discosti da quella predetta.

La Figura 13 mostra l'andamento dell'età epigenetica rispetto all'età cronologica nella popolazione oggetto di studio (pazienti e donatori) in confronto con i controlli. Definiamo A il time-point pre-trapianto e pre-chemioterapia (escluso successivamente dall'analisi), B il time-point pre-trapianto al giorno -1, D il giorno +30, E il giorno + 90, F il giorno +180, G il giorno +270, H il giorno +360. In generale, la rappresentazione grafica mostra come l'età epigenetica di soggetti di controllo sia relata all'età anagrafica in maniera pressoché lineare. I donatori presentano un andamento simile, ma con una lieve tendenza ad una decelerazione dell'età epigenetica (Figura 14).

Figura 13. Distribuzione dell'età epigenetica rispetto all'età cronologica di pazienti, donatori e controlli in ogni time-point.

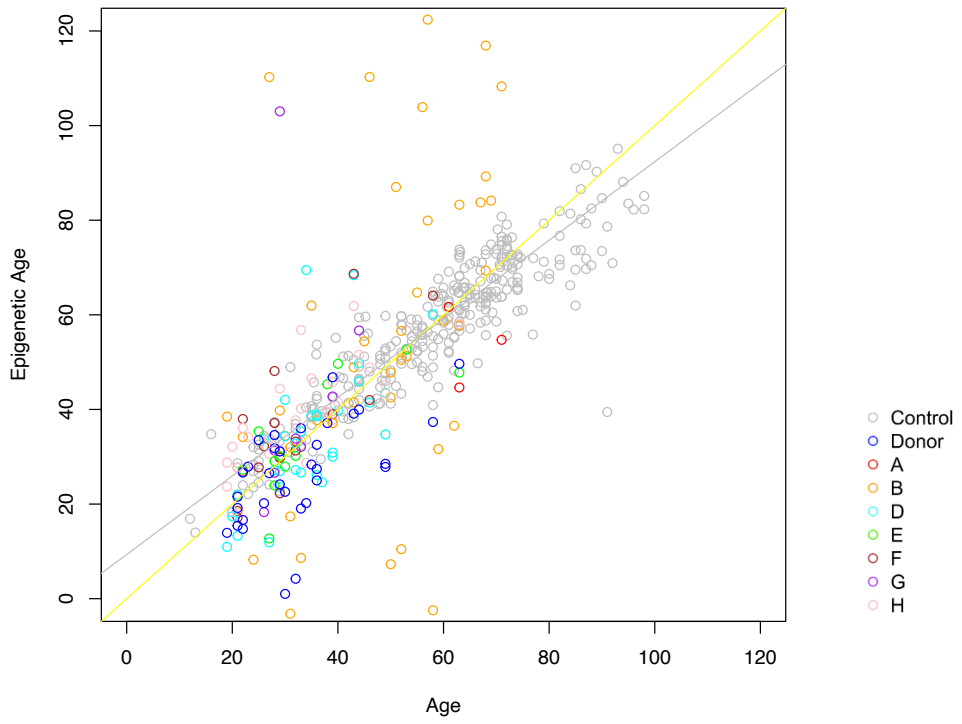
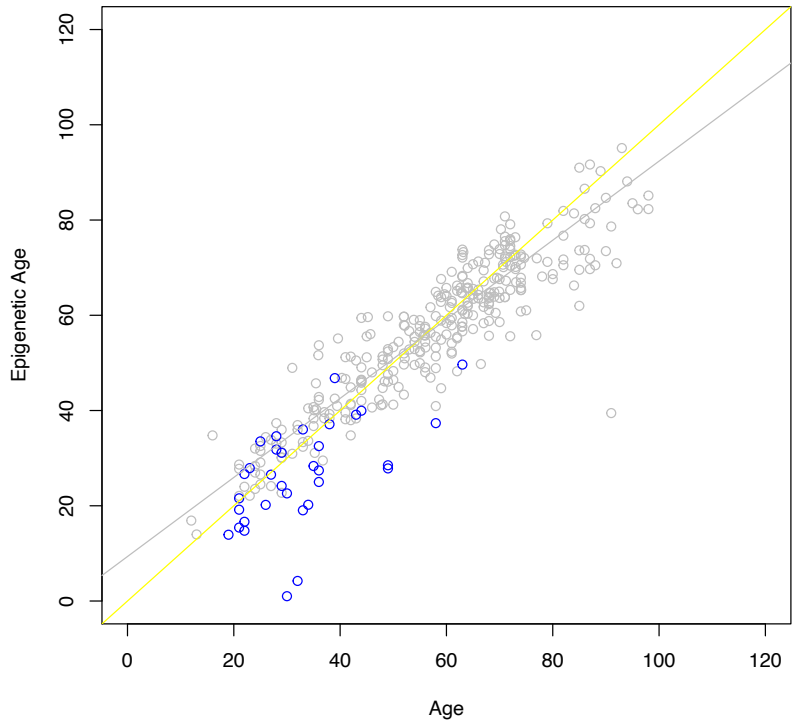



Figura 14. Distribuzione dell'età epigenetica rispetto all'età cronologica dei donatori (in blu), confrontata con quella dei controlli (in grigio)



La Figura 15 mostra l'andamento dell'Epigenetic Age Acceleration di tutta la popolazione di pazienti nei diversi momenti di osservazione, riflettendo pertanto in maniera longitudinale il cambiamento dell'età epigenetica nel tempo. Nel grafico è stata inserita la mediana di età di accelerazione dei donatori (linea continua orizzontale) e il relativo intervallo di confidenza. È interessante notare che la distribuzione dell'accelerazione dei pazienti al punto B (dopo la chemioterapia di condizionamento ma prima della reinfusione delle cellule staminali del donatore) appare molto variabile nella popolazione, mentre nei successivi punti si distribuisce uniformemente. Il livello sul quale l'età di accelerazione epigenetica si va a distribuire è molto simile a quella del donatore. Un unico paziente (linea rossa) presenta un netto distacco con rapida accelerazione della curva di età epigenetica. Si tratta di un paziente con Leucemia acuta mieloide ricaduta a 8 mesi dal trapianto, per cui si potrebbe ipotizzare che la rapida accelerazione della curva rifletta la ricomparsa delle cellule leucemiche del paziente. I dati sono tuttavia troppo immaturi e poco numerosi per qualsiasi speculazione.

Infine, la Figura 16 mostra la rappresentazione mediante boxplot dell'età epigenetica della popolazione nei vari time-point e quella dei donatori. L'età epigenetica basale (time-point B) appare essere la più elevata. A partire dal giorno +30 dal trapianto (time-point D) l'età epigenetica si avvicina a quella del donatore e rimane simile ad esso per tutti i successivi time-point analizzati. L'età epigenetica mediana dei pazienti nei time point post trapianto (D, E, F, G, H) è comunque significativamente maggiore di quella del gruppo dei donatori.

Figura 15. Andamento dell'accelerazione dell'età epigenetica per i pazienti analizzati, nei diversi time-point

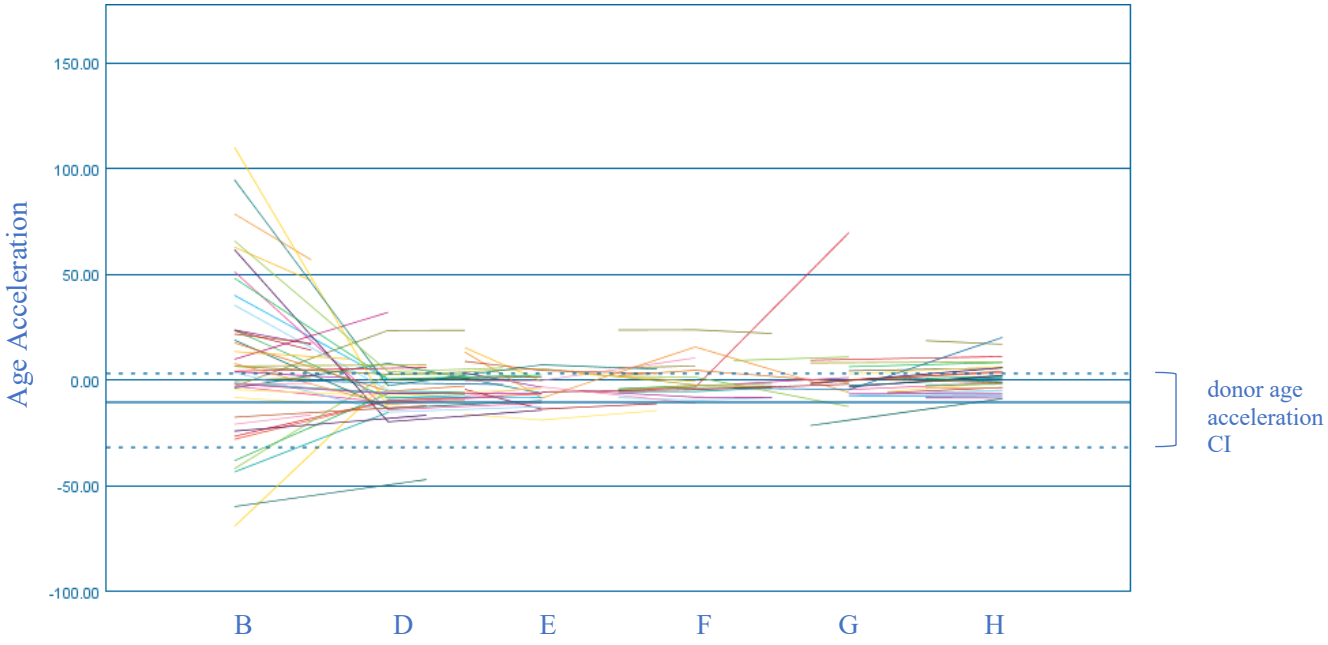
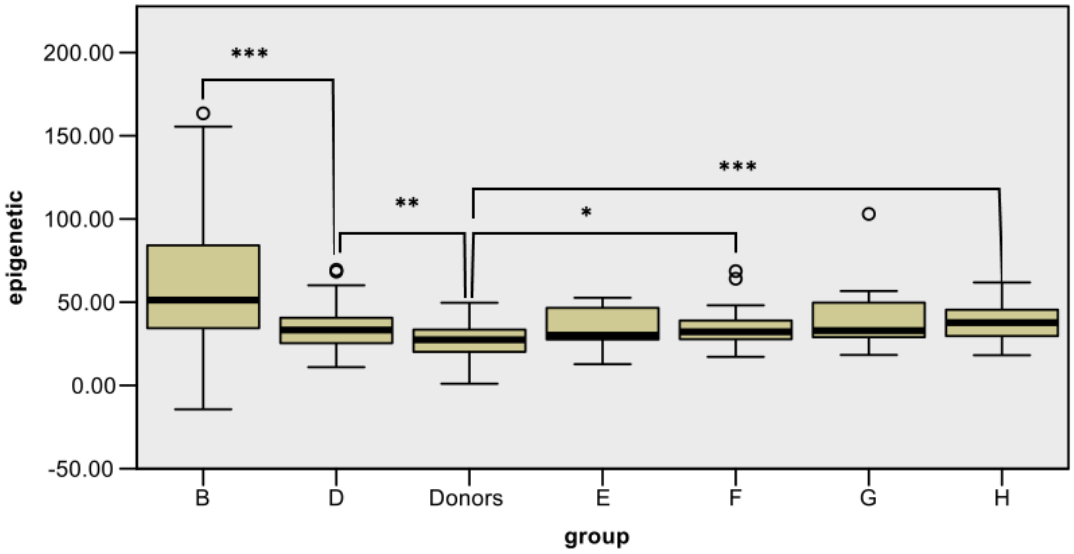



Figura 16. Distribuzione mediante boxplot dell'età epigenetica di pazienti nei vari timepoint



# Discussione

La valutazione di marcatori biologici pre-trapianto per predire gli outcome e migliorare la stratificazione dei pazienti che vengono sottoposti a tale procedura rappresenta oggi una necessità clinica. Questo accade soprattutto in ragione dell'aumento progressivo dell'età dei pazienti che vengono avviati alla procedura trapiantologica. L'età cronologica non è più considerata un limite per sottoporre il paziente ad una terapia ad alta intensità. La metilazione del DNA si è affermata come uno dei principali metodi per valutare l'età biologica. Quest'ultima è un indice che predice maggiormente lo stato di saluto del soggetto. E, in particolare, la cosiddetta accelerazione della età epigenetica è un indice in grado di evidenziare le situazioni che si discostano dalla normalità.

Il presente studio ha valutato l'età epigenetica e la sua accelerazione in pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. I time-point analizzati sono stati numerosi e tali da poter descrivere un trend nell'età di metilazione osservata. Sono stati inoltre analizzati i donatori delle cellule staminali per questa popolazione di pazienti, allo scopo di poter valutare come l'età epigenetica delle cellule emopoietiche del donatore venisse influenzata dalla infusione nel microambiente midollare del paziente e, viceversa, come le caratteristiche del donatore potessero impattare sull'andamento del trapianto nel paziente stesso. Sono rari in letteratura gli studi disegnati ad hoc in questo setting di pazienti (Weiden et al. 2015, Stolzel et al. 2017, Soras et al. 2018). Nel complesso tali studi hanno affermato che l'età di metilazione delle cellule trapiantate dipende in buona sostanza dal donatore, mentre non sono influenzate dal microambiente midollare del ricevente. L'età epigenetica delle cellule staminali emopoietiche è pertanto considerata una caratteristica intrinseca ad esse.

Dai dati da noi esaminati, visto l'elevato numero di time-point studiati, il risultato più interessante è rappresentato dall'osservazione dell'andamento dell'età epigenetica e della età di accelerazione epigenetica, che risultano molto variabili nella nostra popolazione di pazienti prima del momento

della reinfusione. Tali valori tendono poi a diventare omogenei andando ad assomigliare, soprattutto a breve distanza dal trapianto, alle caratteristiche di età biologica delle cellule del donatore. Le caratteristiche tendono a mantenersi nel breve tempo della nostra osservazione (fino a 12 mesi da trapianto). Questi dati confermano i precedenti report della letteratura.

I risultati proposti sono assolutamente preliminari ed eseguiti, ad oggi, solo su una piccola parte della popolazione che ci proponiamo di studiare. Sarà interessante valutare se l'andamento dei dati di metilazione si confermi sulla totalità dei pazienti e se, in un tempo di osservazione maggiore, si mantengano le caratteristiche di età epigenetica delle cellule emopoietiche nel ricevente.

Ad oggi non abbiamo valutato l'obiettivo secondario dello studio, che riguardava la correlazione tra i dati di metilazione del DNA con le analisi di sopravvivenza e con la valutazione dell'incidenza di complicanze trapiantologiche, ad esempio la comparsa di GVHD. Tali valutazioni saranno eseguite successivamente su una casistica più significativa.

# Bibliografia


- Bacalini MG, Deelen J, Pirazzini C, et al. Systemic Age-Associated DNA Hypermethylation of ELOVL2 Gene: In Vivo and In Vitro Evidences of a Cell Replication Process. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2017; 72, 1015–1023.

- Basak GW, Sánchez-Ortega I, Beohou E, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in elderly patients aged 65 and older: a retrospective analysis by the complications and quality of life working party of the EBMT. Blood. 2016;128:681.

- Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. Epigenetic predictor of age. PLoS One. 2011;6(6):e14821.

- Bonanad S, De la Rubia J, Gironella M, et al. Development and psychometric validation of a brief comprehensive health status assessment scale in older patients with hematological malignancies: the GAH scale. J Geriatr Oncol. 2015;6:353–61.

- Buuren S van & Groothuis-Oudshoorn K. mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. J. Stat. Softw. 2011; 45, 1–67.

- Chihara D, Izutsu K, Kondo E, et al. High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation for elderly patients with relapsed/refractory diffuse large B cell lymphoma: a nationwide retrospective study. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;20:684–9.

- Cho S, Jung S-E, Hong SR, et al. Independent validation of DNA-based approaches for age prediction in blood. Forensic Sci. Int. Genet. 2017; 29, 250–256.

- Correia Dias, H., Cordeiro, C., Corte Real, F., Cunha, E. and Manco, L., Age Estimation Based on DNA Methylation Using Blood Samples From Deceased Individuals. J Forensic Sci, 2020; 65: 465-470.

- Day K, Waite LL, Thalacker-Mercer A, West A, Bamman MM, Brooks JD, Myers RM, Absher D. Differential DNA methylation with age displays both common and dynamic features across human tissues that are influenced by CpG landscape. Genome Biol. 2013;14(9):R102.

- Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. Lancet. 2018 Sep 1;392(10149):777-786. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31268-6. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30100054.

- Du P, Kibbe WA & Lin SM. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. Bioinforma. Oxf. Engl. 2008; 24, 1547–1548.

- Durso DF, Bacalini MG, Sala C, et al. Acceleration of leukocytes' epigenetic age as an early tumor and sex-specific marker of breast and colorectal cancer. Oncotarget 2017; 8, 23237–23245.

- Field AE, Robertson NA, Wang T, et al. DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. Mol. Cell 2018; 71, 882–895.

- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graftversus- host disease. I. Diagnosis and Staging Working Group report. Biol Blood Marrow Transplant. 2005; 11:945–956.

- Florath I, Butterbach K, Müller H, et al. Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. Hum. Mol. Genet. 2014; 23, 1186–1201.

- Franceschi C, Garagnani P, Morsiani C, et al. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. Front. Med. 2018; 5, 61.

- Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, et al. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. Aging Cell 2012; 11, 1132–1134.

- Gensous N, Bacalini MG, Pirazzini C, et al. The epigenetic landscape of age-related diseases: the geroscience perspective. Biogerontology. 2017 Aug;18(4):549-559.

- Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, et al. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Lancet. 1998;352:1087–92.

- Gratwohl A, Stern M, Brand R, et al. Risk score for outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. Cancer. 2009;115:4715–26.

- Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, et al. One million haematopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. Lancet Haematol. 2015;2:e91–100.

- Hahn O, Grönke S, Stubbs TM, et al. Dietary restriction protects from ageassociated DNA methylation and induces epigenetic reprogramming of lipid metabolism. Genome Biol. 2017; 18, 56.

- Hannum G, Guinney J, Zhao L, et al. Genomewide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. Mol. Cell. 2013; 49, 359–367.

- Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome Biol. 2013; 14, R115.

- Horvath S, Pirazzini C, Bacalini MG, et al. Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. Aging 2015; 7, 1159–1170.

- Horvath S, Pirazzini C, Bacalini MG, et al. Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. Aging 2015; 7, 1159–1170.

- Horvath S, Oshima J, Martin GM, et al. Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies. Aging 2018; 10, 1758–1775.

- Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graftversus-host disease. I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. Biol Blood Marrow Transplant. 2015; 21:389–401.

- Jung M & Pfeifer GP. Aging and DNA methylation. BMC Biol. 2015; 13, 7.

- Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, et al. Geroscience: linking aging to chronic disease. Cell 2014; 159, 709–713.

- Kuhn M. Building Predictive Models in R Using the caret Package. J. Stat. Softw. 2008; 28, 1–26.

- Levine ME, Lu AT, Quach A, et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. Aging 2018; 10, 573–591.

- Li X, Ploner A, Wang Y, Magnusson PK, Reynolds C, Finkel D, Pedersen NL, Jylhävä J, Hägg S. Longitudinal trajectories, correlations and mortality associations of nine biological ages across 20-years follow-up. Elife. 2020 Feb 11;9:e51507.

- Ligthart S, et al. DNA methylation signatures of chronic low-grade inflammation are associated with complex diseases. Genome Biol. 2016; 17, 255.

- Lister, R.; Pelizzola, M.; Dowen, R.H.; et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature 2009, 462, 315–322.

- Lu AT, Seeboth A, Tsai P-C, et al. DNA methylation-based estimator of telomere length. Aging 2019.

- Luo A, Jung J, Longley M, et al. Epigenetic aging is accelerated in alcohol use disorder and regulated by genetic variation in APOL2. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. 2019.

- Maierhofer A, Flunkert J, Oshima J, et al. Accelerated epigenetic aging in Werner syndrome. Aging 2017; 9, 1143–1152.

- Malagola M, Polverelli N, Rubini V, et al. GITMO Registry Study on Allogeneic Transplantation in Patients Aged ≥60 Years from 2000 to 2017: Improvements and Criticisms. Transplant Cell Ther. 2021 Nov 21:S2666-6367(21)01367-1.

- Martínez C, Jorge AS, Pereira A, Hodgkin Lymphoma Subcommittee of Spanish Group of Lymphoma and Bone Marrow Transplantation (GELTAMO), et al. Comorbidities, not age, are predictive of survival after autologous hematopoietic cell transplantation for relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma in patients older than 50 years. Ann Hematol. 2017;96:9–16.

- Muffly L.S., Kocherginsky M, Stock W, et al. Geriatric assessment to predict survival in older allogeneic hematopoietic cell transplantation recipients. Haematologica 2014;99(8):1373-1379.

- Oblak L, van der Zaag J, Higgins-Chen AT., et al. A systematic review of biological, social and environmental factors associated with epigenetic clock acceleration. Ageing Research Reviews 2021, vol 69.

- Paredes S, Angulo-Ibanez M, Tasselli L, et al. The epigenetic regulator SIRT7 guards against mammalian cellular senescence induced by ribosomal DNA instability. J. Biol. Chem. 2018; 293, 11242–11250.

- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus conference on acute GVHD grading. Bone Marrow Transplant. 1995; 15:825–828.

- Sánchez-Ortega I, Basak G, Beohou E, et al. Performance status drives the impact of age on the outcomes of autologous hematopoietic cell transplantation in elderly patients aged 65 and older: a retrospective analysis by the Complications and Quality of Life Working Party of the EBMT. Blood. 2016;128:678.

- Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. Nature, 517 (7534) (2015), pp. 321-326.

- Slieker RC, van Iterson M, Luijk R, et al. Age-related accrual of methylomic variability is linked to fundamental ageing mechanisms. Genome Biol. 2016; 17, 191.

- Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. Nat Rev Genet. 2013 Mar;14(3):204-20. doi: 10.1038/nrg3354. Epub 2013 Feb 12.

- Søraas, A, Matsuyama, M, de Lima, M, et al. Epigenetic age is a cell-intrinsic property in transplanted human hematopoietic cells. Aging Cell. 2019; 18:e12897.

- Sorror ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. Blood. 2005 Oct 15;106(8):2912-9.

- Sorror ML, Storb RF, Sandmaier BM, et al. Comorbidity-age index: a clinical measure of biologic age before allogeneic hematopoietic cell transplantation. J Clin Oncol. 2014 Oct 10;32(29):3249-56.

- Spólnicka M, Pośpiech E, Pepłońska B, et al. DNA methylation in ELOVL2 and C1orf132 correctly predicted chronological age of individuals from three disease groups. Int. J. Legal Med. 2018; 132, 1–11.

- Stölzel F, Brosch M, Horvath S, et al. Dynamics of epigenetic age following hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica 2017.

- Tanaka Y, Kurosawa S, Tajima K, Tanaka T, Ito R, Inoue Y, Okinaka K, Inamoto Y, Fuji S, Kim SW, Tanosaki R, Yamashita T, Fukuda T. Analysis of non-relapse mortality and causes of death over 15 years following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2016 Apr;51(4):553-9.

- Thomas ED, Buckner CD, Sanders JE, et al. Marrow transplantation for thalassaemia. Lancet. 1982;2:227–9.

- Vidaki A, Ballard D, Aliferi A, et al. DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing. Forensic Sci. Int. Genet. 2017; 28, 225–236.

- Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. N Engl J Med. 1979;300:1068–73.

- Weidner, C., Ziegler, P., Hahn, M. et al. Epigenetic aging upon allogeneic transplantation: the hematopoietic niche does not affect age-associated DNA methylation. Leukemia 29, 985–988 (2015).

- Xiao F-H, Chen X-Q, He Y-H & Kong Q-P. Accelerated DNA methylation changes in middle-aged men define sexual dimorphism in human lifespans. Clin. Epigenetics 2018; 10, 133.

- Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, et al. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. Forensic Sci. Int. Genet. 2015; 14, 161–167.

- Zhang M, Tartaglia MC, Moreno D, et al. DNA methylation age-acceleration is associated with disease duration and age at onset in C9orf72 patients. Acta Neuropathol. (Berl.) 2017; 134, 271–279.

## Metilazione del DNA e Trapianto Allogenico di Cellule Staminali Emopoietiche


### Abstract

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche rappresenta la terapia di scelta per numerose patologie ematologiche. Tuttavia, la mortalità da trapianto (non relapse mortality-NRM), ha limitato per lungo tempo il suo utilizzo in pazienti di età >65 anni. L'età non può essere considerata di per sé una controindicazione assoluta al trapianto e il suo utilizzo in fasce di età un tempo ritenute non idonee è in sensibile aumento. La fitness al trapianto viene valutata attualmente mediante il Comorbidity Index score di Sorror (HCT-CI), che correla con l'outcome dopo trapianto e fornisce indicazioni sulla intensità della chemioterapia da somministrare al fine di ridurre la tossicità e quindi la NRM. La NRM è legata a tre ordini di complicanze: immunologiche (malattia del trapianto contro l'ospite, Graftversus-Host Disease -GVHD-), infettive e tossiche. La tossicità d'organo è direttamente correlata alla intensità del condizionamento che quindi viene ridotta in caso di presenza di comorbidità e nel paziente anziano. Tuttavia, ridurre l'intensità del condizionamento significa anche aumentare la probabilità di ripresa della malattia ematologica di base e quindi tale aggiustamento deve essere fatto in funzione di indici di invecchiamento e di comorbidità al fine di non ridurre la potenzialità curativa del trapianto. Per le comorbidità abbiamo uno score altamente predittivo (HCT-CI), mentre per l'invecchiamento c'è una grande necessità clinica di applicare marcatori innovativi di età biologica.

Il presente lavoro si è posto l'obiettivo di valutare, nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche per tutte le indicazioni ematologiche, lo stato di metilazione del DNA, indice di età biologica. Lo scopo è di correlare l'epigenoma al rischio trapiantologico del singolo individuo. La metilazione del DNA è un indice che predice maggiormente lo stato di saluto del soggetto rispetto all'età cronologica. E, in particolare, la cosiddetta accelerazione della età epigenetica è un indice in grado di evidenziare le situazioni che si discostano dalla normalità. Dai dati da noi esaminati, si può valutare l'andamento dell'età epigenetica e della età di accelerazione epigenetica, che risultano molto variabili nella popolazione di pazienti prima del momento della reinfusione. Tali valori tendono poi a diventare omogenei andando ad assomigliare, soprattutto a breve distanza dal trapianto, alle caratteristiche di età biologica delle cellule del donatore.

# Pubblicazioni negli anni del Dottorato di ricerca

| | |
|---|---|
| **Lavori in extenso inerenti il progetto di ricerca di Dottorato** | **/** |
| **Lavori in extenso non direttamente inerenti il progetto di ricerca di Dottorato** | Bonifazi F, De Francesco I, Olivieri J, Barbato F, Lopedote P, Dicataldo M, Sessa M, Dan E, Sinigaglia B, Zazzeroni L, Rizzi S, Tassi C, Casadei B, Zinzani PL, Arpinati M. Low doses ATLG as GvHD prophylaxis in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for lymphomas. Bone Marrow Transplant. 2021 Jun 9. doi: 10.1038/s41409-021-01359-x. Epub ahead of print. PMID: 34108674.<br><br>Picardi A, Sacchi N, Miotti V, Lorentino F, Oldani E, Rambaldi A, Sessa M, Bruno B, Cerno M, Vago L, Bernasconi P, Arcese W, Benedetti F, Pioltelli P, Russo D, Farina L, Fagioli F, Guidi S, Saporiti G, Zallio F, Chiusolo P, Borghero C, Papalinetti G, La Rocca U, Milone G, Lamparelli T, Carella AM, Luppi M, Olivieri A, Martino M, Carluccio P, Celeghini I, Andreani M, Gallina AM, Patriarca F, Pollichieni S, Mammoliti S, Miccichè S, Mangione I, Ciceri F, Bonifazi F. Allelic HLA Matching and Pair Origin Are Favorable Prognostic Factors for Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Neoplastic Hematologic Diseases: An Italian Analysis by the Gruppo Italiano Trapianto di Cellule Staminali e Terapie Cellulari, Italian Bone Marrow Donor Registry, and Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti. Transplant Cell Ther. 2021 May;27(5):406.e1-406.e11. doi: 10.1016/j.jtct.2020.11.021. Epub 2021 Feb 16. PMID: 33965179.<br><br>Sessa M, Cavazzini F, Cavallari M, Rigolin GM, Cuneo A. A Tangle of Genomic Aberrations Drives Multiple Myeloma and Correlates with Clinical Aggressiveness of the Disease: A Comprehensive Review from a Biological Perspective to Clinical Trial Results. Genes (Basel). 2020 Dec 3;11(12):1453. doi: 10.3390/genes11121453. PMID: 33287156; PMCID: PMC7761770.<br><br>Chiereghin A, Piccirilli G, Belotti T, Prete A, Bertuzzi C, Gibertoni D, Gabrielli L, Turello G, Borgatti EC, Barbato F, Sessa M, Arpinati M, Bonifazi F, Lazzarotto T. Clinical utility of measuring Epstein-Barr virus-specific cell-mediated immunity after HSCT in addition to virological monitoring: results from a prospective study. Med Microbiol Immunol. 2019 Dec;208(6):825-834. doi: 10.1007/s00430-019-00629-2. Epub 2019 Jul 9.<br><br>Bonifazi F, Barbato F, Ravaioli F, Sessa M, Defrancesco I, Arpinati M, Cavo M, Colecchia A. Diagnosis and Treatment of VOD/SOS After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Front Immunol. 2020 Apr 3;11:489. doi: 10.3389/fimmu.2020.00489. eCollection 2020. |

Marconi G, Talami A, Abbenante MC, Sartor C, Parisi S, Nanni J, Bertamini L, Ragaini S, Olivi M, de Polo S, Cristiano G, Fontana MC, Bochicchio MT, Ottaviani E, Arpinati M, Sessa M, Baldazzi C, Caso L, Testoni N, Baccarani M, Bonifazi F, Martinelli G, Paolini S, Cavo M, Papayannidis C, Curti A. MEC (mitoxantrone, etoposide, and cytarabine) induces complete remission and is an effective bridge to transplant in acute myeloid leukemia. Eur J Haematol. 2020 Jul;105(1):47-55. doi: 10.1111/ejh.13406. Epub 2020 Apr 7.

Bernabei F, Versura P, Pellegrini M, Moscardelli F, Bonifazi F, Sessa M, Arpinati M, Scorcia V, Giannaccare G. Longitudinal Analysis of Infrared Meibography in Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Cornea. 2020 Jul;39(7):812-817. doi: 10.1097/ICO.0000000000002271.

Pellegrini M, Giannaccare G, Bernabei F, Moscardelli F, Sessa M, Arpinati M, Bonifazi F, Versura P. Longitudinal Corneal Endothelial Cell Changes in Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Cornea. 2020 Jul 27. doi: 10.1097/ICO.0000000000002441. Online ahead of print.

Bonifazi, F., E. Dan, M. Labopin, M. Sessa, V. Guadagnuolo, M. Ferioli, S. Rizzi, et al. 2019. Intrabone Transplant Provides Full Stemness of Cord Blood Stem Cells with Fast Hematopoietic Recovery and Low GVHD Rate: Results from a Prospective Study. Bone Marrow Transplantation 54, no. 5 (May 19): 717–725. http://www.nature.com/articles/s41409-018-0335-x.

Bonifazi, F., J. Olivieri, M. Sessa, E. Dan, B. Sinigaglia, S. Rizzi, M.R. Motta, et al. 2018. Low-Dose Anti-T Lymphoglobulin as Prophylaxis for Graft-versus-Host Disease in Unrelated Donor Transplantations for Acute Leukemias and Myelodysplastic Syndromes. Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation 24, no. 12 (December): 2450–2458. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879118303987.

Bonifazi, F., C. Solano, C. Wolschke, M. Sessa, F. Patriarca, F. Zallio, A. Nagler, et al. 2019. Acute GVHD Prophylaxis plus ATLG after Myeloablative Allogeneic Haemopoietic Peripheral Blood Stem-Cell Transplantation from HLA-Identical Siblings in Patients with Acute Myeloid Leukaemia in Remission: Final Results of Quality of Life and Long-Term Outcome Analysis of a Phase 3 Randomised Study. The Lancet. Haematology 6, no. 2 (February): e89–e99. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235230261830214X.

Chiereghin, A., G. Piccirilli, T. Belotti, A. Prete, C. Bertuzzi, D. Gibertoni, L. Gabrielli, et al. 2019. Clinical Utility of Measuring Epstein–Barr Virus-Specific Cell-Mediated Immunity after HSCT in Addition to Virological Monitoring: Results from a Prospective Study. Medical Microbiology and Immunology (July 9). http://link.springer.com/10.1007/s00430-019-00629-2.

| | |
|---|---|
| | Colecchia, A., F. Ravaioli, M. Sessa, V.L. Alemanni, E. Dajti, G. Marasco, A. Vestito, et al. 2019. Liver Stiffness Measurement Allows Early Diagnosis of Veno-Occlusive Disease/Sinusoidal Obstruction Syndrome in Adult Patients Who Undergo Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Results from a Monocentric Prospective Study. Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation 25, no. 5 (May): 995–1003. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879119300680.<br><br>Giannaccare, G., F. Bernabei, M. Pellegrini, M. Arpinati, F. Bonifazi, M. Sessa, P. Versura, and E. Campos. 2019. Eyelid Metrics Assessment in Patients with Chronic Ocular Graft versus-Host Disease. The Ocular Surface 17, no. 1 (January): 98–103. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542012418302349.<br><br>Giannaccare, G., P. Versura, F. Bonifazi, M. Sessa, and E.C. Campos. 2019. Comparison among Different Diagnostic Criteria for Chronic Ocular Graft-versus-Host Disease Applied with and without Pre-Transplant Ophthalmological Examination. Eye 33, no. 1 (January 7): 154–160. http://www.nature.com/articles/s41433-018-0210-4.<br><br>Ravaioli, F., A. Colecchia, L.V. Alemanni, A. Vestito, E. Dajti, G. Marasco, M. Sessa, A. Pession, F. Bonifazi, and D. Festi. 2019. Role of Imaging Techniques in Liver Veno-Occlusive Disease Diagnosis: Recent Advances and Literature Review. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology 13, no. 5 (May 4): 463–484. https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17474124.2019.1588111. |
| **Abstract congressuali ed altre pubblicazioni inerenti il progetto di ricerca di Dottorato** | / |
| **Abstract congressuali ed altre pubblicazioni non direttamente inerenti il progetto di ricerca di Dottorato** | Abstract European Hematology Association Congress (EHA-3821)<br>INOTUZUMAB OZAGAMICIN AND DONOR LYMPHOCYTE INFUSION ARE A SAFE AND PROMISING COMBINATION IN RELAPSED ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA AFTER ALLOGENEIC TRANSPLANT<br>Sartor C, Dominietto A, Zappone E, Marconi G, Abbenante MC, Parisi S, Robustelli V, Terragna C, Nanni J, Cristiano G, Arpinati M, Sessa M, Paolini S, Cavo M, Curti M, Bonifazi F, Papayannidis C.<br><br>Bonifazi, F., F. Ravaioli, M. Sessa, A. Vestito, L.V. Alemanni, M. Arpinati, G. Marasco, et al. 2018. Transient Elastography Anticipates the Diagnosis of VOD/SOS after Adult Allogeneic Stem Cell Transplant: Results from a Prospective Study. Blood 132, no. Suppl 1 (November 21): 2098–2098. http://www.bloodjournal.org/content/132/Suppl_1/2098.abstract?sso-checked=true. |

| | |
|---|---|
| | Picardi, A., N. Sacchi, V. Miotti, F. Lorentino, E. Oldani, A. Rambaldi, M. Sessa, et al. 2018. High Resolution Donor/Recipient HLA Matching Level in Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Impact on the Transplant Outcome: The Italian Experience on Behalf of GITMO, IBMDR and Aibt. Blood 132, no. Suppl 1 (November 21): 4642–4642. http://www.bloodjournal.org/content/132/Suppl_1/4642.abstract.<br><br>Candoni A., Fanin R., Rambaldi A., Velardi A, Arcese W., Ciceri F., Lazzarotto D., Lussana F, Olivieri J, Grillo G., Parma A., Bruno B., Sora F., Bernasconi P., Saccardi R., Foà R., Sessa M., Bresciani P., Giglio F., Cerretti R., Busca A., Sica S., Diral E., Colombo A. A., Tringali S., Santarone S., Irrera G., Mancini S., Zallio F., Malagola M., Albano F., Carella A. M., Olivieri A., Tecchio C., Dominietto A., Vacca A., Sorasio R., Orciuolo E., Risitano A. M., Cortelezzi A., Mammoliti S., Oldani E., Bonifazi F., on behalf of GITMO. 2019. Outcome of allogeneic-HSCT in adult patients with PH-positive-all in the era of TKI: A retrospective analysis of the Italian blood and marrow transplantation society (GITMO). EBMT 2019. https://www.nature.com/articles/s41409-019-0562-9<br><br>Bonifazi, F., F. Ravaioli, M. Sessa, A. Vestito, L.V. Alemanni, M. Arpinati, G. Marasco, et al. 2018. Transient Elastography Anticipates the Diagnosis of VOD/SOS after Adult Allogeneic Stem Cell Transplant: Results from a Prospective Study. Blood 132, no. Suppl 1 (November 21): 2098–2098. http://www.bloodjournal.org/content/132/Suppl_1/2098.abstract?sso-checked=true.<br><br>Picardi, A., N. Sacchi, V. Miotti, F. Lorentino, E. Oldani, A. Rambaldi, M. Sessa, et al. 2018. High Resolution Donor/Recipient HLA Matching Level in Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Impact on the Transplant Outcome: The Italian Experience on Behalf of GITMO, IBMDR and Aibt. Blood 132, no. Suppl 1 (November 21): 4642–4642. http://www.bloodjournal.org/content/132/Suppl_1/4642.abstract. |