

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E PATOLOGIA SPERIMENTALE**

Ciclo XXII

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: MED/08

**PROTOCOLLO PER L'IMPIEGO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI
(MSC) NELLA PROFILASSI E TERAPIA DELLA G_vHD ACUTA INSORTA IN
BAMBINI AFFETTI DA TUMORE SOLIDO SOTTOPOSTI A TRAPIANTO
ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE**

Presentata da: DOTT.SSA CLAUDIA CASTELLINI

Coordinatore Dottorato

Relatore

PROF. SANDRO GRILLI

PROF. ANDREA PESSION

Esame finale anno 2011

INDICE

Introduzione	pag 2
I tumori solidi dell'età pediatrica	pag 3
Il trapianto di cellule staminali emopoietiche nei tumori solidi dell'infanzia	pag 11
Graft versus Host Disease	pag 15
Cellule Staminali Mesenchimali	pag 20
Obiettivi dello studio	pag 24
Materiali e Metodi	
Coltura ed espansione delle cellule stromali mesenchimali	pag 25
Valutazione citofluorimetrica	pag 26
Valutazione Micoplasma mediante PCR	pag 27
Differenziamento in senso adipogenico	pag 28
Colorazione per adipociti	pag 28
Preparazione lisato piastrinico	pag 29
Pazienti	pag 29
Protocollo clinico	pag 32
Discussione e Risultati	pag 35
Bibliografia	pag 43

INTRODUZIONE

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche (TCSE) rappresenta a tutt'oggi la terapia di scelta per numerose patologie, sia oncologiche sia non oncologiche.

Le cellule staminali emopoietiche utilizzate possono essere prelevate dal paziente (TCSE autologo) o da un donatore compatibile (TCSE allogenico), con differente indicazione a seconda della patologia sottostante e delle condizioni generali del paziente.

Nell'ambito delle patologie oncoematologiche dell'età pediatrica, il trapianto allogenico è stato per lungo tempo riservato alle malattie emolinfoproliferative, mentre i tumori solidi venivano trattati con chemioterapia ad alte dosi seguita dalla reinfusione di cellule staminali emopoietiche autologhe.

Rispetto al TCSE allogenico, il trapianto autologo ha il vantaggio di essere applicabile a tutti i pazienti e di essere gravato da minori morbilità e mortalità; tuttavia, il problema principale legato a questa procedura è rappresentato dalla recidiva della patologia di base, ed i risultati ottenibili con il TCSE autologo nei tumori solidi del bambino hanno raggiunto lo zenit.

Per migliorare ulteriormente l'outcome di questi pazienti si è pensato di integrare tale procedura con altre strategie terapeutiche, che si avvalessero di differenti meccanismi d'azione rispetto alla chemioterapia sovramassimale. In questo contesto il TCSE autologo ha assunto il significato di procedura di debulking, preceduta o seguita da altri trattamenti, quali immunoterapia, terapia differenziante, terapia antiangiogenetica.

Del tutto recente è l'introduzione, in questi protocolli di trattamento multimodali, del TCSE allogenico, in quanto, a causa di una cattiva selezione dei pazienti, i risultati ottenuti con l'allogenico nei tumori solidi sono stati per lungo tempo assolutamente deludenti.

Uno dei principali problemi legati all'impiego di cellule staminali emopoietiche allogeniche è lo sviluppo della reazione del trapianto contro l'ospite o Graft versus Host Disease (GvHD), che rappresenta ancora oggi un importante fattore di mortalità.

Nonostante i regimi di profilassi attuati, questa complicanza arriva ad essere gravata da una mortalità fino al 30% nelle forme più severe; in questi casi, la terapia con steroidi costituisce il trattamento di prima scelta, in grado di ottenere una risposta nel 30-50% dei casi; tuttavia, le forme di GvHD severa resistenti al trattamento corticosteroidico sono spesso gravate da una prognosi infausta.

Per tale motivo è di grande interesse la ricerca di nuovi ed ulteriori approcci terapeutici che possano risultare efficaci nei confronti di queste forme di GvHD.

In questo ambito si inserisce la ricerca sulle cellule staminali mesenchimali (MSC). Le MSC sono, infatti, cellule multipotenti, in grado di differenziare verso numerosi tessuti di origine

mesenchimale; esse favoriscono l'attecchimento delle cellule staminali emopoietiche in un setting allogenico, promuovono la ricostituzione tissutale e sono dotate di proprietà immunoregatorie. Quest'ultima caratteristica è appunto quella che fa delle cellule staminali mesenchimali un interessante campo di studio per la ricerca di nuovi approcci terapeutici alle forme di GvHD severa resistenti al trattamento corticosteroidico.

I TUMORI SOLIDI DELL'ETA' PEDIATRICA

Nell'ambito dei tumori solidi dell'età pediatrica, dopo i tumori cerebrali che risultano i più frequenti, un ruolo importante sia per incidenza sia per mortalità rivestono sicuramente il Neuroblastoma ed i Sarcomi delle ossa e delle parti molli.

Neuroblastoma

Il neuroblastoma (NB) costituisce il più frequente tumore solido dell'età pediatrica dopo i tumori cerebrali. Si presenta in forma metastatica alla diagnosi in più di due terzi dei pazienti, ed in questi casi rappresenta la principale causa di morte nei bambini come singola patologia neoplastica. Nonostante il miglioramento dei risultati ottenuto con l'impiego di protocolli di terapia di induzione sempre più aggressivi e schemi di consolidamento con chemioterapia ad alte dosi seguita da infusione di cellule staminali autologhe, la sopravvivenza a lungo termine di questi pazienti non supera il 25%.

Infatti, a dispetto del miglioramento delle percentuali di risposta iniziale, ancora oggi, all'incirca il 20-25% dei pazienti non risponde alla terapia di prima linea, ed oltre il 60% dei bambini recidiva entro pochi anni dalla diagnosi¹⁻³.

In questo gruppo di pazienti, il cui numero complessivo nella popolazione italiana è stimabile intorno ai 20-30 per anno, le possibilità di guarigione sono inferiori al 5% e non sono disponibili opzioni terapeutiche di provata efficacia.

Il problema principale sembra essere la presenza di cloni resistenti; il NB, come altre neoplasie maligne, è costituito da popolazioni cellulari eterogenee anche per quanto riguarda la sensibilità verso chemio e radioterapia.

È essenziale pertanto intensificare e diversificare il trattamento per eliminare il prima possibile questi cloni resistenti già presenti alla diagnosi o che si sviluppano durante il trattamento.

Sarcomi delle parti molli

I Sarcomi delle parti molli (SPM) sono un gruppo eterogeneo di neoplasie che originano dal mesenchima embrionario e mostrano diverse linee di differenziazione in rapporto al tessuto dal quale traggono origine, ossia principalmente dal tessuto muscolare, connettivo, adiposo, vascolare, cartilagineo, osseo.

Per alcuni sarcomi il grado di indifferenziazione è così elevato che risulta difficile l'identificazione istologica.

Questi tumori sono più rari nei bambini che negli adulti e costituiscono circa il 10% di tutti i tumori maligni pediatrici; il rapporto maschi/femmine è nell'ordine di 1,4:1.

In generale, l'eziologia dei SPM non è nota, ma fattori genetici possono avere un ruolo importante, come dimostrato dall'associazione con alcune sindromi, quali la Li-Fraumeni Cancer Family Syndrome, la neurofibromatosi, la sindrome di Gorlin, oltre ad una maggior incidenza di difetti del tratto genito-urinario e del sistema nervoso centrale ⁴.

Il SPM più comune è il *Rabdomiosarcoma* (RMS), che origina dalle cellule mesenchimali embrionarie che danno origine al muscolo striato. Il RMS è il settimo più frequente tumore per i pazienti di età inferiore ai 15 anni, con un'incidenza annuale di 4-5 casi per milione.

Il picco di incidenza è nella prima infanzia, con un'età mediana di 5 anni.

Nell'adulto il RMS è una patologia estremamente rara e con prognosi complessivamente più severa rispetto al paziente pediatrico.

Per quanto concerne l'aspetto istologico, sono descritti alcuni sottotipi di RMS con valore prognostico differente:

- RMS botrioide e RMS leiomiomatoso, a prognosi migliore;
- RMS embrionale (70-80% di tutti i RMS), a prognosi intermedia;
- RMS alveolare e la sua variante solido-alveolare, a prognosi peggiore.

Nella maggior parte dei RMS alveolari si riscontra una traslocazione reciproca specifica tra il cromosoma 2 ed il cromosoma 13, t(2;13)(q35;q14). È stata anche descritta sporadicamente una traslocazione reciproca tra il cromosoma 1 e il 13, t(1;13)(p36;q14). In entrambe le traslocazioni sono coinvolti da un lato il gene FKHR (cromosoma 13) e dall'altro il gene Pax3 o Pax7 (rispettivamente sui cromosomi 2 e 1). I prodotti di tali traslocazioni sono dei fattori di trascrizione con potenziali capacità tumorigeniche e attività trascrizionale più spiccata dei prodotti dei geni Pax normali. Inoltre è frequentemente presente un'amplificazione dell'oncogene MYCN.

Nei RMS embrionali è invece frequente una perdita di eterozigosi del braccio corto del cromosoma 11.

Nell'ambito dei RMS localizzati, i fattori che maggiormente influenzano la prognosi sono l'età (prognosi migliore per i pazienti tra 1 e 9 anni), le caratteristiche istopatologiche (istologia favorevole o sfavorevole, istotipo chemiosensibile o no), la presenza di metastasi, in particolare ossee o midollari, la sede anatomica di insorgenza e le caratteristiche biologiche della malattia⁵⁻⁷. Indipendentemente da tutti questi fattori, è evidente che la risposta al trattamento convenzionale è un fattore determinante per la sopravvivenza dei pazienti. Infatti, in caso di mancata remissione completa al termine della terapia di prima linea l'EFS e l'OS a 5 anni sono del 13% e 14.5%, rispettivamente⁷.

I RMS metastatici rappresentano circa il 20% di tutti i RMS. In questo gruppo di pazienti la sopravvivenza varia dal 20 al 30% nei diversi studi.

Una recente analisi multivariata ha permesso di identificare come fattori prognostici sfavorevoli:

- 1) età minore di 1 anno o maggiore di 10 anni;
- 2) presenza di metastasi ossee o midollari;
- 3) metastasi multiple;
- 4) multiple sedi di metastasi⁷.

È pertanto possibile suddividere i pazienti affetti da RMS in classi di rischio in base al numero di fattori prognostici sfavorevoli presenti:

- gruppo 1, no fattori prognostici sfavorevoli (OS a 5 anni, 78%);
- gruppo 2, un solo fattore sfavorevole (OS a 5 anni, 40%);
- gruppo 3, due fattori sfavorevoli (OS a 5 anni, 8%);
- gruppo 4, più di due fattori sfavorevoli⁷.

E' evidente quindi che esiste un gruppo di pazienti, quelli con due o più fattori sfavorevoli alla diagnosi, che non possono essere guariti con le terapie "convenzionali" finora utilizzate.

Per quanto concerne i RMS recidivati, dopo un evento la sopravvivenza dei pazienti è complessivamente bassa, risultando inferiore al 30%⁸.

Per quel che riguarda i RMS localizzati, l'esperienza pediatrica ha recentemente identificato quattro fattori associati con una bassa sopravvivenza:

- sottotipo alveolare (rischio relativo [RR], 2.0);
- sede parameningea o "altre sedi" (RR, 2.6);
- recidiva metastatica (RR, 3.1);
- recidiva in corso di terapia (RR, 2.3).

L'assenza di tutti questi fattori di rischio identifica un gruppo (12% dei pazienti) a prognosi favorevole, con una sopravvivenza a 5 anni del 71.8%, mentre pazienti con due o più fattori di rischio non hanno praticamente alcuna possibilità di sopravvivenza⁹.

Nel caso di pazienti con RMS metastatico alla diagnosi, dopo una recidiva i pazienti lungo sopravvivenza sono aneddotici.

A differenza di quanto accade per il RMS, l'incidenza dei Sarcomi delle Parti Molli non RMS (SPMnRMS) è sensibilmente più elevata nell'adulto, con 2 nuovi casi l'anno su 100.000 abitanti. I SPMnRMS includono un gruppo eterogeneo di neoplasie con caratteristiche istologiche e biologiche diverse.

Nonostante la diversità istologica, i SPMnRMS presentano caratteristiche comuni, come la invasività locale, le recidive loco-regionali e la metastatizzazione ematogena soprattutto a livello polmonare.

Si manifestano tipicamente con masse di grosse dimensioni a rapido accrescimento asintomatico; meno frequentemente sono associati a emorragie gastro-intestinali, a sintomi subocclusivi o neurologici causati da infiltrazione del retroperitoneo, delle strutture nervose o degli organi addominali.

L'aspetto istologico è naturalmente molto diverso per i diversi SPM.

Un tentativo di valutare l'aggressività e quindi la prognosi dei SPMnRMS è stato l'applicazione di un sistema di grading comune, che ne valuta la cellularità, la differenziazione, il pleiomorfismo, la necrosi ed il numero di mitosi.

Attualmente si utilizzano alcune scale di grado istologico, tra cui il sistema a tre gradi (basso, intermedio, alto), che è riconosciuto dall'American Joint Commission on Cancer (AJCC) ed è quello maggiormente utilizzato nel mondo ¹⁰.

Molti patologi considerano l'attività mitotica e il grado di necrosi i fattori più importanti nel determinare il grading istologico.

Oltre a ciò, nei tumori a cattiva prognosi e con elevato grado di malignità, si aggiungono altri parametri indipendenti, quali l'iper-espressione e le mutazioni della p53 e l'alto indice di proliferazione cellulare ¹¹.

Nella maggior parte dei SPMnRMS sono state identificate anomalie molecolari. I sarcomi sinoviali nel 90% dei casi contengono una traslocazione specifica, t(X;18)(p11.2;q11.2), che provoca la fusione della regione N-terminale di SYT con la regione COOH-terminale di SSX1 o SSX2. Nel 70% dei sarcomi a cellule chiare è presente la traslocazione t(12;22)(q13;q12), con fusione di EWS con ATF1. Nel 100% dei tumori desmoplastici è presente la caratteristica traslocazione t(11;22)(q13;q12), con fusione di EWS con WT1.

Sono state identificate ulteriori anomalie molecolari riconoscibili in quasi tutti i sarcomi non rabdomiosarcoma.

Un approccio multimodale che includa chirurgia, chemioterapia e radioterapia è necessario per il trattamento dei pazienti con SPM. L'intensità di questi trattamenti deve essere pianificata in base ai fattori prognostici noti ed ai possibili effetti collaterali. Il raggiungimento del controllo locale del tumore è necessario per la guarigione e può essere raggiunto con l'utilizzo di chirurgia e/o radioterapia. La chemioterapia è solitamente efficace nel ridurre le dimensioni del tumore e nel distruggere le eventuali micrometastasi. Le percentuali di buona risposta del RMS alla chemioterapia variano dal 70 all'80%.

Diverse combinazioni di chemioterapici si sono dimostrate attive contro il RMS. I regimi più spesso utilizzati sono VAC (Vincristina, Actinomicina D, Ciclofosfamide), VACA (VAC più Adriamicina alternata ad Actinomicina-D), IVA (come VAC, ma sostituendo Ciclofosfamide con Ifosfamide) e VAIA (IVA con Adriamicina alternata ad Actinomicina-D).

Nei SPMnRMS la radicalità chirurgica è un fattore chiave per ottenere la guarigione dei pazienti. I farmaci efficaci sono in generale in numero minore rispetto a quelli attivi nel trattamento del RMS e sono rappresentati essenzialmente da Ifosfamide e Adriamicina, con percentuali di risposta quantificabili intorno al 30-40% a seconda dell'istotipo.

I SPM possono essere classificati, oltre che secondo le caratteristiche anatomopatologiche, anche in base alla loro chemiosensibilità.

Nonostante l'eterogeneità di questo gruppo di neoplasie alcuni fattori prognostici comuni possono essere identificati. La presenza di una malattia metastatica, l'impossibilità di una asportazione chirurgica completa del tumore, la mancata risposta al trattamento chemioterapico, la comparsa di una recidiva dopo il trattamento di prima linea rappresentano fattori gravemente sfavorevoli per i pazienti affetti da questi tumori

L'introduzione del trattamento multidisciplinare (chemioterapia intensiva, radioterapia e chirurgia) ha drammaticamente migliorato l'aspettativa di vita dei pazienti affetti da SPM localizzati.

In contrasto, la sopravvivenza dei pazienti affetti da SPM metastatici alla diagnosi o in recidiva (con l'eccezione dei GIST) non è migliorata negli ultimi 30 anni; in particolare, la prognosi dei pazienti con RMS metastatico alla diagnosi è inferiore al 30% a 5 anni, così come altri SPM metastatici (sarcoma indifferenziato, tumori desmoplastici a piccole cellule blu rotonde, sarcoma renale e altri) presentano una prognosi altrettanto severa¹².

Numerosi tentativi, con diverse combinazioni di farmaci o alte dosi di chemioterapia con supporto di cellule staminali emopoietiche (CSE) autologhe, anche sequenziali, sono stati effettuati nel tentativo di incrementare la sopravvivenza di questo gruppo di pazienti ad alto rischio, con risultati non conclusivi¹³⁻¹⁹.

In conclusione, nonostante i miglioramenti conseguiti con un intensivo trattamento multidisciplinare, esistono gruppi di pazienti che necessitano di approcci innovativi per poter sperare nella guarigione.

Questi pazienti ad altissimo rischio sono:

- a) pazienti con RMS localizzato che non raggiungono la remissione completa durante il trattamento di prima linea;
- b) pazienti con RMS o SPMnRMS metastatico alla diagnosi con fattori sfavorevoli o comunque dopo una recidiva;
- c) pazienti con una recidiva di RMS associata a fattori sfavorevoli;
- d) sarcomi delle parti molli non RMS che non raggiungano una remissione completa durante il trattamento di prima linea o che presentino una recidiva con caratteristiche sfavorevoli;
- e) pazienti con RMS o SPMnRMS dopo una seconda recidiva indipendentemente da altri fattori.

Sarcomi di Ewing/PNET

Il Sarcoma di Ewing (SE) fu descritto per la prima volta nel 1921 da James Ewing come un "tumore delle ossa lunghe di origine endoteliale, radiosensibile", e tale definizione fu mantenuta fino a metà degli anni '80, allorquando se ne evidenziò l'origine neuronale.

Il SE rappresenta il 16% di tutti i tumori delle ossa ed il 20% di tutte le neoplasie infantili, collocandosi, per frequenza, al secondo posto tra i tumori maligni primitivi delle ossa nell'infanzia e nell'adolescenza, con un picco d'incidenza nell'età compresa fra 1 e 15 anni.

Il SE si riscontra più frequentemente nella seconda decade di vita (64%), e raramente insorge in individui di età superiore ai 30 anni.

La sua maggiore incidenza in soggetti di sesso maschile e la netta prevalenza nella razza bianca, inducono a considerare l'importanza di fattori genetici e non ambientali nell'insorgenza della malattia ⁸.

Il SE ha un'incidenza di 2,5 casi per milione di popolazione per anno in Italia; nella razza bianca, l'incidenza è di 2,8 casi per milione per anno.

Tale neoplasia si localizza più frequentemente a livello dei tessuti ossei, dove si sviluppa erodendo la corticale dell'osso e quindi coinvolgendo, talvolta in modo cospicuo, le parti molli circostanti.

Il SE ha un'istogenesi di tipo neuroectodermico, in particolare pare derivi dai neuroni colinergici parasimpatici postgangliari dispersi nel corpo (ciò a differenza del neuroblastoma classico che origina dai neuroni adrenergici della midollare del surrene e del sistema nervoso simpatico).

E' stato possibile identificare questa origine osservando che le cellule del SE esprimono un fenotipo neuronale e contengono al loro interno colina acetiltransferasi. L'origine neurale è anche confermata dalle caratteristiche fenotipiche antigeniche ultrastrutturali e dalla capacità di differenziazione, nelle colture in vitro, in senso neurale ²⁰⁻²².

Il SE si inquadra in un gruppo di neoplasie definite "a piccole cellule blu rotonde" di cui fanno parte l'osteosarcoma a piccole cellule, il linfoma non Hodgkin, il neuroblastoma, ed il rabdomiosarcoma; oltre ad un sottogruppo che comprende i tumori a cellule rotonde con aspetti neuroectodermici.

Tra i tumori benigni che analogamente al SE possono presentare una lesione litica dell'osso: il granuloma eosinofilo e il tumore a cellule giganti.

L'osteosarcoma, il fibroistiocitoma maligno e le metastasi da tumori non ossei rappresentano, invece, le lesioni maligne che possono porre problema di diagnosi differenziale.

In età pediatrica particolare attenzione deve essere posta alla possibilità di errore diagnostico con il neuroblastoma, che può presentarsi con una massa addominale o toracica asintomatica non individuabile associata ad una singola metastasi ossea.

Per effettuare la diagnosi di tali neoplasie, è necessario ricorrere a metodiche di immunohistochimica, e non solo all'esame istologico ed all'osservazione degli aspetti ultrastrutturali.

Il SE e il PNET sono neoplasie caratterizzate da una specifica traslocazione che si esprime con un'elevata frequenza: la t(11;22) (q 24;12).

La caratterizzazione molecolare di questa alterazione cromosomica si è dimostrata essere la fusione del gene EWS sul cromosoma 22 con il gene FLI-1 sul cromosoma 11. Il gene EWS codifica per una proteina analoga a quelle che interagiscono con la doppia elica degli acidi nucleici (simile alla polimerasi II), mentre il gene FLI-1 codifica per un fattore di trascrizione ETS simile.

In rari casi il gene EWS si è fuso con una traslocazione diversa da t(11;22) con un omologo vicino al FLI-1 localizzato sul cromosoma 21q22, il gene ERG.

In più del 95% dei casi, la fusione dei geni avviene tra EWS e FLI-1 (dal 90% al 95%), mentre la fusione del gene EWS con un altro dei tre geni della famiglia ETS, ETV1, E1AF, e FEV, è stata trovata in rari casi di SE/PNET ^{23,24}.

L'identificazione di validi fattori prognostici è essenziale per individuare il trattamento più idoneo in rapporto al rischio di ricaduta del singolo paziente, tenendo conto quindi della necessità di intraprendere trattamenti terapeutici più aggressivi nei casi a prognosi peggiore.

Nelle forme localizzate la sede primaria influenza la prognosi in modo considerevole: si è visto che i pazienti con malattia localizzata alle estremità presentano una percentuale di sopravvivenza più elevata rispetto a quelli con forme localizzate al tronco (sopravvivenza a due anni: 92% vs 30%). Tali risultati riflettono anche il tipo di terapia locale che è possibile effettuare in rapporto alla sede stessa della malattia; infatti, nel caso di lesioni localizzate alla pelvi la prognosi risulta peggiore che nelle lesioni prossimali degli arti ed altrettanto queste rispetto a quelle distali che risultano più facilmente aggredibili dalla terapia locale.

Anche le dimensioni del tumore, la risposta alla chemioterapia ed i margini chirurgici adeguati sono importanti fattori che influenzano la prognosi dei pazienti con SE localizzato alla pelvi.

Nel trial CESS 81, primo studio sul SE effettuato in Germania da Paulussen et al, il volume del tumore è stato identificato come un importante fattore di rischio: la sopravvivenza libera da malattia a tre anni è significativamente differente fra i pazienti che hanno un tumore di dimensioni minori di 100 cm³ (sopravvivenza libera da malattia 80%) rispetto ai pazienti che hanno un volume tumorale maggiore di 100 cm³ (sopravvivenza libera da malattia 31%).

Dall'analisi multivariata effettuata da Aparicio et al. (Spagna 1998)²⁵ su 116 pazienti provenienti da un unico centro e seguiti per un periodo che va dal 1970 al 1993, è stata dimostrata l'importanza come fattori fortemente predittivi dell'esito clinico di: volume tumorale, valori di LDH sierico, livelli di albumina, conta leucocitaria, estensione della malattia, sintomi sistemici e valori dell'emoglobina.

In particolare, i livelli di LDH, l'albumina sierica, e la malattia metastatica sono fattori prognostici indipendenti in pazienti che ricevono la terapia convenzionale.

Tra i pazienti con malattia metastatica, il diametro tumorale >100 cm³, l'aumento dei livelli di LDH, la diminuzione dei livelli di albumina ed un aumento della conta leucocitaria sono correlati con una prognosi peggiore.

Una correlazione è stata trovata tra l'aumento dei livelli di LDH e l'ipoalbuminemia; entrambi i markers erano più frequenti tra i pazienti con sintomi a livello sistemico alla diagnosi.

Inoltre i valori di LDH sierico erano significativamente correlati con il diametro tumorale, con lo stato clinico, e con la sede primaria, mentre l'albuminemia era correlata con l'estensione della malattia.

Ulteriore importante fattore predittivo è risultato essere, in base a vari studi condotti fino ad ora, il grado di necrosi tumorale chemio-indotta.

Picci e coll. hanno elaborato un sistema di valutazione basato sull'individuazione al microscopio ottico della percentuale di cellule tumorali residue dopo trattamento chemioterapico^{26,26}. Sono stati quindi definiti tre gradi di necrosi:

GRADO 1: risposta alla chemioterapia quando il campione chirurgico contiene almeno un nodulo "macroscopico" di cellule vitali. E' definito un nodulo "macroscopico" un singolo nodulo più grande di un ingrandimento reale di 10X o noduli sparsi che individualmente sono più piccoli di un settore di 10X, ma l'area totale di questi noduli superi un settore di 10X;

GRADO 2: risposta alla chemioterapia quando il campione chirurgico contiene cellule vitali. La somma di tutte le aree è inferiore ad un settore di 10X;

GRADO 3: risposta chemioterapica quando nessuna cellula vitale può essere identificata nel campione chirurgico.

Lo studio condotto da Picci e coll. ha dimostrato il significato prognostico della necrosi tumorale nel SE delle estremità (sopravvivenza libera da malattia a cinque anni: 34% con Grado 1 di necrosi; 68% con Grado 2; 95% con Grado 3).

Importanti fattori prognostici sono anche le dosi di chemioterapici utilizzati; un fattore prognostico significativo è rappresentato dall'intensità di dose della Vincristina e della Actinomicina-D. Questo dato evidenzia il ruolo importante svolto dall'intensità di dose farmacologica nel SE.

Altro fattore prognostico di importante significato sembra essere rappresentato dal tipo di terapia locale effettuata. In alcuni studi si è infatti notato che il numero di ricadute locali e/o sistemiche era più alto in pazienti trattati localmente con radioterapia rispetto ai pazienti che erano stati sottoposti ad intervento chirurgico combinato con o senza radioterapia (16% vs 5%). In ultima analisi, l'assenza o la presenza di metastasi all'esordio di malattia rappresenta il fattore prognostico più importante, determinando una variazione nelle percentuali di sopravvivenza a lungo termine dal 50-70% nei tumori localizzati a meno del 30% in quelli metastatici.

E' importante considerare anche la sede della metastasi; infatti, la sopravvivenza libera da malattia a lungo termine risulta essere di circa il 30% in presenza di metastasi polmonari e/o pleuriche, mentre in caso di metastasi ossee la sopravvivenza scende addirittura allo 0% a due anni dalla diagnosi; incerta è la percentuale di sopravvivenza per le metastasi riguardanti il midollo osseo^{28,29}.

IL TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE NEI TUMORI SOLIDI DELL'ETÀ PEDIATRICA

La somministrazione di farmaci antiblastici a dosi mieloablativa è una pratica ormai estesa alla maggior parte dei tumori solidi del bambino.

Questa strategia terapeutica, che tiene in considerazione la chemiosensibilità del tumore trattato, consente di somministrare farmaci a dosi che sarebbero letali senza il supporto di cellule staminali emopoietiche e rende possibile la guarigione da alcuni tumori solidi particolarmente aggressivi o refrattari alle chemioterapie convenzionali.

Al momento attuale, la chemioterapia a dosi sovramassimali seguita da reinfusione di CSE autologhe, di origine midollare o da sangue periferico, utilizzata a lungo come “*ultima ratio*” nei tumori solidi dell'età pediatrica, integra con successo protocolli di terapia multimodale per il trattamento di neuroblastoma, sarcoma di Ewing, rhabdomyosarcoma e tumori cerebrali ad alto rischio, ed entra nei protocolli di linfoma non Hodgkin, malattia di Hodgkin e tumore di Wilms dopo recidiva.

La somministrazione, con i regimi di terapia ablativa, di farmaci alchilanti, capaci di un'azione citotossica dose-dipendente, non ciclo-specifica, efficaci anche nei confronti di cellule in fase G₀^{30,31} e dotati di una tossicità dose-limitante esclusivamente ematologica, ha consentito di incrementare notevolmente l'intensità di dose somministrata con il trapianto e di migliorare la sopravvivenza di pazienti affetti da tumori solidi.

Nonostante i buoni risultati ottenuti fino ad ora, una parte significativa di bambini affetti da tumore solido diventa resistente, refrattaria oppure recidiva precocemente dopo chemioterapia ad alte dosi e trapianto di CSE autologhe e, in assenza di terapie di recupero efficaci, progredisce rapidamente verso un esito fatale. L'osservazione di regressioni spontanee nel neuroblastoma o nel fibrosarcoma neonatale hanno suggerito che queste patologie presentino una sensibilità immunologica e che, in maniera estensiva, il sistema immunitario, attraverso la stimolazione ed il mantenimento di una *Graft versus Tumor*, poteva giocare un ruolo importante nel controllo di quei tumori solidi immunologicamente suscettibili quali il neuroblastoma, il sarcoma di Ewing, il rhabdomyosarcoma ed i linfomi di Hodgkin.

A partire dalla metà degli anni '50, incominciò ad emergere come gran parte dell'effetto antineoplastico del trapianto di CSE (TCSE) allogenico fosse legato non tanto alla terapia sovramassimale, quanto ad un effetto di reazione delle CSE del donatore verso i vari organi ed apparati del paziente e, ovviamente, verso le cellule tumorali. Queste due attività vennero definite, rispettivamente, Graft versus Host Disease (GvHD) e Graft versus Tumor (GvT) e si ipotizzò che esse fossero esercitate dai linfociti del donatore ed agissero in maniera indipendente dai trattamenti chemioterapici somministrati.

Barnes fu il primo ad indagare questo fenomeno, evidenziando che topi leucemici irradiati e sottoposti a trapianto di CSE erano in grado di eradicare la malattia se il donatore era un individuo allogenico, ma non nel caso di un donatore singenico³².

Le prime ipotesi applicate all'uomo si ebbero quando fu chiaro che i pazienti che andavano incontro al fenomeno della GvHD, acuta o cronica, presentavano una ridotta incidenza di recidive post-trapianto rispetto a coloro che non la sviluppavano³³⁻³⁵.

Entrambi i processi di GvH e GvT sono legati a differenze antigeniche tra donatore e ricevente nell'ambito del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA - *Human Leukocyte Antigen*), per quanto concerne sia le molecole di classe I (HLA-A, B, C), presenti su tutte le cellule nucleate dell'organismo, sia quelle di classe II (HLA-DP, DQ, DR), espresse solo da alcuni tipi cellulari, tra cui le cellule dendritiche, i linfociti B ed i macrofagi.

Le molecole del sistema HLA sono essenziali nell'attivazione e nella presentazione degli antigeni ai linfociti T, in particolare quelle di classe I per i linfociti T CD8+ e quelle di classe II per i CD4+. Tuttavia, anche le differenze tra donatore e ricevente per gli antigeni minori di istocompatibilità (*minor histocompatibility antigens* - mHag) giocano un ruolo importante nell'induzione della reazione GvH. Tali antigeni derivano da differenze tra donatore e ricevente nei peptidi presentati dalle stesse molecole di classe I; essi possono essere legati al polimorfismo di espressione di altre proteine non HLA o a differenze genomiche tra maschi e femmine³⁶.

I linfociti T del donatore riconoscono gli mHag del ricevente come estranei, dando l'avvio ad una reazione immunologica nei confronti dei tessuti normali dell'ospite, quali la cute, l'intestino ed il fegato.

Le molecole HLA possono essere anche espresse su cellule maligne del ricevente, divenendo quindi bersaglio della reazione GvT.

Un ulteriore possibile meccanismo della GvT potrebbe includere una reazione dei linfociti del donatore nei confronti di non ben definiti antigeni tumore specifici (*Tumor-Associated Antigen* - TAA).

Numerosi studi pre-clinici e clinici suggeriscono l'esistenza di un effetto GvT dopo trapianto allogenico in alcuni tumori solidi dell'adulto (carcinoma mammario, carcinoma renale e melanoma) e del bambino (neuroblastoma e sarcoma di Ewing)³⁷.

Tuttavia, la tossicità legata ai regimi di condizionamento mieloablativi che vengono impiegati in preparazione al trapianto allogenico convenzionale rappresenta un importante limite all'applicazione di tale procedura terapeutica in alcuni pazienti, specie quelli che presentano condizioni cliniche generali scadute o comunque non ottimali.

La tossicità di queste terapie si distingue in breve (nausea, vomito, mucosite, alopecia), medio

(malattia veno-occlusiva del fegato, polmonite interstiziale, insufficienza renale acuta), e lungo termine (disfunzioni gonadiche e tiroidee, anomalie dell'accrescimento, seconde neoplasie), quest'ultima particolarmente rilevante nel caso di pazienti in età pediatrica.

Dall'intensità del regime di condizionamento dipende inoltre un rischio di mortalità, la cui entità è influenzata dalla patologia di base, dal tipo di donatore, dalla compatibilità tra donatore e ricevente, dalle condizioni generali del paziente.

La profonda e duratura immunosoppressione indotta dai regimi di condizionamento convenzionali, inoltre, comporta una aumentata suscettibilità alle infezioni, siano esse di origine batterica, virale o fungina, che rappresentano a tutt'oggi una delle principali cause di morbilità e mortalità in questo setting di pazienti.

Allo scopo di ampliare il numero di pazienti che potessero beneficiare di un TCSE allogenico, anche nell'ambito dei soggetti affetti da tumore solido, e di potenziare l'effetto GvT, è nato il concetto di trapianto non mieloablativo (*Non-myeloablative Stem Cell Transplantation – NST*), così definito in quanto preceduto da un regime di condizionamento immunosoppressivo ma non mieloablativo.

Il NST nasce con l'obiettivo di creare una procedura in grado di garantire l'attecchimento delle CSE allogeniche, sfruttare l'effetto GvT, riducendo nel contempo i rischi legati al trapianto stesso, e si basa su tre strategie principali:

1. impiego di regimi di condizionamento ad intensità ridotta, immunosoppressivi per consentire l'attecchimento delle cellule reinfuse, non mieloablativi, allo scopo di ridurre, ma non necessariamente eliminare completamente, le cellule midollari dell'ospite. E' stato infatti dimostrato che, accanto alle reazioni GvH e GvT, i linfociti del donatore sono in grado di per sé di mediare un effetto *Graft versus Marrow* (GvM), tale da "creare spazio" all'interno del midollo osseo del ricevente senza la necessità di una terapia mieloablativa³⁸;
2. infusione dei linfociti del donatore insieme alle cellule staminali emopoietiche, al fine di indurre uno stato di tolleranza tra ricevente e donatore, mediante l'induzione di uno stato di chimerismo misto post-trapianto;
3. sviluppo di un effetto GvT, mediato dai linfociti T e dalle cellule Natural Killer (NK) del donatore, reso possibile da una più rapida e completa ricostituzione immunologica rispetto a quanto non si verifichi con le procedure trapiantologiche convenzionali^{39,40}.

Scopo del NST è sostanzialmente quello di indurre uno stato di tolleranza immunologica del donatore verso l'ospite, mediante l'introduzione delle cellule staminali emopoietiche in un organismo immunocompromesso e, una volta instaurata la tolleranza, di sfruttare l'effetto GvT

esercitato dai linfociti del donatore, immessi insieme al trapianto o, successivamente, in forma di *Donor Lymphocyte Infusion* (DLI).

In questo modo, i vantaggi del NST diventano:

- 1- bassa mortalità trapianto-correlata, legata alla ridotta intensità del regime di condizionamento;
- 2- azione antitumorale basata prevalentemente sull'effetto GvT, senza la necessità di terapie di preparazione ad alte dosi, con rapido recupero immunologico e ridotto rischio infettivo;
- 3- utilizzo dell'effetto GvM per "creare spazio", senza la necessità di regimi mieloablativi;
- 4- minimizzazione della GvHD, grazie all'instaurazione di uno stato di CM ed alla ridotta intensità del condizionamento.

GRAFT VERSUS HOST DISEASE

La GvHD costituisce a tutt'oggi una delle complicanze più importanti del TCSE allogenico, rappresentando uno dei fattori che maggiormente incidono sulla mortalità secondaria al trapianto, nonché una concausa di possibili effetti invalidanti a distanza.

Un quadro di GvHD, di differente gravità, compare in circa il 70% dei pazienti pediatrici sottoposti a TCSE allogenico da donatore familiare HLA-identico, ma di questi solo un 5-10% sviluppa una forma severa (grado III-IV).

L'incidenza della GVHD acuta è tanto maggiore quanto maggiore dal punto di vista genetico è la distanza tra donatore e ricevente, ed è gravata da una mortalità che può raggiungere anche il 30% nelle forme più gravi.

Essa è dovuta al conflitto immunologico che si sviluppa tra le cellule del donatore ed il sistema immunitario del ricevente, che dalle prime viene riconosciuto come "estraneo" ed aggredito.

La malattia viene classicamente distinta in una forma acuta, ad insorgenza entro i primi 100 giorni dal trapianto, ed una forma cronica, ad insorgenza più tardiva.

In realtà, è ormai chiaro come i segni clinici ed il quadro istologico caratteristici della GvHD cronica possano comparire già a 50 giorni dal TCSE, sovrapponendosi o sostituendosi progressivamente al quadro di GvHD acuta. La classificazione basata sul criterio temporale è stata pertanto sostituita da una valutazione più ampia delle caratteristiche cliniche ed istologiche del processo.

La GvHD acuta è dovuta alla presenza nell'inoculo midollare di cellule immunocompetenti, in particolare linfociti T maturi, che riconoscono come *non self* gli antigeni minori o maggiori di istocompatibilità e gli antigeni tissutali del ricevente.

Da un punto di vista fisiopatologico, la GvHD acuta si distingue in una fase afferente, durante la quale i tessuti dell'ospite attivano i linfociti del donatore, ed una fase efferente, in cui le cellule T attivate del donatore secernono citochine, reclutano ulteriori cellule immunocompetenti, inducono l'espressione di antigeni di istocompatibilità e mediano l'aggressione delle cellule bersaglio del ricevente ⁴¹.

I principali organi bersaglio della GvHD acuta sono la cute, le mucose, il fegato e l'intestino. Nelle sedi interessate, il danno istologico riguarda prevalentemente la cellule basali e meno differenziate degli epitelii e delle mucose del tratto intestinale, e le cellule in attiva proliferazione del midollo osseo e del tessuto linfoide; tali osservazioni sembrano suggerire che il bersaglio della GvHD acuta sia costituito da antigeni di membrana primitivi espressi, ad esempio, da cellule epiteliali indifferenziate.

Inoltre, evidenze cliniche e sperimentali hanno dimostrato come le infezioni, sia virali sia batteriche, possono favorire lo sviluppo della GvHD, verosimilmente in conseguenza al rilascio di citochine ed alla presentazione di antigeni virali o batterici in combinazione alle molecole HLA di classe II, oppure ad un danno aggiuntivo a carico delle cellule da parte del processo infettivo in atto.

Analogamente, è stata evidenziata un'associazione fra intensità del regime di condizionamento al TCSE e severità della GvHD; anche questo dato potrebbe essere messo in relazione ad un maggiore rilascio di citochine in seguito al danno tissutale indotto dalla combinazione chemio-radioterapica ed all'aumentata espressione di antigeni da parte delle cellule epiteliali in via di rigenerazione.

Le citochine giocano pertanto un ruolo chiave tanto nella realizzazione del danno tissutale quanto nell'innescare la reazione immunitaria della GvHD. La tempesta citochinica inizia già durante il regime di condizionamento al TCSE: il danno iatrogeno indotto dalle alte dosi di chemio- e radioterapia, nonché l'eventuale sviluppo di infezioni inducono a livello tissutale il rilascio di citochine ad azione proinfiammatoria, quali il *tumor necrosis factor* (TNF) α e l'interleuchina (IL) 1. Queste citochine sono in grado di indurre l'espressione degli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) a livello tissutale, e di proteine di adesione appartenenti alla famiglia delle integrine. L'aumentata espressione di queste molecole a livello dei tessuti dell'ospite ha come risultato il riconoscimento delle differenze antigeniche da parte delle cellule immunocompetenti del donatore presenti nel *graft*.

I linfociti T attivati del donatore esprimono alla loro superficie il recettore per IL-2 e producono a loro volta altre citochine, tra cui la stessa IL-2. Queste sostanze reclutano linfociti T e cellule mononucleate addizionali. I macrofagi sono inoltre indotti a secernere TNF α ed IL-1, che a loro volta stimolano i linfociti alloreattivi.

Si innesca in questo modo una risposta infiammatoria che coinvolge numerose sostanze, le quali a loro volta, con un meccanismo a cascata che si autoamplifica ed automantiene, arruolano varie popolazioni cellulari in un processo il cui effetto finale è l'aggressione ed il conseguente danno dei tessuti dell'ospite.

Dal punto di vista clinico, uno dei primi sintomi di presentazione della GvHD acuta (aGvHD) è la febbre, che, nelle forme più lievi della malattia, può anche rappresentare l'unico sintomo del processo e persistere per settimane in condizioni di benessere del paziente ed in assenza di altri segni clinici di malattia.

Come già accennato in precedenza, gli organi bersaglio della aGvHD sono la cute, le mucose, il fegato e l'intestino.

L'insorgenza della malattia può pertanto determinare:

- rash cutaneo eritematoso, che se non trattato può evolvere fino ad un quadro di eritrodermia esfoliativa generalizzata;
- diarrea (> 500 ml/die);
- iperbilirubinemia, prevalentemente diretta, per un danno cellulare ed ostruttivo a carico del fegato.

La aGvHD viene abitualmente stadiata secondo la classificazione di Glucksberg, riportata in Tabella I ⁴².

Tabella I: stadiazione della aGvHD

Stadiazione clinica in base all'organo interessato		
Organo	Estensione del coinvolgimento	Grado
Cute	Rash cutaneo < 25% superficie corporea	+
	Rash cutaneo 25-50% superficie corporea	++
	Rash cutaneo > 50% superficie corporea	+++
	Bolle, desquamazione cutanea	++++
Fegato	Bilirubina 2-3 mg/dl	+
	Bilirubina 3,1-6 mg/dl	++
	Bilirubina 6,1-15 mg/dl	+++
	Bilirubina >15 mg/dl	++++
Intestino	Diarrea > 500 ml/die (10-15 ml/kg/die)	+
	Diarrea > 1000 ml/die (16-20 ml/kg/die)	++
	Diarrea > 1500 ml/die (21-25 ml/kg/die)	+++
	Dolore, ileo (diarrea > 26 ml/kg/die)	++++
Grado clinico complessivo		
Grado I	Cute + o ++; no coinvolgimento fegato o intestino, no compromissione condizioni generali del paziente	
Grado II	Cute +++ con lieve compromissione condizioni generali (II _S)	
	Cute da + a +++ ed intestino + (II _{SI})	
	Cute da + a +++ e fegato (II _{SL})	
Grado III	Cute da ++ a +++ e intestino + e fegato + (II _{SLI})	
	Cute da ++ a +++ e/o fegato da ++ a +++; compromissione condizioni generali	
Grado IV	Coinvolgimento d'organo da ++ a ++++ e grave compromissione condizioni generali	

Il quadro clinico della GvHD è influenzato da alcuni fattori:

- farmaci impiegati nella profilassi (methotrexate, ciclosporina, ecc)
- durata della profilassi
- comorbidità (infezioni, danno d'organo, ecc).

Altri fattori che potrebbero avere un ruolo nell'influenzare il quadro clinico sono:

- sorgente delle CSE (sangue midollare, sangue periferico, cordone ombelicale)
- donatore (familiare identico, donatore non correlato, ecc)
- farmaci impiegati prima del TCSE
- differenza di età tra donatore e ricevente
- farmaci impiegati nel corso del TCSE (regime ablativo, total body irradiation, regimi ad intensità ridotta)
- terapia di supporto
- durata dell'immunosoppressione post-trapianto.

Allo scopo di ridurre il rischio di GvHD acuta, vengono somministrate terapie atte sia a prevenirne l'incidenza, sia a ridurre la gravità.

Le differenti strategie di profilassi della aGvHD mirano, in sostanza, a bloccare la fase afferente del processo, mediante l'eliminazione *in vitro* dei linfociti T presenti nell'inoculo, con metodiche immunologiche, farmacologiche o fisiche, oppure attraverso il blocco, *in vivo*, della loro attivazione.

La terapia più efficace è rappresentata dalla rimozione dei Linfociti T dal prodotto cellulare infuso al paziente, sia esso rappresentato da cellule staminali di origine midollare, sia esso rappresentato da cellule staminali di origine periferica, come avviene nel trapianto aploidentico. Tale rimozione tuttavia è condizionata da un maggior rischio di rigetto del trapianto stesso o di recidiva della malattia di base.

Pertanto, i più efficaci e sicuri regimi di profilassi della GvHD attualmente praticati si basano sull'immunosoppressione ottenuta *in vivo* mediante l'impiego di farmaci come la Ciclosporina A (CsA), il Methotrexate (MTX), il prednisone e, per i trapianti a più alto rischio, una T-deplezione *in vivo* ottenuta attraverso la somministrazione di siero antilinfocitario (anti-thymocyte globuline - ATG).

La CsA è un inibitore della calcineurina, in grado di bloccare la sintesi dell'IL-2 e l'espressione del suo recettore.

Il MTX previene la divisione e l'espansione clonale delle cellule T attivate.

I corticosteroidi hanno un'azione antiinfiammatoria ed immunosoppressiva, che risulta essere dose-dipendente, e sono in grado di intervenire su tutte le fasi della risposta immunitaria e su diversi tipi cellulari.

Nel caso in cui la GvHD si dovesse manifestare a dispetto della profilassi effettuata, la terapia di elezione è rappresentata dalla somministrazione di alte dosi di prednisone (2 mg/kg/die), che ottiene una risposta clinica completa in circa il 50% delle aGvHD di grado II-IV.

La non responsività al trattamento corticosteroidico ha un significato prognostico sfavorevole. Questi pazienti potrebbero beneficiare di un trattamento con ATG di coniglio, il cui impiego è però gravato da un'aumentata incidenza di complicanze infettive, soprattutto virali e fungine. La terapia di seconda linea, in alternativa o fallimento della prima linea terapeutica, è rappresentata dalla fotoafesi extracorporea (FEC).

Una percentuale discreta di GvHD acute, pari a circa il 30% del totale, risulta comunque resistente alle terapie di I e II linea, ed in questi casi il rischio di mortalità è molto elevato, anche perché ulteriori terapie risultano solo parzialmente efficaci o del tutto inefficaci nel contrastare un processo fortemente distruttivo nel momento in cui si è pienamente attivato.

Sono pertanto in atto studi diretti verso la definizione di terapie anti-GvHD più efficaci ed efficienti, soprattutto per le forme resistenti ai trattamenti consolidati.

In questo contesto si pone l'impiego delle cellule staminali mesenchimali (MSC).

CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Il midollo osseo contiene differenti popolazioni di cellule oltre alle CSE, tra cui, in particolare, le cellule dello stroma midollare, che comprendono cellule del reticolo-endotelio, fibroblasti, adipociti e precursori osteogenici, i quali forniscono una serie di fattori di crescita emopoietici, facilitano le interazioni cellula-cellula ed elaborano proteine della matrice extracellulare coinvolte nella regolazione dell'emopoiesi, quali fibronectina, laminina, collagene e proteoglicani⁴³⁻⁴⁶.

Già alla fine degli anni '70, Dexter et al suggerirono il coinvolgimento del microambiente midollare nel supporto dell'emopoiesi, mediante lo sviluppo di una coltura di midollo a lungo termine⁴⁷. In tale sistema, una coltura di stroma di origine midollare aderente al substrato era in grado di sostenere la produzione di precursori emopoietici per un periodo variabile da settimane ad alcuni mesi.

Già Friedenstein et al⁴⁸ avevano descritto una popolazione di cellule aderenti derivate da midollo osseo prive di attività fagocitica e morfologicamente simili a fibroblasti. Dopo coltura a bassa densità, sia come sangue midollare in toto sia dopo separazione per gradiente di densità, queste cellule formavano caratteristiche colonie originate da un singolo precursore, denominate unità formanti colonie fibroblastiche (CFU-F). Dopo trapianto ectopico in sede sottocapsulare renale, queste cellule davano origine ad un ampio spettro di tessuti connettivi differenziati, tra cui osso, cartilagine, tessuto adiposo e stroma midollare^{48,49}.

Majumdar e coll. utilizzarono una coltura di cellule stromali espanse per supportare *ex vivo* dei progenitori emopoietici con una tecnica simile a quella impiegata da Dexter⁵⁰.

Sulla base di tali osservazioni, nacque l'ipotesi che questi tessuti fossero derivati da un precursore comune, presente nel midollo osseo, che fu definito cellula staminale stromale o cellula staminale mesenchimale (MSC).

MSC sono presenti dopo la nascita a livello del midollo osseo, e la loro frequenza si riduce con l'età. Dopo TCSE allogenico, la frequenza di CFU-F è temporaneamente ridotta nel paziente pediatrico ed impiega alcuni anni a ritornare a valori normali, mentre nel paziente adulto il deficit è permanente⁵¹.

Le MSC possono essere reperite in numerosi distretti dell'organismo: nell'adulto, oltre che nel midollo osseo, esse possono essere contenute a livello di tessuto adiposo, trabecole ossee, tessuto muscolare e connettivo; per quanto concerne la vita fetale, MSC sono presenti a livello di midollo osseo, polmone, fegato, milza, sangue cordonale, liquido amniotico e placenta.

Tuttavia, a differenza di quanto avviene per le CSE, che possono essere ottenute tanto a partire da sangue midollare, che da sangue periferico o cordonale, le MSC non si riscontrano nel sangue periferico dopo mobilizzazione con fattore di crescita granulocitario (*granulocyte-colony stimulating factor* – G-CSF), né nel sangue cordonale.

Le MSC sono elementi cellulari multipotenti, non ematopoietici, che possono essere isolate, coltivate e manipolate in coltura.

Queste cellule sono dotate di grande plasticità e, di conseguenza, hanno grandi potenzialità per eventuali applicazioni terapeutiche, ma le loro proprietà non sono ancora ben conosciute.

Come già sottolineato, MSC possono essere trovate nel midollo osseo, sangue periferico, tessuto adiposo, sangue cordonale e diversi altri tessuti fetali, e sono in grado di differenziare, *in vitro* ed *in vivo*, verso numerosi tessuti mesenchimali quali osso, cartilagine, tessuto adiposo e stroma midollare.

A causa della loro staminalità e della loro identificazione in vari distretti tissutali, sono genericamente riconosciute attraverso la combinazione di caratteristiche fisiche, caratteristiche fenotipiche e proprietà funzionali e per questo motivo, nel tempo, hanno ricevuto numerosi nomi.

Le MSC rivestono grande interesse per la ricostruzione del tessuto danneggiato come midollo osseo, cartilagine, tendini e legamenti e la loro importanza farmacologica è legata alle seguenti caratteristiche:

1. producono e secernono molecole importanti dal punto di vista biologico
2. esprimono recettori specifici
3. possono essere manipolate geneticamente
4. sono suscettibili a molecole che modificano le loro funzioni e le inducono al differenziamento.

Le MSC possono essere coltivate ed espanse *in vitro*, e presentano una forma fusata ed una morfologia simile ai fibroblasti.

Una parte delle iniziali colonie stromali midollari aderenti al substrato è multipotente e mantiene un potenziale multilineage verso cellule adipose, osteogeniche e condrociti.

E' stato inoltre dimostrato che cellule stromali midollari sono in grado di differenziare in cardiomiociti⁵².

Le MSC sono mediocri cellule presentanti l'antigene e non esprimono le molecole HLA di classe II né molecole costimolatorie quali CD40, CD40 ligand, B7-1 e B7-2. Di conseguenza, non stimolano la proliferazione dei linfociti T in reazione mista linfocitaria (*mixed lymphocyte reaction* - MLR)⁵³. Tuttavia, se aggiunte ad una MLR o a linfociti stimolati con mitogeni, esse risultano in grado di sopprimere le risposte delle cellule T⁵⁴. Questo effetto soppressivo, che riguarda tanto i linfociti T naive quanto le cellule di memoria, è mediato in maniera diretta da interazioni cellula-cellula e per via indiretta da fattori solubili. Infatti, mediante esperimenti che utilizzavano anticorpi monoclonali neutralizzanti diretti contro il fattore di crescita trasformante β 1 ed il fattore di crescita degli epatociti è stato suggerito che tali fattori siano almeno in parte responsabili dell'attività inibente delle MSC⁵⁴.

I linfociti T inibiti dalle MSC non vanno incontro ad apoptosi e possono essere nuovamente indotti a proliferare in seguito a stimoli cellulari od umorali in assenza di MSC⁵⁴.

Le MSC non solo non inducono attivazione dei linfociti T, ma non sono neppure bersaglio della citotossicità dei linfociti CD8+, né cellule Natural Killer KIR-mismatched sono in grado di lisare le MSC. Esse sono pertanto capaci di sfuggire al sistema immunitario anche se MHC incompatibili⁵⁵.

Esperimenti condotti su animali supportano l'ipotesi che le MSC siano dotate di azione immunosoppressiva in vivo; in modelli animali di trapianto di cute è stato dimostrato che l'infusione di MSC allogeneiche espanse *ex-vivo* prolunga i tempi del rigetto di tessuti incompatibili, migliora l'outcome del danno renale, neurologico e polmonare acuto, nonché promuove uno shift dalla produzione di citochine pro-infiammatorie a citochine anti-infiammatorie a livello dei siti interessati⁵⁶.

L'azione immunosoppressiva risulta essere non specifica e non è documentata alcuna specificità antigenica di tale effetto.

Per quanto la loro funzione immunomodulatoria non sia ancora perfettamente chiara, del tutto recentemente è stato dimostrato che MSC derivanti dal midollo osseo e reinfuse insieme a cellule staminali ematopoietiche in un setting di trapianto allogenico, sono capaci di un'attività immunosoppressiva *in vivo* e sono pertanto in grado di contrastare o annullare gravi quadri di GvHD acuta resistente alle terapie di I e II linea⁵⁷⁻⁵⁹.

Inoltre, le MSC si sono dimostrate in grado di promuovere l'attecchimento di cellule CD34+ umane derivate da sangue cordonale ed infuse in un modello fetale di pecora, nonché facilitano il recupero piastrinico in un setting di trapianto autologo nell'uomo ⁶⁰⁻⁶¹.

A causa della loro bassa frequenza, delle poche conoscenze relative a markers di superficie e della loro localizzazione nei tessuti è necessario isolare le MSC per espanderle e sottoporle allo studio. Mediante la coltura in vitro, le MSC possono essere espanse fino ad ottenerne centinaia di milioni a partire da un campione di 10-20 ml di sangue midollare ⁶².

OBIETTIVI DELLO STUDIO

C'è un urgente bisogno di presidi più efficaci per il trattamento e la profilassi della GvHD dopo TCSE allogenico, specialmente per quanto attiene alla terapia della aGvHD steroideo-resistente.

Il crescente numero di studi e di protocolli clinici relativi all'impiego di MSC allogeniche espansive *ex vivo* per la profilassi ed il trattamento delle GvHD di grado severo o per le forme resistenti alle terapie convenzionali è appunto legato alla necessità di trovare presidi terapeutici alternativi, allo scopo di migliorare la prognosi, attualmente alquanto severa, dei pazienti che vanno incontro a questa grave complicanza.

L'obiettivo primario di questo studio era quello di mettere a punto una metodica di coltura ed espansione *ex vivo* di MSC allogeniche, ottenute a partire da campioni sangue midollare provenienti da donatori sani, da utilizzare successivamente per la profilassi della aGvHD ed il trattamento della aGvHD steroideo-resistente in pazienti di età pediatrica affetti da tumore solido e sottoposti a TCSE allogenico.

La procedura inizialmente attuata è risultata efficace in termini di espansione di una popolazione di cellule che alla valutazione morfologica e fenotipica rispondevano ai criteri delle MSC, nonché è risultata sicura per quanto attiene allo sviluppo di patogeni.

Del tutto recentemente, mentre lo studio era in corso, è emersa la necessità di non impiegare materiali di derivazione animale per l'uso clinico nell'uomo.

Dopo aver dimostrato l'efficacia della metodica originaria, si è pertanto deciso di sostituire l'utilizzo di FBS con quello di lisato piastrinico, come indicato dalle regole di Good Manufacturing Practice, e tale studio è attualmente in atto.

MATERIALI E METODI

COLTURA ED ESPANSIONE DELLE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI

I materiali e le strumentazioni impiegati per la coltura e l'espansione delle MSC sono riportati in tabella II.

Tabella II: Materiali e strumentazioni per espansione MSC	
MATERIALI	STRUMENTAZIONI
Soluzione fisiologica	Provette
Sangue midollare	Fiasche T75
Ficoll 1.077 g/ml	Centrifuga
PBS	Incubatore
FCS γ -irradiato	Microscopio ottico
DMEM	Camera di Burker
Tripan blu	Cappa
Tripsina γ -irradiata - EDTA	Microscopio a fluorescenza
Bromuro di Etidio-Arancio di Acridina	
DMSO	

La coltura e l'espansione delle MSC sono state effettuate a partire da campioni di sangue midollare provenienti da donatori sani.

Dopo ottenimento del consenso informato, i donatori sono stati sottoposti ad aspirazioni multiple di sangue midollare a livello delle creste iliache anteriori e posteriori, in anestesia generale ed in condizioni di sterilità.

Per ogni donatore, un campione di sangue midollare pari a 10 ml è stato impiegato per la coltura delle MSC.

Ogni campione di sangue midollare è stato diluito con 2 volumi di soluzione fisiologica.

Ogni tre millilitri di sangue midollare diluito sono stratificati su 5 ml di Ficoll 1.077 g/ml (Lymphoprep™, Axis Sheld Poc AS, Oslo, Norway) e centrifugati per 20' a 580 g ad una temperatura di 20°C.

Le cellule all'interfaccia così separate sono state prelevate e lavate due volte con 10 ml di soluzione fisiologica (Fresenius Kabi, Isola della Scala (VR), Italia) e centrifugate a 460g, rispettivamente per 10' e per 5' alla temperatura di 20°C.

Al termine di questi passaggi si è proceduto alla conta delle cellule e valutazione della vitalità con Bromuro di Etidio/Arancio di Acridina nella camera di Burker al microscopio a fluorescenza (OLYMPUS BX51).

Le cellule sono state risospese in terreno DMEM *low glucose* (Lonza, Verviers, Belgium) aggiunto di L-Glutammina (GIBCO, Invitrogen) 2 mM e siero bovino fetale (FBS, Fetal Bovine Serum) (GIBCO, Invitrogen) al 10% in assenza di antibiotici, ad una concentrazione di circa 12×10^6 cellule/ml, corrispondenti a 160×10^3 cellule/cm² piastrando 10 ml in fiasche T75 (SARSTEDT, Nümbrecht, Germany).

Le fiasche sono state poste in incubatore a 37°C in ambiente CO₂ pari al 5% per 72 ore.

Successivamente si è proceduto a cambio di terreno ogni 3 - 4 giorni.

Raggiunta una confluenza $\geq 70\%$, si sono espanse le cellule nel seguente modo: le cellule sono state lavate con soluzione di PBS (Phosphate Buffer Saline, tampone fosfato salino) (SIGMA-ALDRICH), staccate con tripsina 0,05% (GIBCO, Invitrogen) e dopo essere state centrifugate 5' a 250 g sono state risospese ad un concentrazione di 3×10^5 cellule/ml, corrispondenti a 4×10^3 cellule/cm² in fiasche T75 (con semina di 10 ml per fiasca).

Ad ogni passaggio le cellule sono state quindi contate con Trypan Blue (SIGMA-ALDRICH) nella camera di Burker al microscopio ottico (Wilovert™), una parte congelata in FBS 90% e DMSO (CRYO.ON, AL.CHI.MIA SRL, Ponte S. Nicolò, Padova, Italia) 10% e un'aliquota è stata utilizzata per un valutazione citofluorimetrica dell'immunofenotipo, la verifica della sterilità per batteri patogeni aerobi e anaerobi con Bact/ALERT®iAST (terreno per aerobi) (Biomérieux INC. Durham) Bact/ALERT®NAST (terreno per anaerobi) (Biomérieux INC. Durham) e l'assenza di contaminazioni da micoplasma mediante PCR.

VALUTAZIONE CITOFUORIMETRICA

Per la valutazione dell'immunofenotipo sono stati usati anticorpi monoclonali specifici coniugati con FITC, PE o PerCP. Le cellule sono state valutate al citofluorimetro per studiare l'espressione di: CD 44, CD 45 , CD34, CD14, CD13 e CD73 (vedi Tab.III).

Per ogni acquisizione 100000/200000 cellule sono state fatte incubare 15' con l'anticorpo e poi fissate con il BD FACS Lysis Solution 10'. Le cellule sono state poi centrifugate 5' a 315 g e risospese in 500 µL in PBS.

I campioni così preparati sono stati acquisiti con il citofluorimetro FACSCalibur BECTON DICKINSON (BD Bioscience) e analizzati con il software Cellquest™ (BD, Biosciences).

Tabella III: Materiali e strumentazioni per analisi fenotipica MSC		
ANTICORPO	FLUOROCROMO	MARCA
Mouse anti Human anti-CD 13	PE	BD, Biosciences
Mouse anti Human anti-CD 14	PE	BD, Biosciences
Mouse anti Human anti-CD 34	PE/FITC	BD, Biosciences
Mouse anti Human anti-CD 44	FITC	BD, Biosciences
Mouse anti Human anti-CD 45	FITC/PerCP	BD, Biosciences
Mouse anti Human anti-CD 73	PE	BD, Pharmigen™

VALUTAZIONE MICOPLASMA MEDIANTE PCR

Le cellule sono sottoposte a regolare controllo mediante metodica PCR per escludere la presenza di micoplasma.

Si è posto 1 ml del sovrinatante della coltura cellulare in provetta Eppendorf sterile e centrifugato a 12000 g per 1 minuto.

Una volta lavato il pellet con PBS due volte si è risospeso in 50 µl di Buffer di estrazione (PCR buffer 1X; MgCl₂ 2.5 mM; NP40 0.45%; TWEEN 20 0.45%; proteinasi K 60 µg/ml).

Si è messo a incubare il campione a 60°C per 10 minuti, poi a 95°C per 10 minuti.

Il DNA così ottenuto è stato analizzato mediante PCR qualitativa utilizzando i seguenti primers - 25-mer Myco 16S s: 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3' e -27-mer Myco 16S as: 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3.

La mix di reazione è composta da PCR buffer 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM ognuno, Myco 16S s (10 pmoli), Myco 16S as (10 pmoli), Taq polimerasi 0.5 U.

Il programma di PCR usato è il seguente: 94°C per 15'', 60°C per 30'', 72°C per 30'' per 40 cicli.

L'amplificato è stato poi caricato su gel di agarosio e colorato con gel red per visualizzare gli amplificati.

Con i campioni da analizzare sono stati processati e analizzati un controllo biologico positivo e uno negativo.

PAZIENTI

Nel 2008 l'Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica (AIEOP) ha presentato i dati relativi all'analisi dei fattori di rischio associati allo sviluppo di aGvHD nell'ambito del TCSE allogenico in pazienti di età pediatrica.

Le variabili analizzate in analisi univariata sono state:

- età del paziente
- età del donatore
- sesso: donatore di sesso femminile in ricevente di sesso maschile versus altro
- diagnosi: patologia maligna versus non maligna
- stato di malattia al TCSE: iniziale versus avanzato
- donatore: familiare identico, familiare parzialmente identico, identico non correlato, parzialmente identico non correlato
- sierologia per Cytomegalovirus
- compatibilità per il sistema ABO
- sorgente delle CSE: sangue midollare versus sangue periferico versus sangue cordonale
- regime di condizionamento al trapianto: chemioterapia versus TBI
- profilassi della GvHD: CsA, combinazione di farmaci, ATG o anticorpi monoclonali, deplezione dei linfociti T
- numero di CSE midollari infuse: < 4 versus $\geq 4 \times 10^8$ /kg di peso corporeo del ricevente
- impiego di fattori di crescita
- timing dell'attecchimento dei granulociti neutrofili e delle piastrine.

Tra tutte le variabili analizzate, quelle che in analisi univariata sono risultate significative sono state:

- età del donatore uguale o superiore a 5 anni
- età del paziente uguale o superiore a 5 anni
- diagnosi di malattia maligna
- donatore non correlato parzialmente identico versus donatore familiare identico
- TBI versus chemioterapia
- combinazione di farmaci versus CsA in profilassi (valore protettivo)
- alta quantità di CSE nell'inoculo (valore protettivo)
- attecchimento dei neutrofili prima dei 15 giorni.

Tali variabili risultate significative sono state successivamente valutate mediante analisi multivariata, dalla quale è a sua volta emersa una significatività di:

- età del donatore uguale o superiore a 5 anni
- diagnosi di malattia maligna
- donatore non correlato identico versus donatore familiare identico
- donatore non correlato parzialmente identico versus donatore familiare identico
- combinazione di farmaci versus CsA in profilassi (valore protettivo)
- siero antilinfocitario di coniglio o anticorpi monoclonali versus CsA in profilassi (valore protettivo)
- attecchimento dei polimorfonucleati entro 15 giorni dal TCSE.

Per definire l'eleggibilità al trattamento con MSC allogeniche per la profilassi della aGvHD ed il trattamento della aGvHD steroideo-resistente nell'ambito dei pazienti di età pediatrica affetti da tumore solido e sottoposti a TCSE allogenico, è stata valutata in maniera retrospettiva la casistica dei pazienti che soddisfavano tali caratteristiche trattati presso l'Unità Trapianto dell'Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seràgnoli" dell'Università degli Studi di Bologna.

Dal 1985 al 2008 trenta pazienti di età pediatrica affetti da tumore solido sono stati sottoposti ad un totale di trentuno trapianti di CSE allogeniche.

Di questi pazienti (23 maschi e 7 femmine), affetti rispettivamente da neuroblastoma (11), Linfoma non Hodgkin (9), Linfoma di Hodgkin (5), Sarcoma di Ewing (3) e Rabbdomiosarcome (2), due erano in prima remissione completa (RC), dodici in altre RC, undici in remissione parziale (RP) e cinque avevano malattia presente (MP).

Le caratteristiche dei pazienti sono riportate in tabella IV.

Tabella IV: Caratteristiche dei pazienti		
Sesso	Maschi	23
	Femmine	7
Diagnosi	Neuroblastoma	11
	Linfoma non Hodgkin	9
	Linfoma di Hodgkin	5
	Sarcoma di Ewing	3
	Rabdomiosarcoma	2
Status di malattia al TCSE	I RC	2
	Altre RC	12
	RP	11
	MP	5

Il donatore era un fratello identico (sibling) in diciotto casi, un donatore identico non correlato (matched unrelated donor, MUD) in undici ed un familiare aploidentico in due.

La sorgente delle CSE era costituita da sangue midollare in ventuno casi, sangue periferico in nove e sangue cordonale in uno.

La TBI è stata impiegata in cinque pazienti; di questi, tre sono stati sottoposti ad una schedula iperfrazionata (333 cGy per 3 giorni) e due ad un'unica somministrazione (Linac 800 cGy).

La profilassi della GvHD è stata effettuata con sola CsA nei diciotto pazienti che disponevano di un donatore familiare identico, con CsA associata a Short Term MTX ed ATG negli undici pazienti con donatore non correlato, mentre non è stata effettuata alcuna profilassi farmacologica nei pazienti sottoposti a TCSE da donatore aploidentico, per i quali l'inoculo era stato sottoposto a T-deplezione *in vitro*.

Le caratteristiche relative alla procedura trapiantologica sono riportate in tabella V.

Sedici su trenta pazienti (53%) hanno sviluppato una aGvHD di grado > I, in particolare 9/17 pazienti (53%) con donatore familiare identico e 7/11 pazienti (64%) con donatore non familiare identico.

Due pazienti sono risultati non valutabili per decesso entro i primi 100 giorni dal TCSE.

I dati relativi allo sviluppo di aGvHD sono riportati in Tabella VI e VII.

Tabella V: Caratteristiche del TCSE		
Numero TCSE	Primo	21
	Secondo	8
	Terzo	1
	Quarto	1
Tipo di donatore	Sibling	18
	MUD	11
	Aploidentico	2
Età del donatore	<5 anni	5
	>5 anni	26
Sorgente CSE	Midollo osseo	21
	Sangue periferico	9
	Sangue cordonale	1
TBI	Iperfrazionata (333X3)	3
	Linac (800x1)	2
	No TBI	26
Profilassi GvHD	CsA	18
	CsA + MTX + ATG	11
	No profilassi	2

Tabella VI: aGvHD grado >I e tipo di donatore				
	GvHD SI (%)	GvHD NO (%)	GvHD n.a. (%)	Totale
Sibling	9 (53)	6 (35)	2 (12)	
MUD	7 (64)	4 (36)	0	
Aploidentico	0	2 (100)	0	
Totale	16 (53)	12 (40)	2 (7)	30

Tabella VII: aGvHD grado > I ed età del donatore				
	GvHD SI (%)	GvHD NO (%)	GvHD n.a. (%)	Totale
Età donatore < 5 anni	3 (60)	1 (20)	1 (20)	5
Età donatore > 5 anni	13 (52)	11 (44)	1 (4)	25
Totale	16	12	2	30

PROTOCOLLO CLINICO

E' stato redatto un Protocollo clinico sperimentale di fase I per la profilassi della aGvHD e per il trattamento della aGvHD resistente alle terapie di I e II linea mediante l'impiego di MSC

allogeniche espanse *ex-vivo*, in pazienti di età pediatrica affetti da tumore solido e per questo avviati a trapianto allogenico di CSE.

L'obiettivo primario di tale Protocollo è la valutazione dell'efficacia di infusioni di MSC allogeniche per la profilassi della aGvHD ed il trattamento delle forme di aGvHD resistenti alle terapie convenzionali.

Gli obiettivi secondari consistono nella valutazione delle eventuali recidive di malattia nei pazienti sottoposti ad infusione di MSC e della sopravvivenza dei pazienti trattati con infusione di MSC allogeniche per aGvHD.

I criteri di inclusione prevedono:

- pazienti di età pediatrica (0-14 anni);
- diagnosi di tumore solido (NB, SPM, RMS, SE/PNET);
- trapianto allogenico di CSE.

I criteri di esclusione sono rappresentati da:

- mancato consenso allo studio da parte del paziente o dei suoi rappresentanti legali;
- pazienti con infezione in atto documentata e non controllata, di origine batterica, virale o fungina;
- pazienti in condizioni cliniche scadute con aspettativa di vita inferiore ai trenta giorni.

Lo studio prevede l'infusione al paziente per via endovenosa delle MSC allogeniche espanse *ex-vivo*, alla dose minima di $1,2 \times 10^6$ MSC/kg di peso corporeo del ricevente in concomitanza con l'infusione del prodotto cellulare rappresentante il trapianto.

Nelle quattro ore successive all'infusione si valutano i parametri vitali del paziente: pressione arteriosa (PA), frequenza cardiaca (FC), saturazione di ossigeno (SO₂), temperatura corporea (T); tale valutazione viene effettuata inizialmente ogni 30', poi ogni ora nelle ore seguenti.

Una valutazione clinica del paziente con esame obiettivo generale completo viene effettuata quotidianamente almeno per una settimana dopo l'infusione; successivamente è prevista la valutazione clinica almeno una volta alla settimana per un minimo di otto settimane.

Si considera come tossicità acuta l'insorgenza entro quattro ore dall'infusione di uno o più dei seguenti:

- PA sistolica < 90 mmHg o > 180 mmHg, o variazioni superiori al 33% rispetto al valore basale;
- PA diastolica < 50 mmHg o > 100 mmHg, o variazioni superiori al 25% rispetto al valore basale;
- FC < 60 bpm o > 110 bpm, o variazioni superiori al 33% rispetto al valore basale;
- T $> 38,5^\circ\text{C}$ o aumento di 1°C rispetto alla T iniziale.

La valutazione della risposta all'infusione delle MSC prevede, per quanto concerne la profilassi della aGvHD, una riduzione dell'incidenza della aGvHD stessa.

Per quanto attiene alle risposte nel trattamento delle forme di aGvHD resistenti alle terapie di I e II linea, si considera:

1. risoluzione completa della GvHD: controllo di tutti i segni e sintomi attribuibili alla aGvHD per almeno un mese, indipendentemente da eventuale concomitante trattamento con steroidi o CsA;
2. risoluzione parziale della GvHD: controllo di alcuni segni e sintomi attribuibili alla aGvHD con miglioramento del grado complessivo di GvHD di almeno due gradi per almeno un mese;
3. GvHD refrattaria: nessun cambiamento nei segni e sintomi di aGvHD nei dieci giorni successivi all'infusione delle MSC;
4. GvHD progressiva: qualsiasi peggioramento dei segni e sintomi di aGvHD tale da comportare un aumento del grado complessivo di GvHD di uno o più gradi quattordici giorni dopo l'infusione delle MSC.

La valutazione degli obiettivi secondari prevede la determinazione dell'incidenza di GvHD cronica, la sopravvivenza dei pazienti, l'incidenza degli eventi infettivi, l'eventuale recidiva di malattia.

DISCUSSIONE E RISULTATI

Il TCSE allogenico rappresenta attualmente il trattamento di scelta per numerose patologie oncologiche e non oncologiche, tanto in pazienti adulti quanto in ambito pediatrico.

Nonostante il continuo miglioramento nelle tecniche di matching del sistema HLA, circa il 50% dei pazienti sottoposti a tale procedura va incontro allo sviluppo di aGvHD, e di questi solo un 30-50% risponde alla terapia di I linea rappresentata dalla somministrazione di corticosteroidi.

Il trattamento delle forme steroido-resistenti non è ancora univocamente definito, e varia a seconda delle condizioni cliniche del paziente, degli organi ed apparati coinvolti, del grado di GvHD e della disponibilità da parte del Centro di usufruire di metodiche e tecniche all'avanguardia (Fotoaferesi Extracorporea).

D'altro canto, indipendentemente dalla strategia scelta, l'impiego di terapie immunosoppressive comporta un aumento del rischio di contrarre infezioni e di sviluppare tossicità d'organo, entrambi fattori questi ultimi che possono determinare a loro volta un incremento della mortalità correlata al trapianto.

Si stima attualmente che l'overall survival a due anni per i pazienti adulti che vanno incontro ad una aGvHD steroido-resistente si aggiri intorno al 10% ⁶³.

Per quanto nella popolazione pediatrica l'incidenza di aGvHD risulti inferiore, in ragione di una maggiore aspettativa di vita gli effetti collaterali a lungo termine di un trattamento immunosoppressivo di lunga durata risulterebbero particolarmente temibili ed invalidanti.

Diviene così di prioritaria importanza la pianificazione di strategie terapeutiche che consentano di ridurre l'attuale carico immunosoppressivo a cui vengono sottoposti questi pazienti.

In questo contesto si inserisce l'impiego delle MSC, sia nella profilassi della aGvHD sia nel trattamento delle forme di aGvHD resistenti alle terapie convenzionali.

Sono già stati pubblicati studi di fase I e II nei quali MSC ottenute da donatori HLA-identici ed espanse *ex-vivo* sono state infuse a pazienti sottoposti a trapianto allogenico di CSE allo scopo di favorire l'attecchimento dell'inoculo ed in pazienti affetti da osteogenesi imperfetta ⁶⁴⁻⁶⁸.

Di recente pubblicazione sono inoltre alcuni studi relativi all'impiego di MSC espanse *ex-vivo* per il trattamento delle forme di aGvHD ^{59,63}.

In particolare, lo studio di Le Blanc et al riporta una casistica di 55 pazienti, alcuni dei quali in età pediatrica, sottoposti a TCSE allogenico o a donor lymphocyte infusion, che avevano sviluppato un quadro di GvHD di grado II-IV non responsiva al trattamento steroideo. In questo studio di fase II, l'infusione di MSC allogeniche espanse *ex-vivo* si è dimostrato un efficace e sicuro presidio terapeutico per il trattamento della GvHD steroido resistente, con una risposta

simile indipendentemente dall'organo principalmente coinvolto nel processo infiammatorio (cute, intestino o fegato).

Nello studio condotto presso l'Unità Trapianto dell'Oncologia ed Ematologia Pediatrica "Lalla Seràgnoli" dell'Università degli Studi di Bologna è stata messa a punto una metodica di espansione di MSC allogeniche ottenute a partire da campioni di sangue midollare provenienti da donatori sani di CSE.

Per ogni campione di sangue midollare è stato possibile rispettare le condizioni stabilite dallo standard del protocollo e mettere in coltura al tempo 0 almeno due fiasche di cellule isolate.

Le cellule hanno raggiunto la confluenza dopo circa 15-20 giorni dalla messa in coltura e si è proceduto al passaggio di amplificazione suddividendo le cellule per ottenere una concentrazione di 3×10^5 /fiasca.

La valutazione morfologica delle cellule effettuata al termine dei vari passaggi ha documentato la crescita di cellule di forma fusata, aderenti al substrato (vedi Figura 1 e 2).

Figura 1: MSC- passaggi 1-4

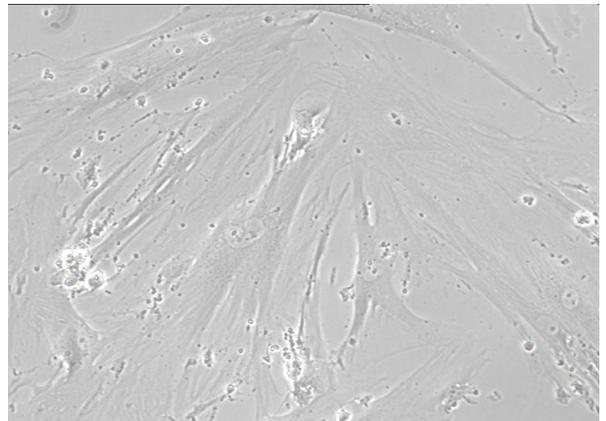
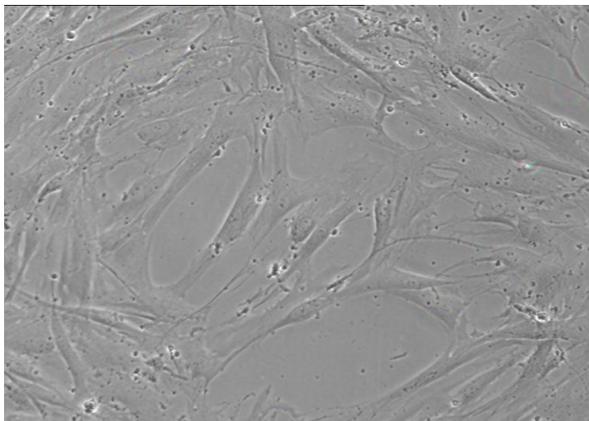
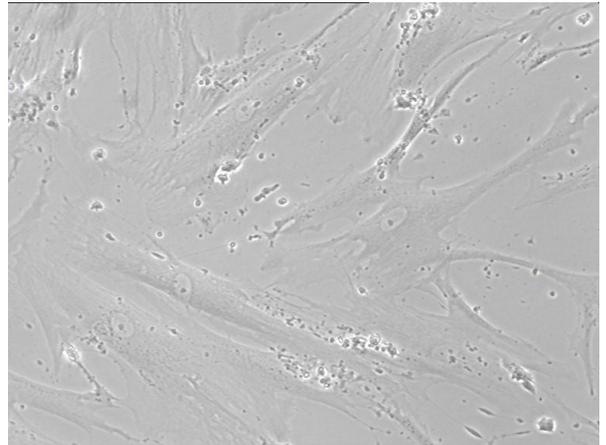
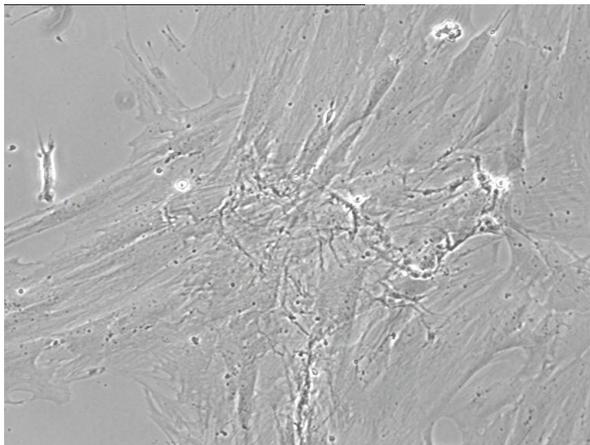
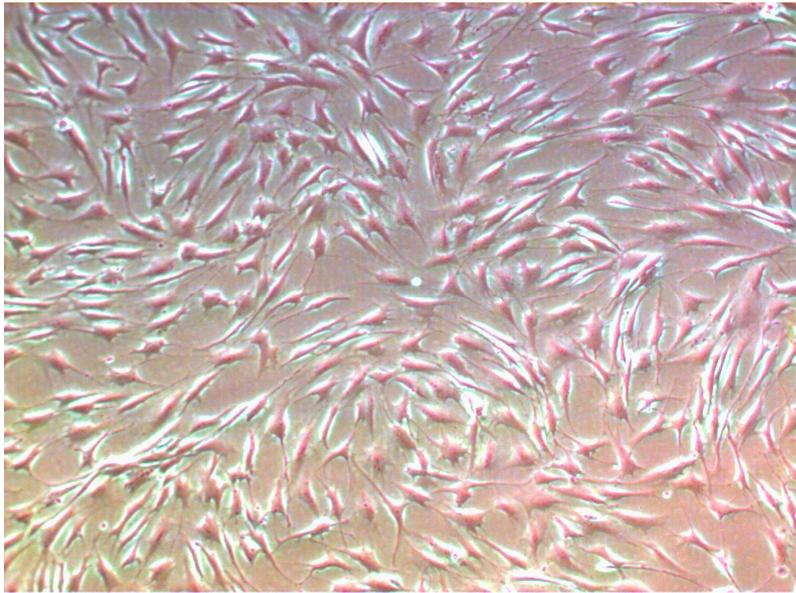


Figura 2: MSC – morfologia.



Sono stati effettuati in media 3 passaggi prima di congelare aliquote dei campioni, ad eccezione di un campione che è stato portato avanti fino al quarto passaggio.

La valutazione fenotipica effettuata mediante citofluorimetria ha confermato la positività delle cellule espresse per gli antigeni di superficie CD44, CD13 e CD73, nonché la loro negatività per CD34, CD45 e CD14 (vedi Figura 3-10).

Figura 3: valutazione citofluorimetrica per CD14 (PE)

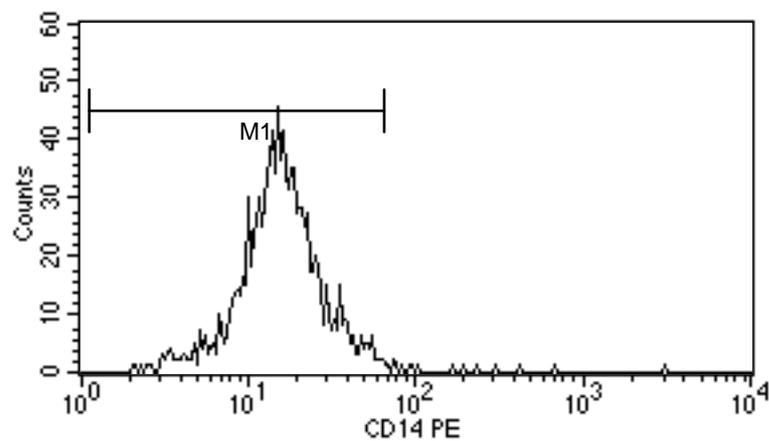


Figura 4: valutazione citofluorimetrica per CD34 (PE)

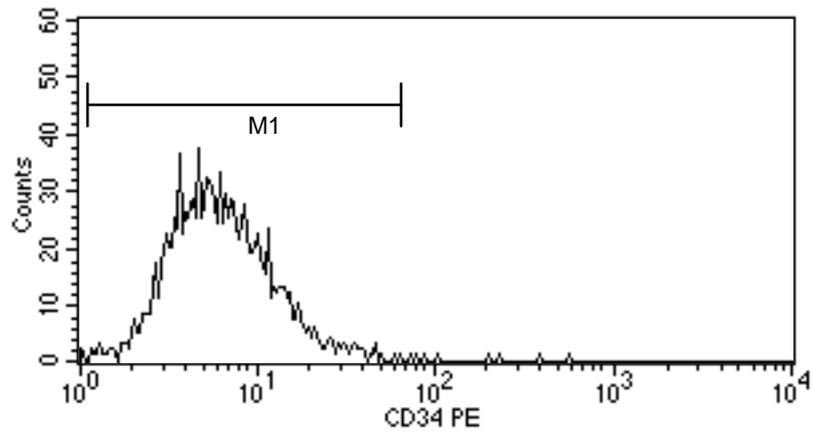


Figura 5: valutazione citofluorimetrica per IgG1 (PE)

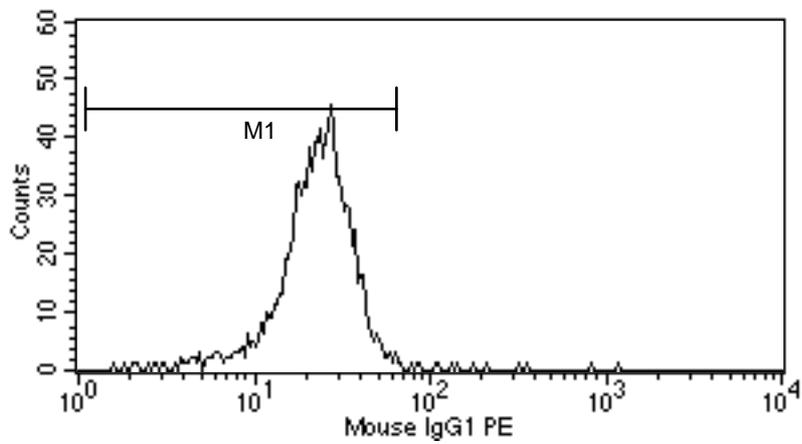


Figura 6: valutazione citofluorimetrica per CD73 (PE)

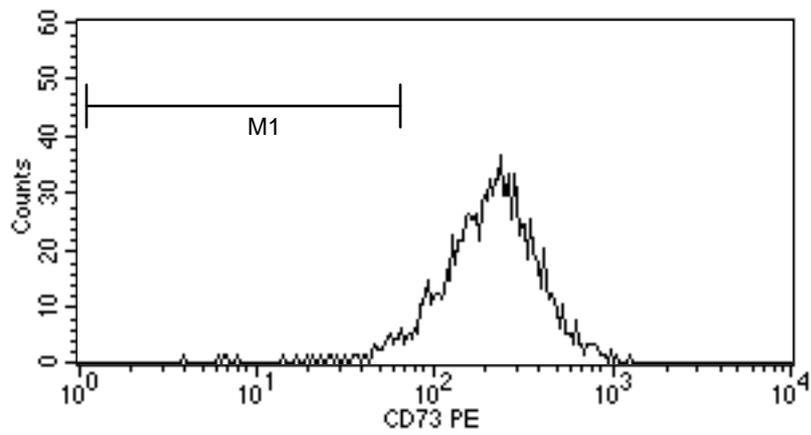


Figura 7: valutazione citofluorimetrica per CD13 (PE)

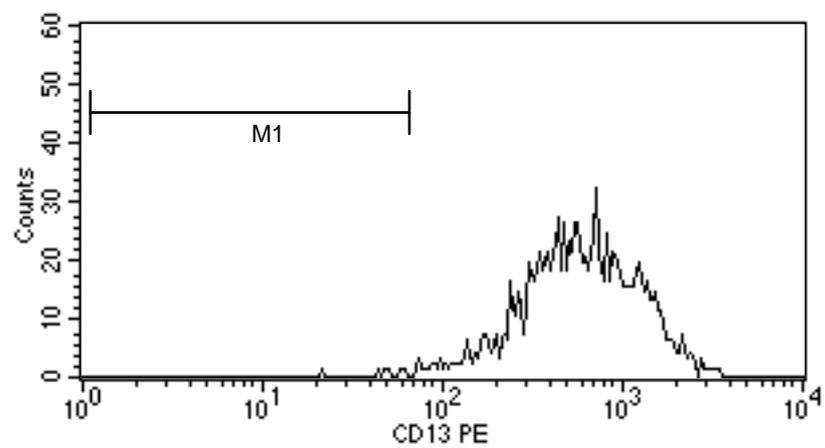


Figura 8: valutazione citofluorimetrica per IgG1 (FITC)

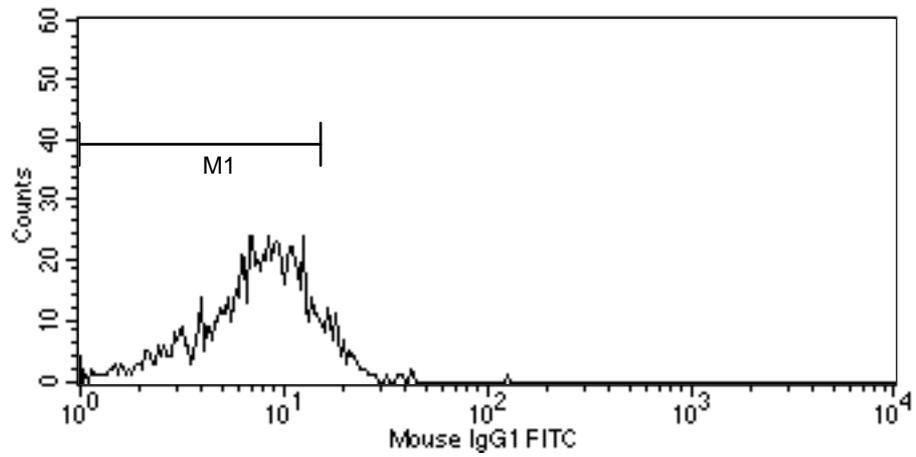


Figura 9 : valutazione citofluorimetrica per CD45 (FITC)

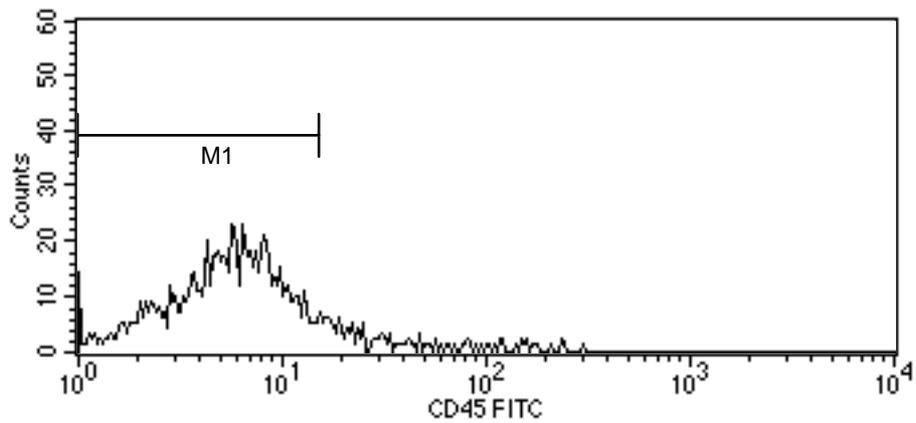
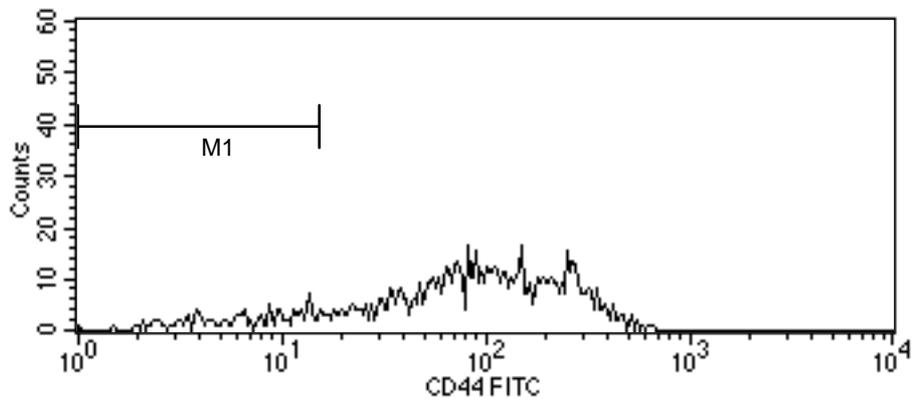
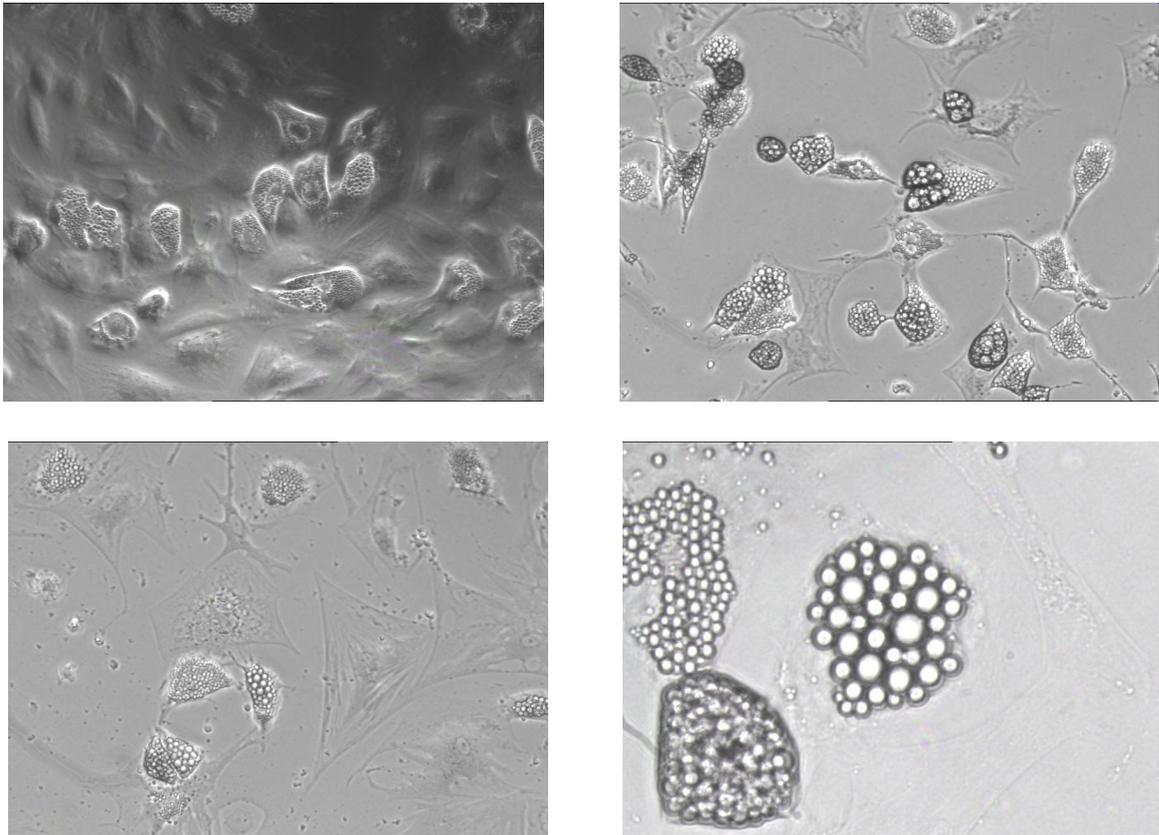


Figura10: valutazione citofluorimetrica per CD44 (FITC)



Alcuni campioni sono inoltre stati valutati per verificarne il potenziale differenziativo, in particolare in senso adipogenico; le cellule così testate si sono dimostrate in grado di dare origine a colonie di adipociti (vedi Figura 11).

Figura 11: differenziazione in senso adipogenico



Tutti i campioni ottenuti sono inoltre stati saggiati per escludere la crescita di patogeni, e sono risultati sterili.

La metodica è risultata efficace, in quanto da tutti i campioni è stato possibile ottenere una popolazione di cellule che alla valutazione morfologica e citofluorimetrica presentavano caratteristiche di MSC, ed inoltre risultata sicura per quanto concerne lo sviluppo di patogeni.

Dal momento che le attuali regole di Good Manufacturing Practice (GMP) raccomandano di evitare l'impiego di materiali di derivazione animale per l'uso umano (European Commission-Health and Consumer Protection Directorate-General. Technical requirements for the coding, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells. Directive 2004/23/EC, l'utilizzo di FBS, che era inizialmente previsto nell'ambito della metodica di espansione *ex vivo* di MSC, non è ritenuto opportuno, per il rischio di trasmissione di infezioni virali e malattie da prioni, nonché per evitare l'innescò di una risposta immune xenogenica.

Il numero crescente di protocolli clinici che prevedono l'impiego di MSC implica la necessità di adottare materiali diversi dall' FBS.

Sono già stati pubblicati alcuni studi nei quali l'impiego di FBS è stato sostituito da quello di altri derivati di origine umana ^{63,69,70}, che hanno dimostrato come le preparazioni di lisato piastrinico costituiscano una valida sorgente di fattori di crescita, utili nel trattamento di varie patologie chirurgiche a carico dell'osso e dei tessuti molli. L'impiego di lisato piastrinico come supplemento nella coltura e nell'espansione di MSC nell'ambito di protocolli di terapia cellulare è stato recentemente suggerito come valida e promettente alternativa all'FBS in alcuni studi ⁷⁰. Per tale motivo è attualmente in corso anche presso la nostra Istituzione la redazione di una procedura di laboratorio per l'espansione di MSC allogeneiche *in vitro* nella quale l'impiego di FBS viene sostituito da quello di lisato piastrinico.

I dati sono ancora in fase di raccolta, tuttavia sembra che la metodica che prevede l'impiego di lisato piastrinico risulti parimenti efficace e sicura rispetto a quella iniziale che impiegava FBS. L'ottenimento di lisato piastrinico richiede tuttavia numerose donazioni di piastrine da parte di donatori sani, elemento quest'ultimo di cui bisogna senz'altro tenere conto nell'ambito di una pianificazione dell'impiego routinario di questa preparazione.

Ulteriori studi saranno poi necessari per verificare il numero di infusioni necessario, la dose ottimale di MSC da infondere e la loro eventuale interazione con altri farmaci impiegati nel trattamento della GvHD.

BIBLIOGRAFIA

1. Molica A, McSweeney D, Maloney DG et al. Degree of early donor T-cell chimerism predicts GVHD and graft rejection in patients with non-myeloablative hematological stem cell allografts. *Blood* 94 (10), 394a.
2. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC et al. Treatment of high risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 1999; 341: 1165-73.
3. Di Cataldo A, Dau D, Conte M, Parodi S, De Bernardi B, Giuliano M, Pession A et al. Diagnostic and prognostic markers in infants with disseminated neuroblastoma: a retrospective analysis from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *Med Sci Monit* 2009 Jan; 15 (1)
4. Oberlin O, Rey A, Lyden E et al. Prognostic factors in metastatic rhabdomyosarcomas: results of a pooled analysis from United States and European cooperative groups. *J Clin Oncol* 2008 May 10; 26 (14): 2384-9.
5. Koscielniak E, Klingebiel TH, Peters C et al. Do patients with metastatic and recurrent rhabdomyosarcoma benefit from high-dose therapy with hematopoietic rescue? Report of the German/Austrian Pediatric Bone Marrow Transplantation Group. *Bone Marrow Transplant* 1997 Feb; 19 (3): 227-31.
6. Breneman JC, Lyden E, Pappo AS et al. Prognostic factors and clinical outcomes in children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma – a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV. *J Clin Oncol* 2003 Jan; 21 (1): 78-84.
7. Joshi D, Anderson JR, Paidas C et al for the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. Age is an independent prognostic factor in rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma of the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2004 Jan; 42 (1): 64-73.
8. Mazzoleni S, Bisogno G, Garaventa A et al. Outcome and prognostic factors after recurrence in children and adolescents with nonmetastatic rhabdomyosarcoma. *Cancer* 2005 July 1; 104 (1): 183-90.
9. Carli M, Colombatti R, Oberlin O et al. European intergroup studies (MMT4-89 and MMT4-91) on childhood metastatic rhabdomyosarcoma: final results and analysis of prognostic factors. *J Clin Oncol* 2004 Dec 1; 22 (23): 4787-94.

10. Koscielniak E, Morgan M, Treuner J. Soft tissue sarcoma in children: prognosis and management. *Paediatr Drugs* 2002; 4 (1): 21-8.
11. Beahrs OH et al. Manual for staging cancer. American Joint Committee on Cancer. 4th edition. Philadelphia: JB Lippincott, 1992.
12. Drobnjark M et al. Prognostic implications of p53 nuclear overexpression and high proliferation index of ki-67 in adult soft tissue sarcoma. *J Natl cancer Inst* 1994; 86: 549.
13. Hawkins DS, Felgenhauer J, Park J et al. Peripheral blood stem cell support reduces the toxicity of intensive chemotherapy for children and adolescents with metastatic sarcomas. *Cancer* 2002 Sep 15; 95 (6): 1354-65.
14. Weigel BJ, Breitfeld PP, Hawkins D et al. Role of high-dose chemotherapy with hematopoietic stem cell rescue in the treatment of metastatic or recurrent rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001 Jun-Jul; 23 (5): 272-6.
15. Carli M, Colombatti R, Oberlin O et al. High-dose melphalan with autologous stem-cell rescue in metastatic rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1999 Sep; 17 (9): 2796-803.
16. Pappo AS, Anderson JR, Crist WM et al. Survival after relapse in children and adolescents with rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 1999 Nov; 17 (11): 3487-93.
17. Klingebiel T, Pertl U, Hess CF et al. Treatment of children with relapsed soft tissue sarcoma: report of the German CESS/CWS REZ 91 trial. *Med Pediatr Oncol* 1998 May; 30 (5): 269-75.
18. Atra A, Pinkerton R. High-dose chemotherapy in soft tissue sarcoma in children. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002 Feb; 41 (2): 191-6.
19. EPSSG Meeting report, 26 gennaio 2006, Padova.
20. Ewing J. Classics in oncology. Diffuse endothelioma of bone. James Ewing. Proceedings of the New York Pathological Society, 1921. *CA Cancer J Clin* 1972; 22: 95-8.
21. Angervall L, Enzinger FM. Extraskeletal neoplasm resembling Ewing's sarcoma. *Cancer* 1975; 36: 240-51.
22. Askin FB, Rosai J, Sibley RK et al. Malignant small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood: a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. *Cancer* 1979; 43: 2438-51.
23. Jaffe R, Santamaria M, Yunis EJ et al. The neuroectodermal tumor of bone. *Am J Surg Pathol* 1984; 8: 885-98.
24. de Alava E, Gerald WL. Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 2000; 18: 204-13.

25. Aparicio J, Munarriz B, Pastor M et al. Long-term follow-up and prognostic factors in Ewing's sarcoma. A multivariate analysis of 116 patients from a single institution. *Oncology* 1998 Jan-Feb; 55 (1): 20-6.
26. Picci P, Böhling T, Bacci G et al. Chemotherapy-induced tumor necrosis as a prognostic factor in localized Ewing's sarcoma of the extremities. *J Clin Oncol* 1997 Apr; 15 (4): 1553-9.
27. Picci P, Rougraff BT, Bacci G et al. Prognostic significance of histopathologic response to chemotherapy in nonmetastatic Ewing's sarcoma of the extremities. *J Clin Oncol* 1993 Sep; 11 (9): 1763-9.
28. Rosito P, Mancini AF, Rondelli R, Abate ME, Pession A et al. Italian Cooperative Study for the treatment of children and young adults with localized Ewing sarcoma of bone: a preliminary report of 6 years of experience. *Cancer* 1999 Aug 1; 86 (3): 421-8.
29. Meyers PA, Krailo MD, Ladanyi M et al. High-dose melphalan, etoposide, total-body irradiation, and autologous stem-cell reconstitution as consolidation therapy for high-risk Ewing's sarcoma does not improve prognosis. *J Clin Oncol* 2001 Jun 1; 19 (11): 2812-20.
30. Wheeler C, Antin JH, Churchill WH et al. Cyclophosphamide, carmustine, and etoposide with autologous bone marrow transplantation in refractory Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma: a dose-finding study. *J Clin Oncol* 1990; 8: 648-56.
31. Eder JP, Elias A, Shea TC et al. Phase I-II study of cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin with autologous bone marrow transplantation in solid tumor patients. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1239-45.
32. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF et al. Treatment of murine leukaemia with X-rays and homologous bone marrow, preliminary communication. *Br Med J* 1956; 32 (4993): 626-7.
33. Mathè G, Amiel JL, Schwartzberg L et al. Successful allogeneic bone marrow transplantation in man: chimerism, induced specific tolerance and possible antileukemic effects. *Blood* 1965; 25: 179.
34. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N et al. Anti-leukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 1981; 304: 1529-31.
35. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 555-62.
36. Parham P, Mc Queen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haemopoietic transplants. *Nat Rev Immunol* 2003; 3 (2): 108-22.

37. Ben-Yosef R, Or R, Nagler A et al. Graft-versus-tumour and graft-versus-leukaemia effect in patient with concurrent breast cancer and acute myelocytic leukaemia. *Lancet* 1996; 348: 1242-3.
38. Slavin S, Gurevitch O, Prighozina T. Induction of bilateral transplantation tolerance to cellular and perfused allografts and xenografts with donor hemopoietic cells. *Ann NY Acad Sci* 1998; 862: 37-44.
39. Barrett J, Childs R. Non-myeloablative stem cell transplants. *British Journal of Haematology* 2000; 111: 6-17.
40. Slavin S, Nagler A, Naparstek E et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant hematologic diseases. *Blood* 1998; 91: 756-63.
41. Locatelli F, Pession A. *Trapianto di cellule staminali emopoietiche in pediatria*. Mosby Doyma Italia 1996.
42. Glucksberg H, Storb R, Feefr A et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 1974; 18: 295-302.
43. Tavassoli M, Friedenstein A. Hemopoietic stromal micro-environment. *Am J of Hematol* 1983; 15: 195-203.
44. Lichtman MA. The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review. *Exp Hematol* 1981; 9: 391-410.
45. Allen TD, Dexter TM, Simmons PJ. Marrow biology and stem cells. *Immunology Series* 1990; 49: 1-38.
46. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology* 1999; 181: 67-73.
47. Toksoz D, Dexter TM, Lord BI et al. The regulation of hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. II. Stimulation and inhibition of stem cell proliferate. *Blood* 1980; 55: 931-6.
48. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2: 83-92.
49. Owen M. Marrow stromal cells. *J of Cell Science* 1988; 10 (S): 63-76.

50. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57-66
51. Galotto M, Berisso G, Delfino L et al. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* 1999; 27: 1460-6.
52. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al. Cardiomyocytes can be generated from adult bone marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705.
53. Klyushnenkova E, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell responses in vitro: implications for allogeneic transplantation. *Blood* 1998; 92: 642a.
54. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-43.
55. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2005; 11: 321-34.
56. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30: 42-8.
57. Lazarus HM, Curtin P, Devine S et al. Role of mesenchymal stem cells in allogeneic transplantation: early phase I clinical results. *Blood* 2000; 96: 1961a.
58. Frassoni F, Labopin M, Bacigalupo A et al. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical hemopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft versus host disease: a matched pair analysis. *Bone Marrow Transplantation* 2002; 29 (S): 2.
59. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008 May; 371: 1579-86.
60. Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N et al. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 2000; 95: 3620-7.

61. Noort WA, Kruisselbrink de Paus RA et al. Co-transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) and UCB CD34+ cells results in enhanced hematopoietic engraftment in NOD/SCID mice without homing of MSC to the bone marrow. *Blood* 2001; 98: 295a.
62. Bacigalupo A. Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. *Best Practice and Research Clinical Haematology* 2004; 17 (3): 387-99.
63. Lucchini G, Introna M, Dander E et al. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 1-9.
64. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8932-7.
65. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 2005; 11: 389-98.
66. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 307-16.
67. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007; 110: 2764-7.
68. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007; 21: 1733-8.
69. Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 2005; 23: 1357-66.
70. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol* 2006 Sep; 121-30.

