

IL TRAPIANTO DI MIDOLLO

Un passo avanti per le malattie autoimmuni intrattabili

M. ANDOLINA, M. RABUSIN, N. MAXIMOVA, S. PARCO, M. CANDUSSO, D. FARAGUNA, L. LEPORE

Clinica Pediatrica, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

BONE MARROW TRANSPLANTATION IN AUTOIMMUNE DISEASES

(M&B 4, 233-236, 1998)

Key words

Autoimmune diseases, Chronic arthritis, Stem cell transplantation

Summary

We report the results of a series of autologous stem cell transplants in autoimmune diseases.

The stem cells were treated ex vivo with vincristine and methylprednisolone as previously in allogeneic mismatched transplants in advanced leukemia. The conditioning regimen was: cyclophosphamide and antilymphocytic serum (+AraC in multiple sclerosis). The outcome was very good in 2 over 3 patients with scleroderma secondary to chronic GVHD (1 relapsed after 6 months), in 3 juvenile chronic arthritis, in 1 myasthenia gravis, 1 multiple sclerosis, 1 pure red cell aplasia (relapsed 5 months later); 1 patient with autoimmune enteropathy had only laboratory improvements (absorption, biopsy). 1 patient with systemic vasculitis and 1 with SLE in CLL seem improving after a short follow up.

The patients did not suffer from major untoward effects and were discharged after 10 days in treatment with cyclosporin and cortison (progressively withdrawn).

Il trapianto di midollo osseo o di cellule staminali emopoietiche (PBSC) rappresenta una forma di terapia ormai routinaria in una serie di malattie neoplastiche o ereditarie. Metodica gravata da una mortalità che va dal 5% al 20% a seconda del tipo di trapianto (autologo o allogenico, compatibile o meno) e della fase di malattia, il trapianto è stato inizialmente riservato a malattie a breve aspettativa di vita come la leucemia recidivata. Più di recente se ne è generalmente accettato l'impiego anche in malattie in cui l'aspettativa di vita può essere di decenni, con una qualità di vita non inaccettabile, come nella talassemia.

Nell'eterogeneo firmamento delle malattie autoimmuni, accanto a molte situazioni in cui il trattamento medico ottiene buoni risultati, esistono malattie e pazienti in cui l'aspettativa e la qualità di vita non sono migliori di quella di alcuni pazienti ematologici (come quelli con leucemia mieloide cronica o linfomi "indolenti"). La maggior parte delle condizioni più sfortunate non sono pediatriche, essendo i risultati ottenibili dai reumatologi pediatri più confortanti di quelli dei reumatologi dell'adulto. Esistono comunque situazioni, più legate al soggetto che alla malattia particolare ("alcune" artriti croniche, "alcuni" lupus, alcune enteropatie autoimmuni ecc.), in cui il decorso clinico porta a limitazioni funzionali irreversibili dovute alla malattia (anchilosi, insufficienza intestinale, danno neurologico, insufficienza renale) o alla terapia (nanismo, farmacodipendenza) e in pochi casi anche alla morte.

Quindi, quando esperienze aneddotiche e modelli sperimentali hanno confermato le premesse teoriche secondo cui un trapianto di midollo osseo poteva guarire una malattia autoimmune, è nato un consenso generale¹ sull'opportunità di sottoporre alcuni pazienti a tale procedura terapeutica.

ESPERIENZE SULL'ANIMALE

Topi e ratti con artrite da adiuvante (modello sperimentale di RA) o con encefalite allergica sperimentale (modello di sclerosi multipla) sono stati trattati con trapianto di midollo osseo da donatori singenici². Il risultato ha confermato le premesse teoriche.

Il dato più imprevedibile è stato quello ottenuto con midollo autologo (prelevato dallo stesso animale): pur in una percentuale inferiore, dipendente anche dal ceppo dell'animale, e con una notevole percentuale di recidive, anche questi topi hanno dimostrato l'efficacia del trapianto.

ESPERIENZE ANEDDOTICHE

Può capitare che un paziente che abbia un'indicazione emato-oncologica al trapianto soffra anche di una concomitante malattia autoimmune.

Ad esempio:

□ pazienti con anemia aplastica secondaria a trattamento con sali d'oro per AR sono guariti dopo trapianto allogenico di midollo³;

□ pazienti con leucemia affetti anche da artrite reumatoide, colite ulcerosa, psoriasi ecc. sono guariti, dopo trapianto, anche della malattia autoimmune;

□ pazienti affetti da linfoma e malattia autoimmune, sottoposti a trapianto di midollo autologo, sono allo stesso modo guariti da entrambe le malattie⁴.

Il trapianto, nella maggior parte di questi casi, è stato fatto con midollo eterologo.

TRAPIANTI "MIRATI"

Il trapianto "mirato" a malattie autoimmuni, in assenza di patologia oncologica, è fatto con midollo autologo.

Il primo trapianto di cellule staminali autologhe è stato eseguito nel 1994 dal prof. Marmont a Genova su una donna affetta da sindrome di CREST. Il vantaggio per la paziente è stato di brevissima durata⁵.

Lo stesso anno anche noi abbiamo applicato una metodica originale (vedi più avanti) alla prima di tre sclerodermie secondarie a GVHD (malattia da rigetto contro l'ospite) cronica⁶. Sono seguite a livello internazionale esperienze in varie malattie, con varie metodiche.

METODICHE

Trattamento del midollo o delle PBSC

Il midollo osseo viene prelevato, nei pazienti privi di accesso venoso adatto all'afèresi di PBSC (lattanti, sclerodermie), dalle creste iliache posteriori superiori, in anestesia generale o peridurale.

Le cellule staminali periferiche (PBSC) sono prelevate con procedura aferetica a ciclo continuo o discontinuo (uno o due aghi) previa stimolazione con G-CSF per 1-5 giorni. Dal momento che, soprattutto nelle artriti reumatoidi, l'uso del G-CSF può associarsi a una "fiammata" di sintomi, noi abbiamo preferito la somministrazione per un giorno solo nella maggior parte dei pazienti. Di fatto le cellule che noi vogliamo reinfondere sono essenzialmente linfociti, dal momento che l'infusione di cellule staminali non è necessaria quando il condizionamento sia limitato alla ciclofosfamida.

La maggior parte dei ricercatori ha invece utilizzato una prima dose "priming" di ciclofosfamida con l'intento di periferizzare le cellule staminali (e nel contempo eliminare gran parte dei linfociti) prima del prelievo di PBSC.

Chi usa eliminare i linfociti anche dalla sospensione cellulare utilizza essenzialmente la metodica della selezione positiva delle cellule staminali (CD34+). Come detto, i linfociti possono essere uccisi in vivo dalla dose "priming" di ciclofosfamida oppure, come nella esperienza del gruppo di Salonicco, con la somministrazione di siero antilinfocitario dopo la reinfusione delle PBSC.

La nostra metodica di trattamento del midollo o delle PBSC deriva dalla nostra esperienza nei trapianti da familiare non compatibili per 2-3 loci HLA (Tabella I).

Tale trattamento inibisce in vitro la coltura mista linfocitaria (MLC), la produzione di linfociti citotossici (CTL) e di interleukina II. Tale effetto è mantenuto per settimane se alla coltura vengono aggiunte piccole dosi di cortisone e/o ciclosporina^{8,10}. Di fatto in 50 trapianti *mismatched* (incompatibili) da noi effet-

TRATTAMENTO DEL MIDOLLO O DELLE PBSC

1. Concentrazione della sospensione cellulare in 50-100 ml
2. Incubazione a 38,5°C con vincristina 1,5 µg/ml e metilprednisolone 3 mg/ml
3. Congelamento immediato senza lavare i farmaci
4. Infusione rapida (15') dopo scongelamento in acqua a 40°C

Tabella I

tuati a Trieste il problema della GVHD, pur talvolta grave, non è stato peggiore di quello sofferto da pazienti che avevano ricevuto un midollo da donatore compatibile non tollerato (MUD).

Regimi di condizionamento

Nei trapianti per leucemia il regime di condizionamento serve a eradicare la malattia (attività antineoplastica), eliminare l'emopoiesi del ricevente (per fare spazio al nuovo midollo) e uccidere i linfociti (per impedire il rigetto). Nel trapianto autologo il fine è esclusivamente quello di eradicare la malattia residua, ma gli altri due effetti sono quasi inevitabili per l'attività dei farmaci impiegati.

Dal momento che i trapianti di midollo sono fatti da ematologi, le tradizioni (e rigidità) ematologiche sono state talvolta trasferite al trapianto per malattie autoimmuni. I farmaci utilizzabili sono diversi.

1. Ciclofosfamida. Si tratta del più potente farmaco immunosoppressivo, a effetto linfopenizzante. Pur possedendo un effetto leucopenizzante, non esiste praticamente dose di ciclofosfamida che possa causare un'aplasia midollare irreversibile, in quanto il bersaglio del farmaco sono le cellule già differenziate. Viene addirittura utilizzata, anche a dosi superiori a quelle che si usano nei trapianti, per "spremere" nel sangue periferico le cellule staminali, per poi prelevarle per afèresi. Quindi alcuni protocolli di trapianto prevedono la somministrazione di alte dosi di ciclofosfamida seguita, dopo 5 giorni dalla somministrazione, dal G-CSF fino circa al decimo giorno, quando il paziente viene sottoposto ad afèresi di PBSC. Tali cellule, molto povere in linfociti, vengono congelate e reinfuse dopo un secondo trattamento farmacologico (condizionamento al trapianto) che in alcuni casi è rappresentato dalla ciclofosfamida stessa.

2. Irradiazione corporea totale (TBI) + ciclofosfamida. Si tratta del più classico regime di condizionamento per le leucemie. Per quanto riguarda le malattie autoimmuni la TBI ha il vantaggio di possedere un innegabile effetto

immunosoppressivo e di penetrare anche in "santuari" come il SNC. Le dosi impiegate in ematologia vanno da 750 a 1200 cGy a seconda del *dose rate* e del frazionamento. I colleghi olandesi hanno utilizzato una dose di 400 cGy per condizionare i bambini con artrite cronica. L'effetto più temuto delle radiazioni è quello cancerogeno a distanza.

3. Ciclofosfamida + uno o più farmaci mielotossici. Il busulfano, il tiotepa, la nitrosurea e altri farmaci antineoplastici hanno un effetto mielotossico sulle cellule staminali, ma un modesto effetto immunosoppressivo. Tale cocktail causa una mielodepressione completa e impone la reinfusione delle cellule staminali, ma non aggiunge molto all'immunosoppressione da sola ciclofosfamida. Utilizzando condizionamenti fortemente mielotossici, è pressoché impossibile evitare una mortalità non inferiore al 5%.

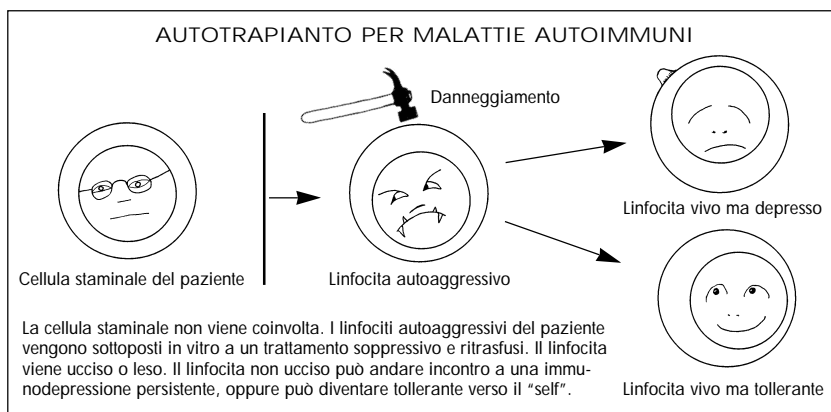
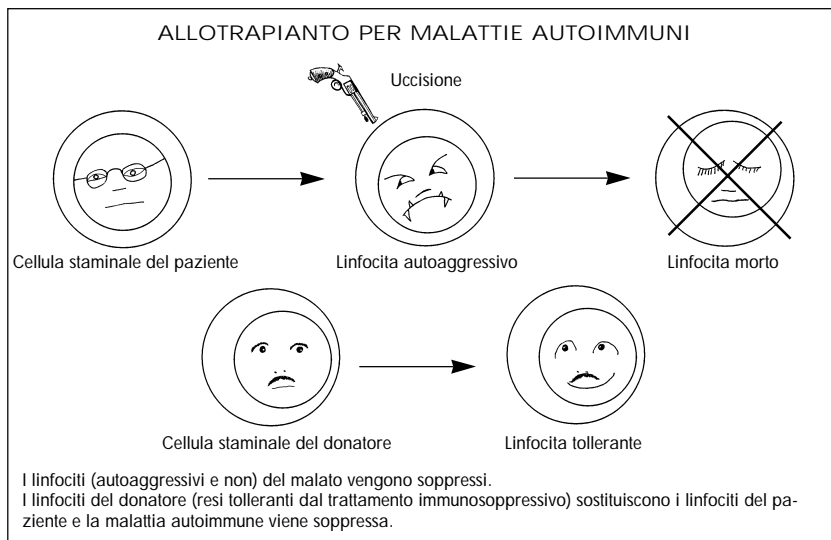
L'ESPERIENZA CLINICA, NOSTRA E ALTRI

I dati raccolti dal gruppo collaborativo europeo (EBMT/EULAR) riguardano 49 pazienti, di cui uno è deceduto per cause correlate al trapianto, uno durante la mobilitazione delle PBSC (aplasia da ciclofosfamida), e due sono deceduti per cause connesse con la malattia di base.

Sclerosi multipla (23 casi)

Non di interesse pediatrico, comunque di rilevante significato anche sperimentale, la sclerosi multipla è una malattia progressiva con decorso molto capriccioso. È molto difficile individuare un paziente senza danni gravi e irreversibili in cui si sia ragionevolmente certi che la malattia sia a cattiva prognosi nel breve termine. Noi stessi abbiamo sottoposto un giovane (anni 22) a trapianto autologo dopo un decorso di un solo anno ma con progressione apparentemente inarrestabile dei sintomi neurologici. Il protocollo di condizionamento al trapianto ha incluso oltre alla ciclofosfamida anche due farmaci linfocitotossici in grado di passare la barriera ematoencefalica: il desametasone (50 mg/mq) e l'AraC (2 g/mq). Il paziente dopo un mese ha ripreso a camminare senza sostegno.

La casistica più importante in questo campo viene dal gruppo di Salonicco¹¹ che ha già effettuato 22 trapianti autologi di PBSC, utilizzando quello che è probabilmente il protocollo più "duro", il BEAM, ad effetto fortemente aplastizzante. Un paziente è deceduto; negli altri, superata una rilevante tossicità peritrapiantologica, il punteggio clinico di



gravità (EDSS) si è significativamente ridotto con un follow-up per la maggior parte dei pazienti superiore all'anno.

Artrite cronica giovanile (6 casi)

Rappresenta evidentemente la situazione di maggior interesse pediatrico. Una minoranza di forme sistemiche e/o poliarticolari ha un'evoluzione che merita un trattamento quale il trapianto autologo.

La prima esperienza è stata del gruppo olandese¹² che ha iniziato nel marzo '97 a sottoporre ad autotrapianto di PBSC quattro bambini con un protocollo di induzione comprendente l'irradiazione corporea totale (TBI) a dosi relativamente basse, 400 cGy, associata a ciclofosfamide. Le PBSC sono state reinfuse prive di linfociti grazie alla metodica di selezione positiva delle cellule staminali emopoietiche (CD34). I risultati clinici sono incoraggianti.

Dall'estate '97 anche noi abbiamo sot-

toposto altre tre bambine a trapianto autologo di PBSC trattate con vincristina e metilprednisolone, dopo condizionamento con ciclofosfamide (2500 mg/mq) e siero antilinfocitario (5 fiale al giorno per tre giorni). Dopo il trapianto le pazienti ricevono ciclosporina A (previsione di trattamento sine die) e cortisone a dosi a scalare (-20% al mese). Due bambine sono perfettamente ristabilite con normalizzazione di VES e PCR, mentre la terza mantiene una remissione "quasi" completa con PCR negativa solo in terapia cortisonica a dose piena (0,5 mg/kg, del resto inefficace prima del trapianto).

Artrite reumatoide (10 casi)

Dopo il primo caso pubblicato da Joske¹⁵, sono state raccolte le esperienze di Snowden e altri. I protocolli di condizionamento comprendono la ciclofosfamide a dosi da 100 a 200 mg/kg. Le PBSC sono state depletate dai linfociti T in alcuni casi sia grazie a un precedente "pri-

ming" in vivo con alte dosi di ciclofosfamide sia con la selezione positiva delle cellule CD34 ex vivo. I casi che hanno ricevuto le cellule staminali non T deplete hanno sofferto di recidive precoci, soprattutto se condizionati con soli 100 mg/kg di ciclofosfamide.

Lupus eritematoso sistemico (3 casi)

Si tratta di osservazioni sporadiche, non concludenti. L'impressione, per una malattia che probabilmente darà meno soddisfazioni di altre, è di una efficacia clinica parziale, che in alcuni casi è documentata almeno da un miglioramento con dosi più basse che prima del trapianto.

Miastenia gravis (1 caso)

Altra malattia non pediatrica, che nel 10% dei casi non risponde alla plasmaferesi, e che citiamo essenzialmente perché il primo successo è nostro e dei nostri colleghi di Belgrado, che hanno applicato il nostro modello. La paziente, già tracheotomizzata e del tutto paralizzata, è migliorata rapidamente e, dopo sei mesi, conduce una vita normale con EMG normale.

Sclerosi sistemica (10 casi)

Come detto, abbiamo utilizzato il nostro metodo per la prima volta 4 anni fa in un caso di sclerodermia gravissima secondaria a GVHD cronica. La paziente in condizioni critiche e psicologicamente molto labile, durante la terapia di condizionamento in cui avevamo programmato la somministrazione di 200 mg/kg di ciclofosfamide, ci impose la sospensione delle infusioni dopo soli 40 mg/kg, cui seguirono tre giorni di infusione di siero antilinfocitario. Il risultato fu tale (guarigione completa) che da allora non abbiamo ritoccato che marginalmente il dosaggio della ciclofosfamide. Dei due pazienti successivi, uno rimane notevolmente migliorato (pochi cm² di cute coinvolta) dopo due anni dal trapianto, mentre un'altra paziente migliorata transitoriamente è recidivata sei mesi dopo.

Più di recente altri e in particolare il gruppo di Pavia¹⁷ hanno riportato dei successi in casi di sclerosi sistemica non secondaria a trapianto.

Pure red cell aplasia (1 caso)

Un caso non pediatrico, trapiantato a Belgrado con la nostra collaborazione, già legato a trasfusioni con cadenza tri-settimanale, ebbe una remissione completa, ma recidivò 5 mesi più tardi. Il paziente, abitante nel Kosovo, aveva so-

speso arbitrariamente (o forzatamente) il trattamento con ciclosporina.

Enteropatia autoimmune (1 caso)

Una nostra bambina di 13 anni, in nutrizione parenterale totale fin dal primo anno di vita, dopo il trapianto di midollo osseo (accessi venosi inesistenti per il prelievo di PBSC) non ha avuto vantaggi clinici (riduzione del volume delle feci, ma dipendenza dalla parenterale totale), mentre i parametri di assorbimento sono notevolmente migliorati. L'assorbimento della ciclosporina orale è quasi normalizzato (livelli ematici nel range terapeutico con dosi <10 mg/kg, mentre prima i livelli ematici erano irrilevanti), normalizzato il rapporto lattulosio/mannitolo. La biopsia intestinale ha dimostrato una notevolissima riduzione dello "score" patologico. Un'accelerazione della crescita (raddoppio) non può essere attribuita con certezza alle nostre cure, ma è certo suggestiva.

Il risultato, pur non utile per questa paziente, pare abbastanza significativo da non sconsigliare di ritentare in un altro paziente con una storia clinica meno lunga.

Miscellanea

Sono riportati trapianti autologhi inoltre in: 1 caso di anemia emolitica autoimmune intrattabile; 2 casi di porpora trombocitopenica intrattabile; 1 caso di sclerosi laterale amiotrofica.

DISCUSSIONE

La pur limitata esperienza nostra e internazionale sembra garantire un vantaggio clinico ottenuto con trapianto di midollo o PBSC per la maggior parte dei pazienti trattati.

Il trapianto autologo, che è la terapia di scelta nelle malattie autoimmuni, non sostituendo la cellula staminale non modifica la predisposizione genetica del paziente, e quindi non garantisce una guarigione *sine die*, che tuttavia appare almeno probabile nella maggior parte dei casi.

Diverso è il discorso per il trapianto allogenico (che viene di regola effettuato per cause ematologiche e che "casualmente" guarisce le malattie autoimmuni compresenti), in cui la sostituzione integrale del sistema immune (sia linfociti che cellule accessorie) sembra garantire la guarigione. In un certo senso, però, resta memorabile, tra la maggior parte dei casi ematologici trapiantati e guariti

da artrite reumatoide, la recidiva di artrite in un caso che fa supporre che in definitiva non tutta la patogenesi dell'artrite cronica sia legata alle caratteristiche genetiche dei linfociti. D'altra parte non tutti i donatori affetti da malattia autoimmune trasferiscono la loro malattia al ricevente.

Vorremmo sottolineare che nel nostro modello, che non prevede l'uccisione delle cellule staminali (resa peraltro più apparente che reale dalla successiva reinfusione), si tratta più che di un trapianto di un trattamento "su banco" del midollo autologo, prelevato al paziente prima del trattamento, e successivamente manipolato "in vitro" e "rieducato" in modo da ottenere una tolleranza immunologica da farmaci, e reinfuso nel paziente, che nel frattempo è stato privato dei suoi linfociti mediante ciclofosfamide e siero antilinfocitario. In sostanza, nel nostro modello si tratta di una immunodepressione spinta, con eliminazione della maggior parte dei linfociti e delle cellule staminali, in vivo, "rieducazione" in vitro dei linfociti restanti e successiva "ripopolazione". A parte gli aspetti concettuali e sperimentali (ma ormai, si potrebbe dire, sperimentati) del trattamento, per sé di interesse generale, è sembrato non peregrino informare tutti i pediatri di questo importante progresso trapiantologico, applicabile con rischio molto contenuto a tutte le forme altrimenti intrattabili di malattia autoimmune. I pazienti hanno tutti tollerato benissimo il trattamento, e sono stati dimessi dieci giorni dopo l'infusione delle cellule staminali. Un solo paziente ha avuto febbre (un giorno). Un solo paziente (già con ridotta funzione midollare) ha avuto bisogno di una trasfusione di piastrine. La maggior parte dei genitori ha ammesso di essere disponibile a sottoporre il figlio a un secondo trapianto in caso di recidiva. Dal punto di vista clinico qualunque paziente potrebbe sopportare un simile protocollo anche più volte.

Come per altri ricercatori non possiamo escludere che parte di quanto facciamo sia irrilevante per il conseguimento del successo clinico; riterremmo necessaria una sperimentazione controllata della procedura con e senza la reinfusione delle cellule trattate con farmaci.

Bibliografia

1. Tyndall A, Gratwohl A: Blood and marrow stem cell transplants in auto-immune disease: a consensus report written on behalf of the European League against Rheumatism (EU-

LAR) and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* Apr, 19, 7, 643-5, 1997.

2. van Bekkum DW: BMT in experimental autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant* Mar, 11, 3, 183-7, 1993.

3. Tyndall A: Hematopoietic stem cell transplantation in rheumatic diseases other than systemic sclerosis and systemic lupus erythematoses. *J Rheum* 48 (suppl), 94-97, 1997.

4. Snowden JA, Patton WN, O'Donnell JL, Hannah EE, Hart DN: Prolonged remission of longstanding systemic lupus erythematosus after autologous bone marrow transplant for non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* Jun, 19, 12, 1247-50, 1997.

5. Marmont AM, Van Bekkum DW: Stem cell transplantation for severe autoimmune diseases: new proposals but still unanswered questions. *Bone Marrow Transplant* Oct, 16, 4, 497-8, 1995.

6. Andolina M, Maximova N, Rabusin M, Parco S, Colovic M, Jankovic G: Bone marrow transplantation in chronic GvHD and autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant*, Nov, 18 (suppl. 2), 145-7, 1996.

8. Marmont AM: Stem cell transplantation for severe autoimmune disorders, with special reference to rheumatic diseases. *J Rheumatol Suppl*, May, 48, 13-8, 1997.

9. Kapoor N, Keever CA, Leong N, Beck EX: Effects of ex vivo treatment with methylprednisolone and vincristine on bone marrow lymphohematopoietic cells. *Prog Clin Biol Res* 377, 49-56, 1992.

10. Lanfranchi A, Andolina M, Tettoni K, Porta F, Locatelli F, De Manzini A, Candotti F, Albertini A: Functional depletion of T cells by vincristine and methylprednisolone as an in vitro model for the prevention of graft versus host disease. *Haematologica* Jan-Feb, 77, 1, 11-5, 1992.

11. Fassas A, Anagnostopoulos A, Kazis A, et al: Peripheral blood progenitor cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 17 (suppl. 1), 69, 1996.

12. Wulffraat NM, van Royen A, et al: Autologous bone marrow transplantation in refractory polyarticular and systemic JCA. *Bone Marrow Transplant* 21 (suppl. 1), 179, 1998.

13. Euler HH, Marmont AM, Bacigalupo A, Fastenrath S, Dreger P, Hoffknecht M, Zander AR, Schalke B, Hahn U, Haas R, Schmitz N: Early recurrence or persistence of autoimmune diseases after unmanipulated autologous stem cell transplantation. *Blood* Nov, 88, 9, 3621-5, 1996.

14. Hahn BH: The potential role of autologous stem cell transplantation in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol Suppl* May, 48, 89-93, 1997.

15. Joske DJ: Autologous bone marrow transplantation for rheumatoid arthritis. *Lancet* 337-338, 1997.

16. Snowden JA, Milliken ST, Brooks PM, Biggs JC: High doses cyclophosphamide with autologous stem cell rescue in severe active rheumatoid arthritis. A dose escalation. *Bone Marrow Transplant* 21 (suppl. 1), 184, 1998.

17. Locatelli F, Ravelli A, Maccario R, et al: Autologous peripheral blood selected CD34+ cell transplantation for the treatment of severe progressive systemic sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 19 (suppl. 1), 208, 1997.