L’assetto immuno-microbico del ricevente pre-trapianto è associato alla ricostituzione immunitaria e agli outcome clinici nel TCSE pediatrico

Studio esplorativo di biomarkers mediante analisi di vescicole extracellulari (EVS)

F. Gottardi[1], S. De Matteis[2], S. Rampelli[3], D. Leardini[1], E. Muratore[1], F. Baccelli[1], F. Venturelli[1], A. Cartanì[1], F. D’Amico[3], I. Salamon[2], F. Iannotta[2], F. Vaglio[2], G. Storci[2], M. Franzoni[1], M. Candela[3], A. Prete[1], F. Bonifazi[2], R. Masetti[1/4], M. Bonafè[2/4]

[1]Oncoematologia Pediatrica, IRCCS AOU di Bologna · [2]Trapianto e Terapie Cellulari, IRCCS AOU di Bologna · [3]Dip. di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna · [4]Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna

Dati parte di un manoscritto attualmente sottoposto a revisione

AIEOP
ASSOCIAZIONE ITALIANA EMATOLOGIA ONCOLOGIA PEDIATRICA

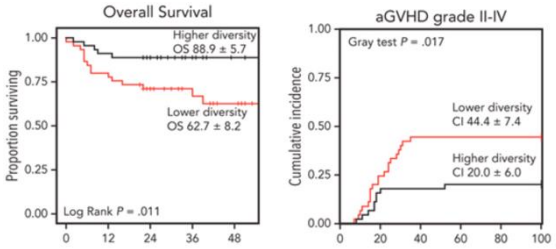
AIEOP MEDICI
LECCE, 12-14 ottobre 2026
HILTON GARDEN INN

Disclosures of Francesca Gottardi

Company name	Research support	Employee	Consultant	Stockholder	Speakers bureau	Advisory board	Other

Il terreno biologico pre-trapianto del ricevente condiziona outcome, in particolare GvHD e immunoricostituzione

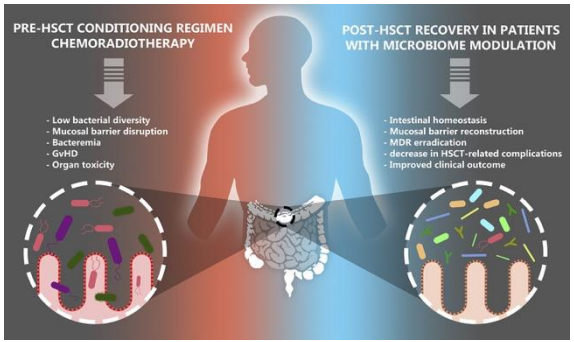
Microbiota intestinale



Una ridotta diversità pre-trapianto si associa a aGvHD , maggiore mortalità, e ritardata ricostituzione immunitaria

Peled et al., NEJM 2020; Masetti et al., Blood 2023; Miltiadous et al., Blood 2022

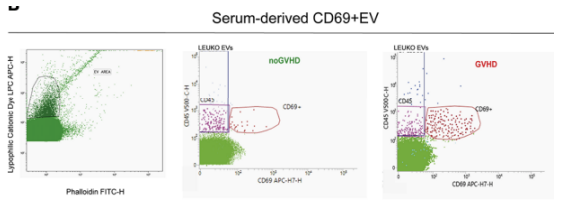
Cross-talk immuno-microbico



Cross-talk immuno-microbico mediato da metaboliti batterici, impatto di danno mucosale, chemio e radioterapia

Ciernikova et al., Blood Rev 2021; Weber et al., BMT 2026

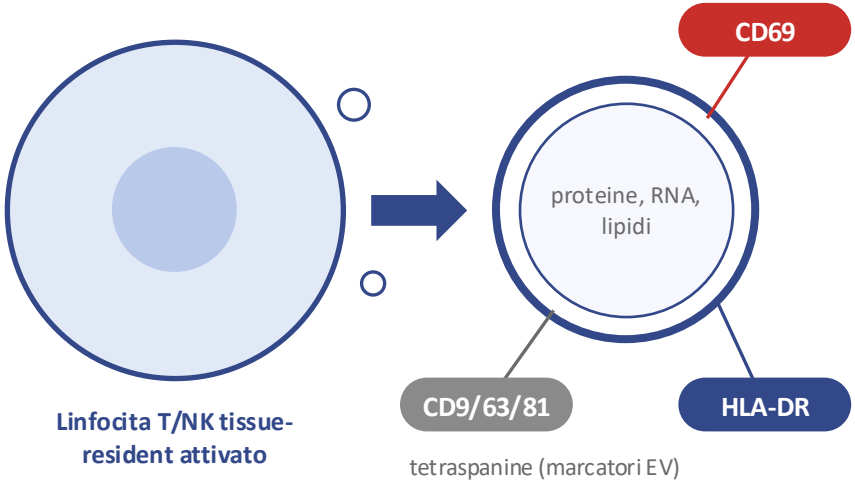
Vescicole extracellulari (EV)



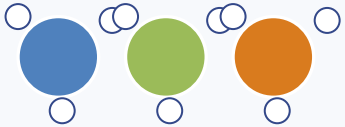
Le EV circolanti riflettono la composizione del compartimento immunitario tissue-resident: EV CD69⁺ pre-trapianto sono associate a GvHD acuta

Strobl et al., Sci Transl Med 2020; Storci et al., Front Immunol 2023

Vescicole extracellulari: una biopsia liquida del compartimento immunitario residente nei tessuti



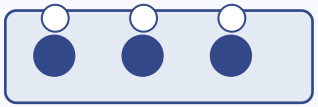
MACSPlex



biglie con anticorpi di cattura

Citometria su biglie: screening di 37 marcatori di superficie, normalizzato sulle tetraspanine → nMFI

ExoView



chip con spot di cattura

Interferometria a singola particella: conta assoluta (EV/µL) e co-espressione di più marcatori

Disegno dello studio

39 pazienti pediatrici sottoposti ad allo-HSCT · studio prospettico monocentrico, IRCCS AOU di Bologna, 2022–2025

Pre-trapianto · giorno –7/–10

EV plasmatiche 39/39
MACSPlex (37 marcatori) + ExoView

Microbiota intestinale 32/39
sequenziamento 16S rRNA

Immunofenotipo cellule circolanti 32/39
citofluorimetria multiparametrica

Post-trapianto · immunoricostituzione T, NK

coorte dello studio n = 39 · coorte estesa n = 55 per le traiettorie e la recidiva



Outcome: aGvHD II–IV (criteri MAGIC)
aGvHD 0–I n = 21 · aGvHD II–IV n = 18

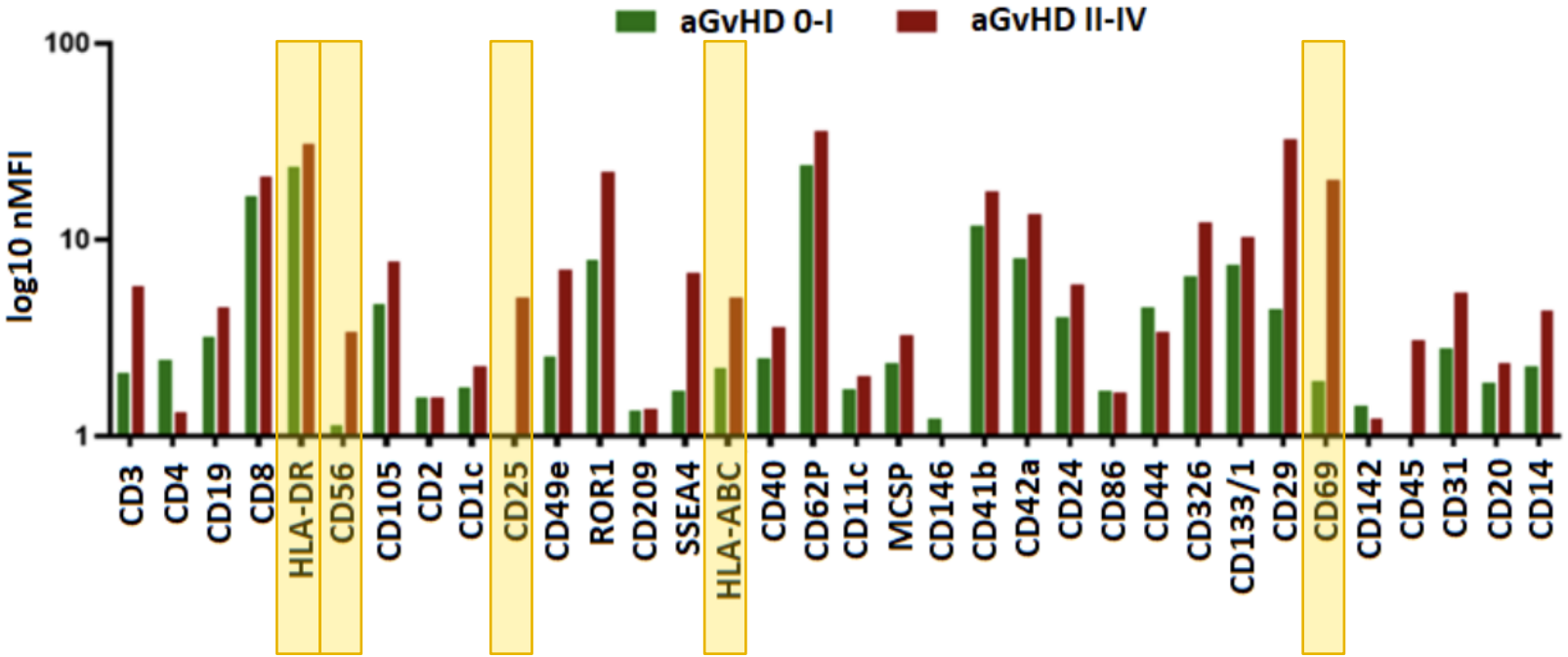
Analisi: Mann–Whitney · incidenza cumulativa (Gray) · Cox multivariata · MaAsLin2 · correlazioni di Spearman (FDR)

Caratteristiche dei pazienti

	Coorte totale (n = 39)	aGvHD 0–I (n = 21)	aGvHD II–IV (n = 18)	p
Età, anni – mediana (range)	8,8 (1,1–20,7)	8,6 (1,1–17,1)	8,1 (1,2–20,7)	0,59
Diagnosi: mieloide / linfoide / non maligna	18 / 15 / 6	11 / 6 / 4	7 / 9 / 2	0,67
Condizionamento mieloablativo (MAC)	34 (87,2%)	19 (90,5%)	15 (83,3%)	0,78
MAC: TBI / busulfano / treosulfano	8 / 18 / 8	3 / 11 / 5	5 / 7 / 3	0,64
Donatore: familiare / MUD / aploidentico	7 / 16 / 16	6 / 8 / 7	1 / 8 / 9	0,16
Profilassi: CNI±MTX / ATLG+MTX+CNI / PTCy+MMF+CNI	7 / 14 / 18	6 / 6 / 9	1 / 8 / 9	0,16
Fonte: midollo / sangue periferico	31 / 8	18 / 3	13 / 5	0,43
Microbiota disponibile	32 (82,1%)	16 (76,2%)	16 (88,9%)	0,42

Mediana (range) o n (%). MAC: mieloablativo; TBI: irradiazione corporea totale; MUD: donatore non familiare compatibile; CNI: inibitore della calcineurina; MTX: metotrexato; ATLG: globulina anti-linfociti T; PTCy: ciclofosfamide post-trapianto; MMF: micofenolato

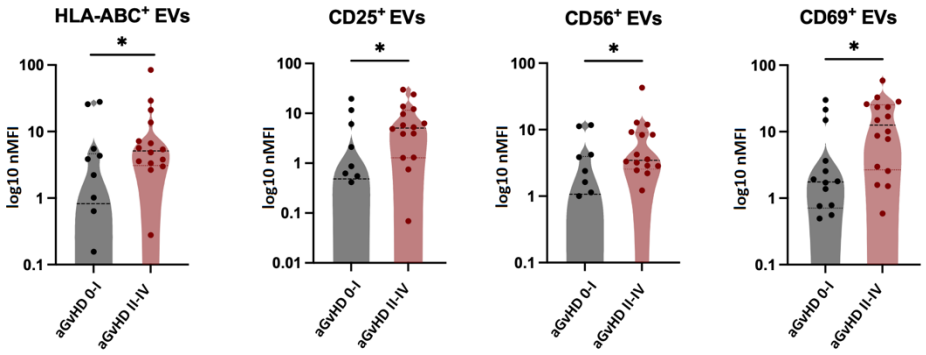
Screening MACSPlex IO



Un pattern EV pre-trapianto a fenotipo T/NK tissue-resident attivato si associa alla GvHD acuta II–IV

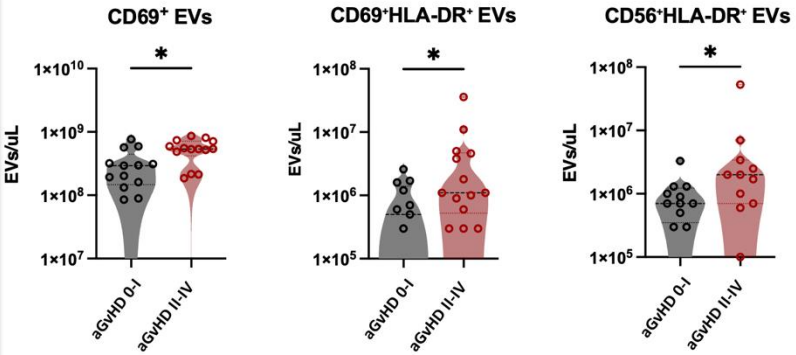
MACSPlex

screening di 37 marcatori (nMFI)



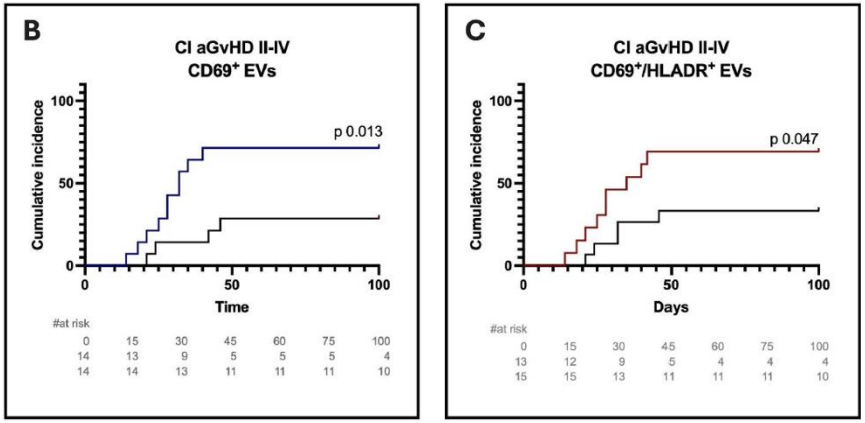
ExoView

quantificazione assoluta e co-espressione (EV/µL)



Predittività di EV CD69⁺ nei confronti della GvHD acuta

Incidenza cumulativa di aGvHD II–IV (high vs low, cut-off mediana)



Analisi multivariata (Cox)

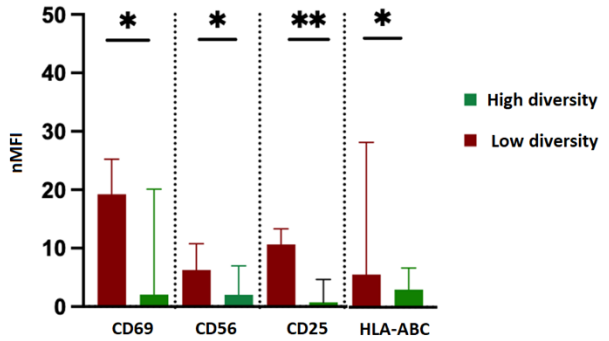
EV (high vs low)	HR (IC 95%)	p
CD69⁺	**7,94 (2,52–25,03)**	**<0,001**
CD69⁺HLA-DR⁺	**4,79 (1,60–14,34)**	**0,005**
CD56⁺HLA-DR⁺	2,93 (0,96–9,00)	0,060

Modelli aggiustati per età del ricevente e tipo di donatore; cut-off alla mediana dei valori ExoView

Livelli elevati di EV CD69⁺ e CD69⁺HLA-DR⁺ identificano i pazienti a maggior rischio di aGvHD

Associazione tra microbiota pre-trapianto e EVs NK/T attivate

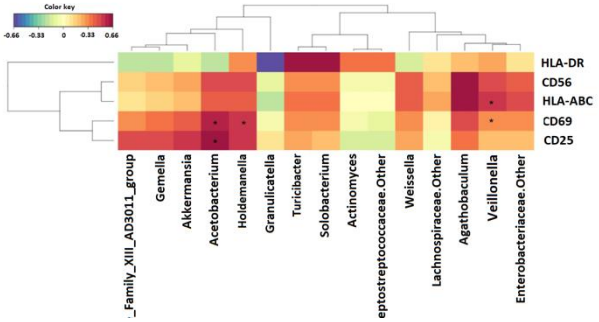
Diversità del microbiota ed EV pre-trapianto



nMFI delle EV per indice di Shannon alto vs basso

Minore diversità → più EV attivate

Taxa correlati con le EV NK/T attivate



** correlazione di Spearman, p < 0,05*

Veillonella

taxa orale, frequentemente traslocato nell'intestino

↑ EV CD69⁺

↑ EV HLA-ABC⁺

Spearman, p < 0,05

Le EV come possibile biomarker ponte tra disbiosi intestinale e disregolazione immunitaria

In linea con la letteratura: commensali produttori di butirrato (*Clostridium, Faecalibacterium, Anaerobutyricum*) arricchiti nei pazienti 0–I; *Actinomyces* e *Staphylococcus* nei II–IV

Fattori clinici: Intervallo di wash-out dalla chemioterapia pre- trapianto e terapia antibiotica

Correlazioni di Spearman (ρ) con i determinanti clinici pre-trapianto

		Esposizione antibiotica	Intervallo libero da chemioterapia
Microbiota	Diversità (Shannon)	**-0,49***	**0,59***
	Atopobiaceae	0,10	**0,46***
	Lactobacillus	0,10	**0,44***
	Thomasclavelia	0,10	**-0,44***
	Weissella	**0,54***	0,01
Vescicole extracellulari	EV CD25⁺	-0,04	**-0,49***
	EV CD69⁺	0,08	**-0,40***
	EV CD56⁺	-0,04	-0,34
	EV HLA-ABC⁺	-0,04	-0,28

** p < 0,05*

Antibiotici

agiscono sul solo microbiota: ↓ diversità e shift di composizione (*Weissella*)

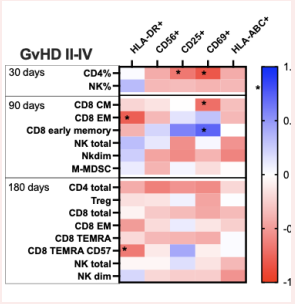
Chemioterapia

un intervallo libero più lungo si associa a ↑ diversità del microbiota e a ↓ EV NK/T attivate

EV NK/T attivate pre-trapianto si associano a traiettorie di ricostituzione distinte

↑/↓ correlazione con le EV pre-trapianto (Spearman, p < 0,05)

giorno +30 — giorno +90 — giorno +180



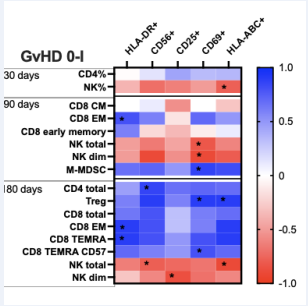
↓ CD4⁺

↓ CD8 CM

↑ CD8 early memory

–

Recupero CD4 ritardato



↓ NK

↓ NK, NK dim

↑ M-MDSC

↓ NK, NK dim

↑ CD4

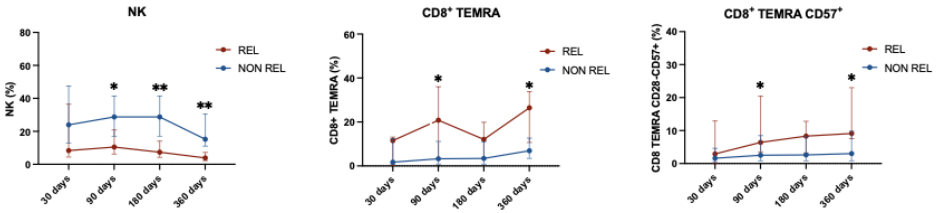
↑ Treg

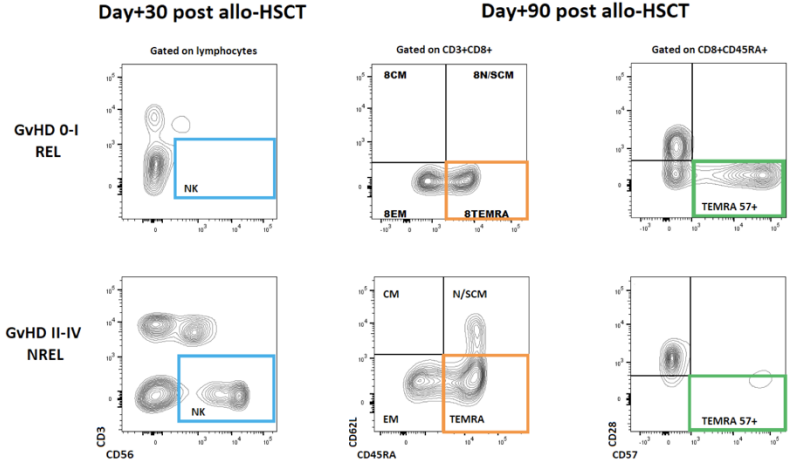
↑ CD8 TEMRA CD57⁺

Recupero tardivo Treg ma anche TEMRA senescenti

Alcune traiettorie comuni si associano al rischio di recidiva

Traiettorie di ricostituzione nella coorte estesa (n = 55); analisi della recidiva su 45 pazienti valutabili, 11 eventi





Recidiva

- più frequente nei pazienti senza aGvHD II–IV
- minori livelli NK early-late
- espansione di CD8 TEMRA e TEMRA CD57⁺ dato controverso in letteratura riguardo la protezione dal rischio di recidiva (espansione early) ed al contrario un rischio aumentato (late)

Li, 2026; Mazziotta, 2025 Nat Commun

Basso numero di eventi , dato da validare su coorti più ampie e multicentriche
Dato controverso in letteratura

Conclusioni

- I pazienti che sviluppano aGvHD II–IV presentano già prima del trapianto un pattern EV circolanti associato ad un fenotipo T/NK con markers di attivazione (HLA-ABC$^+$, CD25$^+$, CD56$^+$, CD69$^+$)
- Livelli elevati di EV CD69$^+$ e CD69$^+$HLA-DR$^+$ si associano in modo indipendente a un maggior rischio di aGvHD II–IV
- Ridotta diversità e taxa specifici del microbiota si associano al fenotipo EV predittivo di aGvHD; un breve intervallo libero da chemioterapia contribuisce a questo profilo
- Livelli di EV T/NK attivate pre-trapianto si associano a traiettorie distinte di ricostituzione immunitaria, lo stesso asse NK/TEMRA che in via preliminare si associa anche al rischio di recidiva

Il profilo EVs NK/T identificato nei pazienti con GvHD acuta si associa alle caratteristiche del microbiota intestinale, è influenzato dal tempo di wash-out dalla chemioterapia ed contribuisce a traiettorie di ricostruzione divergenti

Ringraziamenti



UO Oncoematologia Pediatrica

Prof. Riccardo Masetti
Prof. Arcangelo Prete
Dr. Davide Leardini
Dr. Edoardo Muratore
Dr. Francesco Venturelli
Dr. Francesco Baccelli
Dr.ssa Tamara Belotti
Dr. Gennaro Pagano
Dr.ssa Martina Colli
Dr.ssa Laura Pedretti
Dr.ssa Sara Cerasi
Dr.ssa Monica Franzoni

Laboratorio di Immunobiologia dei Trapianti e Terapie Cellulari (IBT)

Prof. Francesca Bonifazi
Prof. Massimiliano Bonafè
Dr.ssa Serena De Matteis
Dr. Gianluca Storci
Dr.ssa Irene Salamon
Dr.ssa Francesca Vaglio
Dr. Francesco Iannotta

Unit of Microbiome Science and Biotechnology, Dip. di Farmacia e Biotecnologie

Prof. M. Candela
Dr. Simone Rampelli
Dr.ssa Federica D'Amico

UO Gastroenterologia

Prof. G. Barabara
Prof. R. Barbaro

Grazie ai pazienti e alle loro famiglie · Ministero della Salute (RC-2026-2801295) · Fondazione Carisbo

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna
Policlinico S. Orsola-Malpighi

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA