**Il trapianto di midollo osseo da donatore familiare non compatibile nei pazienti affetti da malattie ematologiche maligne a cattiva prognosi.**

**BONE MARROW TRANSPLANTATION FROM HAPLOIDENTICAL RELATED DONOR IN PATIENTS WITH ADVANCED HEMATOLOGICAL DISEASES.**

**AUTORI:  
 Messina G.\*; Said Al Sayyad\*\*; Africa L.\*\*\***

***\* Responsabile Unità Operativa Semplice Centro Trapianti Midollo Osseo “A. Neri”, Azienda Ospedaliera “Bianchi-Melacrino-Morelli”, Reggio Calabria.***

***\*\* Direttore Unità Operativa Complessa di Radioterapia Azienda Ospedaliera “Bianchi- Melacrino-Morelli” Reggio Calabria.***

***\*\*\* Unità Operativa Complessa di Anatomia Patologia Azienda Ospedaliera “Bianchi-Melacrino-Morelli” Reggio Calabria*.**

Indirizzo e-mail Dr. Giuseppe Messina: [gspmessina@virgilio.it](mailto:gspmessina@virgilio.it)

**Parole chiavi**: trapianto aploidentico, neoplasie ematologiche, GVHD (Graft versus Host Disease).

**Key words**: haploidentical transplant, hematological neoplasm; GVHD (Graft versus Host Disease).

**Riassunto**

I pazienti affetti da leucemia ad alto rischio di recidiva e sprovvisti di donatore HLA compatibile hanno nel donatore familiare parzialmente compatibile (aploidentico) un’importante alternativa terapeutica per ottenere la guarigione.

In questo lavoro, riportiamo l’esperienza recente di quattordici pazienti con età mediana di 43 anni (r.6-58), affetti da Leucemia Acuta Mieloide (9 casi), Leucemia Acuta Linfoide (3 casi), Leucemia Mieloide Cronica in fase avanzata (2 casi), sottoposti a regime di chemioterapia non mieloablativa e infusione di midollo osseo aploidentico non manipolato.

La profilassi GVHD (Graft versus Host Disease) è consistita nell’uso della Ciclofosfamide per due giorni seguita da farmaci convenzionali quali il Tacrolimo e il Micofenolato Mofetile.

**Abstract**

Patients with leukemia at high risk of recurrence and lacking of HLA-matched donor have in haploidentical related donor an important therapeutic alternative.

In this study, we report the our recent experience of 14 patients with median age of 43 years (r. 6-58), affected by acute myeloid leukemia (9 cases) or acute lymphoid leukemia (3 cases) or advanced chronic myeloid leukemia (2 cases) with non-myeloablative conditioning regimen and infusion of unmanipulated haploidentical bone marrow.

The GVHD prophylaxis consisted of cyclophosphamide for two days followed by conventional drugs such as Tacrolimus and Mycophenolate Mofetile.

**Introduzione**

Il trapianto allogenico di midollo osseo da donatore familiare o volontario HLA compatibile rappresenta la migliore opzione terapeutica per guarire i pazienti affetti da leucemia acuta o cronica ad alto rischio.

Purtroppo però molti pazienti non dispongono di un donatore con queste caratteristiche.

Il rischio, pertanto, è la ricomparsa precoce della malattia e la preclusione a qualsiasi tipo di trattamento trapiantologico futuro.

La sola strada percorribile è un donatore familiare con cui il paziente condivide un aplotipo HLA per i locii A, B, C, e DR, ovvero solo parzialmente compatibile (1,2).

Il grado di compatibilità HLA tra donatore e ricevente nel trapianto di midollo osseo è di fondamentale importanza per il successo dello trapianto medesimo.

In effetti, è stato dimostrato come la frequenza delle principali complicanze da trapianto, ovvero il mancato attecchimento e la malattia trapianto contro ospite (GVHD), siano fortemente condizionate dal grado di compatibilità tra donatore e ricevente.

Infatti la comparsa di questi due eventi aumenta in rapporto al grado di disparità HLA (3).

In questo lavoro è presentata l’esperienza basata sull’uso di un regime di condizionamento definito non aggressivo, combinato all’infusione di cellule midollari non manipolate associate ad una profilassi verso la malattia trapianto contro ospite (GVHD) basata su alte dosi di Ciclofosfamide concentrata in due giorni e seguita da farmaci tradizionalmente utilizzati (Tacrolimo e Micofenolato Mofetile).

**Pazienti e Metodi**

In questo studio, approvato dal locale Comitato Etico e il cui primo paziente è stato arruolato nel Settembre 2010, sono stati inseriti al momento 14 casi.

Lo schema di condizionamento è raffigurato nella Figura 1 e si è ispirato al programma di Baltimora (4) con la sola sostituzione nel regime di condizionamento della Ciclofosfamide con il Thiotepa.

Le principali caratteristiche dei pazienti sono incluse nella seguente tabella 1.

Si tratta di pazienti con malattia avanzata e quindi con prognosi estremamente sfavorevole.

Il giorno dell’infusione il donatore è sottoposto a prelievo di midollo osseo in anestesia generale e, nella stessa giornata, il midollo osseo stesso viene reinfuso al paziente.

In sei trapianti il donatore è stata la madre, in sei uno dei figli, nei rimanenti due casi una sorella e uno zio.

In cinque casi, uno nella coppia donatore/ricevente era positivo per CMV.

In cinque casi era presente anche AB0 incompatibilità per gruppo sanguigno.

In tali casi, il paziente, nel caso in cui il titolo anticorpale fosse risultato >1:16, è stato sottoposto a una o due sedute di plasmaferesi nei giorni antecedenti l’infusione.

Cinque giorni dopo l’infusione (giorno+5) in concomitanza con l’inizio del secondo blocco delle profilassi GVHD, viene associato il fattore di crescita.

**Risultati**

Il numero mediano di cellule midollari infuso, aggiustato per peso corporeo ideale del paziente, è stato di 455x 10E6/kg (r. 180-796).

Tutti i pazienti tranne uno hanno attecchito.

L’andamento del trapianto e le più significative complicanze sono riassunte nella tabella 2.

Il paziente che non ha attecchito presentava una storia clinica ed ematologica complessa caratterizzata da due precedenti trapianti, dei quali uno allogenico ed uno stato di resistenza a tutte le terapie fino ad allora effettuate.

Nessun paziente è deceduto per complicanze legate alla procedura trapiantologica.

La necessità trasfusionale è stata trascurabile, considerato che i pazienti sono giunti al trapianto in buone condizioni cliniche e di buon controllo della malattia.

In effetti, la mediana di supporto trasfusionale in termini di globuli rossi e di concentrati piastrinici da aferesi è stata rispettivamente di 6 (r. 1-12) e 12 (r. 6-42).

La durata mediana dell’ospedalizzazione dal giorno dell’infusione è stata di 25 giorni (r. 21-48).

Nessun paziente dopo la dimissione è stato ricoverato nuovamente per complicanze legate al trapianto.

Da segnalare che tutti i pazienti hanno presentato almeno una riattivazione da CMV che è risultata rispondente alla terapia specifica con Ganciclovir.

Nella tabella 3 è indicato in maniera analitica l’outcome di ciascun paziente fino all’ultimo controllo ambulatoriale.

Dalle valutazioni descritte sono esclusi tre pazienti poiché hanno ancora un breve follow-up clinico ed ematologico.

**Commenti**

La diversità del sistema HLA tra donatore e paziente crea una barriera alla penetrazione delle cellule staminali all’interno del midollo e quando avviene, le cellule incontrano molte difficoltà nello svolgere le normali funzioni del sangue e in breve tempo perdono le loro capacità di maturazione e muoiono definitivamente.

La ricerca applicata dapprima sull’animale da esperimento e poi sull’uomo ha dimostrato negli anni che questo ostacolo può essere superato.

Esistono due strategie diverse ma accomunate da un comune denominatore ossia l’infusione di un grande numero di cellule staminali.

La prima strategia che ha visto nel gruppo di Perugia (5,6) il più importante e convinto assertore, prevede un regime di condizionamento estremamente aggressivo, avente lo scopo di abbattere ogni forma di resistenza neoplastica e immunologica nel paziente seguita dalla infusione di un grande numero di cellule staminali, *“megadose di cellule staminali CD34+”*, raccolte dal donatore mediante la stimolazione con fattore di crescita.

La seconda strategia consiste in un regime di condizionamento moderato seguito dall’infusione di un elevato numero di cellule midollari ricco di tanti fattori favorenti la crescita, la ripresa delle funzioni midollari e immunologiche; in tal caso le cellule sono prelevate al donatore in anestesia generale dalle creste iliache posteriori.

I vantaggi della prima strategia si basano sulla eradicazione rapida della malattia attraverso la combinazione di più farmaci a dosi molto elevate e assicurandosi un recupero ematologico rapido attraverso l’infusione di un numero di cellule staminali superiore a 10x10e6/kg.

In tal modo viene superata la resistenza del sistema HLA incompatibile donatore/ricevente con un meccanismo definito di diffusione passiva di cellule staminali.

Altro vantaggio è basato sull’infusione di un prodotto esclusivamente costituito da cellule staminali CD34+ e per tale ragione non sono necessarie profilassi farmacologiche per il controllo della malattia trapianto contro ospite (GVHD).

Questa complicanza è la più importante e tipica di qualsiasi forma di trapianto allogenico ed ha un incidenza variabile a seconda del tipo di trapianto.

Infatti, in corso di trapianto allogenico da donatore familiare compatibile essa sarà di circa il 30% dei casi fino ad arrivare fino al 50-60% nei trapianti da donatore volontario non familiare.

Nel tipo di trapianto di cui stiamo trattando il rischio, che sarebbe anche mortale, è più elevato se non fosse adottata una sorta di profilassi biologica, ossia l’eliminazione in laboratorio della componente linfocitaria dal prodotto di inoculo senza ulteriori terapie aggiuntive.

Il limite principale è insito nella tecnica di manipolazione stessa e cioè la collezione di un prodotto cellulare estremamente purificato, ossia costituito solo da cellule staminali CD34+ ma privo di tutte le altre componenti cellulari, soprattutto linfocitarie, necessarie per un rapida ricostituzione immunologica.

Tutto ciò espone il paziente a tre eventi rappresentati a:

1. rischio di recidiva poiché manca l’effetto immunologico delle cellule linfoidi contro eventuali cellule neoplastiche risultate resistenti alle alte dosi di chemioterapia; in questo caso, laddove sia possibile, si seleziona il donatore in funzione di talune peculiarità immunologiche confrontate con il donatore;
2. mancato attecchimento per cui potrebbe rendersi necessario un secondo trapianto;
3. complicanze infettive. A tal proposito la ripresa immunologica intesa sia in termini quantitativi che qualitativi in questo tipo di trapianto richiede fino a due anni di tempo. Durante questa fase il paziente è esposto ad una serie di complicanze infettive soprattutto virali, protozoarie e fungine che purtroppo spesso sono causa di morte anche tardiva del paziente.

Da aggiungere a tutto ciò, una qualità di vita molto limitata poiché condizionata da ricoveri ripetuti e da quasi giornaliere presenze presso i Day Hospital.

La seconda strategia propugnata dal gruppo di Baltimora (4,7) comprende la somministrazione di farmaci a dosaggi non elevati combinati al trattamento radioterapico permettendo così di esporre a meccanismi di azione multipli le cellule tumorali verso le quali le stesse non sono preparate a difendersi e quindi sono più facilmente aggredibili.

Nello stesso tempo la somministrazione di dosaggi non particolarmente elevati di chemioterapici estende questa procedura trapiantologica anche a pazienti di età avanzata (>65 anni).

L’infusione di un elevato numero di cellule midollari (>350x10E6/kg) non sottoposte ad alcuna manipolazione permette un recupero emopoietico ma, soprattutto, immunologico già completo dopo il terzo mese dal trapianto, proteggendo o, comunque, riducendo in maniera significativa il rischio di insorgenza della GVHD, nonché garantendo un’azione immunologica efficace contro la malattia e, nello stesso tempo, proteggendo verso l’insorgenza di complicanze infettive.

Gli svantaggi teorici sono rappresentati soprattutto dal rischio GVHD, posto che nel prodotto trapiantato sono contenute anche cellule linfoidi, che sono le cellule effettrici le quali, come si diceva in precedenza, sono responsabili di questo evento.

Il problema è stato affrontato attraverso l’utilizzo di farmaci nel dopo trapianto che riescono a controllare con successo questo problema senza condizionare il buon esito del trapianto sul versante della malattia.

In particolare, l’uso della Ciclofosfamide (8,9,10), un antico e sempre valido farmaco utilizzato nel trattamento di tante patologie di tipo neoplastico e immunologico, ha positivamente stravolto la storia di questa tecnica trapiantologica.

Infatti, questo farmaco è capace di bloccare l’azione dannosa delle cellule linfocitarie preservando contemporaneamente le cellule staminali, posto che queste ultime sono provviste di meccanismi biochimici protettivi.

L’altro limite è che la procedura in oggetto trova applicazione solo da pochi anni per cui mancano follow-up di lunga durata che possano consolidare queste esperienze.

Il nostro lavoro partendo dall’esperienza del gruppo di Baltimora e dall’osservazione che il principale problema insoluto erano le recidive, ha apportato una modifica nel regime di condizionamento.

In pratica è stata sostituita la Ciclofosfamide, farmaco utilizzato soprattutto come immunomodulatore nel post-trapianto ma che nel programma di Baltimora era contemplato anche nello schema di condizionamento al trapianto con un farmaco, il Thiotepa, che oltre che essere un ottimo immunomodulatore è anche un potente farmaco mieloablativo, cioè capace di abbattere una grossa quantità di cellule neoplastiche.

I dati in nostro possesso, pur essendo condizionati dalla casistica piccola e da un breve follow-up, possono essere considerati incoraggianti.

Intanto è una procedura sicura, infatti, nessun paziente è deceduto per la tossicità dei trattamenti.

Le principali complicanze osservate come la febbre e le mucositi sono state di grado minimo e si sono risolte abbastanza rapidamente senza lasciare sequele sul paziente.

Tutti i pazienti hanno presentato un recupero della funzionalità emopoietica con modalità sovrapponibili ad un trapianto familiare da donatore HLA compatibile.

Tutto ciò ha determinato una drastica riduzione delle complicanze di tipo infettivo e la durata della ospedalizzazione.

L’incidenza della GVHD è risultata trascurabile e non ha compromesso in alcun modo né la qualità della vita né ha impattato negativamente sul controllo della malattia.

Infatti, tenendo conto della gravità delle patologie avviate a trapianto soltanto tre pazienti sono deceduti a causa della malattia.

Questo evento, in particolare, è stato osservato in pazienti in precedenza pesantemente trattati e con una malattia molto avanzata.

In conclusione, si può affermare che se ad un paziente viene posta diagnosi di emopatia, soprattutto leucemia acuta con fattori prognostici sfavorevoli, trova indicazione assoluta lo studio HLA con i familiari in senso sia verticale (genitori) sia in senso longitudinale (sorelle e fratelli).

Nella tabella 4 sono riassunte le patologie più frequenti per cui trova indicazione un trapianto da donatore familiare non compatibile.

La mancanza di un donatore compatibile porterà all’attivazione del registro internazionale di donatori volontari o da cordone ombelicale.

Il mancato reperimento di un donatore volontario impone l’identificazione nel contesto della famiglia di un donatore idoneo sia pur parzialmente compatibile.

Pertanto, si può concludere che, un paziente per il quale ci sia l’indicazione ad un trapianto allogenico, deve essere certamente avviato ad uno di questi percorsi per assicurare il miglior trattamento finalizzato in ultimo alla guarigione.

Figura 1: Schema di trattamento



**Tabella 1: Caratteristiche dei pazienti**

|  |  |
| --- | --- |
| N. pazienti | 14 |
| Età mediana (range) | 43 (6-58) |
| Sesso (M/F) | 7/7 |
| Patologia | 9 AML, 3 ALL, 2 Leucemia Mieloide Cronica (CML) |
| Stato al trapianto | 4 I Remissione Completa ad alto o intermedio rischio molecolare e/o citogenetico; 4 in II Remissione Completa ad alto o intermedio rischio molecolare e/o citogenetico; 1 in recidiva ; 2 in fase accelerata di CML |
| Pazienti con precedenti trapianto autologo | 5 |

**Tabella 2: Outcome del trapianto**

|  |  |
| --- | --- |
| Recupero mediano granulociti neutrofili >500 | 18 gg (r. 14-36) |
| Recupero mediano piastrine >20.000 | 24 gg (r.16-65) |
| Febbre si/no | 4/7 |
| Altre complicanze | Mucosite grado 1: 7 casi; grado 2: 4 casi; ematuria 2 casi; discite 1 caso |
| GVHD acuta | 2/11 valutabili |
| GVHD cronica | 0/11 valutabili |

**Tabella 3: Risposta trapianto e stato attuale**

Paziente N Risposta trapianto Vivente Causa decesso Mesi follow-up

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | RC | si |  | 7 |
| 2 | RC | si |  | 16 |
| 3 | RC | si |  | 14 |
| 4 | Malattia | no | Malattia | 12 |
| 5 | RC | si |  | 12 |
| 6 | Shock | no | Shock | 6 |
| 7 | RC | si |  | 10 |
| 8 | RC | si |  | 24 |
| 9 | RC | no | MOF | 9 |
| 10 | RC | no | Malattia | 3 |
| 11 | RC | no | Malattia | 2 |
| 12 | Too early | si |  | 1 |
| 13 | Too early | si |  | 1 |
| 14 | Too early | si |  | 1 |

**Legenda**: RC (Remissione Completa); Too early (risposta non ancora definitiva); MOF: Multi Organ Failure.

**Tabella 4: Indicazioni al trapianto da donatore familiare non compatibile**

|  |
| --- |
| **Non donatore consanguineo o da registro donatori volontari HLA compatibile**  **AML o ALL con le seguenti caratteristiche:**   * **Fallimento di una prima linea di chemioterapia** * **Remissione Completa dopo II linea di induzione** * **II remissione completa o precoce recidiva** * **I remissione completa con alto rischio di recidiva per:** * **alterazioni citogenetiche** * **AML secondaria a chemio e/o radioterapia** * **AML secondaria a sindrome mielodisplastica**   **Linfoma non Hodgkin e Linfoma di Hodgkin recidivato dopo trapianto autologo**  **Leucemia Mieloide Cronica resistente agli inibitori Tirosin Kinasici** |

**References:**

1. *Horton R. Gene map of the extended human major histocompatibility complex. Nature Reviews Genetics. 2004; 5: 889-99.*
2. *Klein J, Sato A. HLA system.* ***NEJM****. 2000; 343: 782-6.*
3. *Anasetti C, Beatty PG, Storb R, et al. Effect of HLA incompatibility of graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma.* ***Hum Immunol****. 1990; 29: 79-91.*
4. *O’Donnell PV, Luznik L, Jones RJ, et al. Non myeloablative bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched related donors using posttransplantation cyclophosfamide.* ***Biol Blood Marrow Transplant****. 2002; 8: 377-86.*
5. *Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high risk acute leukemia with T-cell depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype.* ***NEJM.****1998; 339: 1186-93.*
6. *Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, et al. Full haplotype mismatched hematopoietic stem cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse.* ***JCO*** *2005; 23: 3447-3454.*
7. *Luznik L, O’Donnell P, Symons H F, et al. HLA- Haploidentical Bone Marrow Transplantation for Hematologic Malignancies Using Nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation Cyclophosphamide.* ***Biology and Blood and Marrow Transplantation****. 2008;14: 641-50.*
8. *Mayumi H, Umesue M, Nomoto K. Ciclophospahamide-induced immunological tolerance: an overview.* ***Immunobiology****. 1996; 195:129-39.*
9. *Luznik L, Bolanos-Meade J, Zahurak M, et al. High-dose Cyclophosphamide as single-agent, short course prophylaxis of graft versus host disease.* ***Blood****. 2010; 16: 3224-30.*
10. *Waller EK, Giver CR, Rosenthal H, et al. Facilitating T-cell immune reconstitution after haploidentical transplantation in adults.* ***Blood Cells Mol Dis****. 2004; 33: 233-7.*