

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA
Ematologia Clinica e Sperimentale

Ciclo XX

MED/15 Malattie del sangue

TITOLO TESI

PURGING E ALTE DOSI DI CHEMIOTERAPIA CON
REINFUSIONE DI CELLULE STAMINALI AUTOLOGHE IN
LINFOMI NON HODGKIN FOLLICOLARI
RESISTENTI/REFRATTARI

Presentata da: Dott.ssa Bassi Simona

Coordinatore Dottorato

Prof Stefano Pileri

Relatore

Prof Pier Luigi Zinzani

Esame finale anno 2008

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 1
PAZIENTI MATERIALI E METODI	pag. 6
RISULTATI	pag. 8
DISCUSSIONE	pag. 12
FIGURE	pag. 16
TABELLE	pag. 17
BIBLIOGRAFIA	pag. 19

INTRODUZIONE

Il linfoma follicolare (FL) è il secondo sottotipo più comune di Linfoma non-Hodgkin (LNH) a cellule B e il più frequente tra i cosiddetti “linfomi indolenti”.¹ Ha un’incidenza di circa 2 casi ogni 100.000 abitanti nei Paesi occidentali e negli ultimi 30 anni si è quasi duplicata.²

Morfologicamente nell’ambito della “Revised European-American classification of lymphoid neoplasms” (REAL) e della più recente “World Health Organization (WHO) classification” il FL è descritto come una patologia maligna originante dalle cellule B del centro follicolare, in cui i centrociti (piccole cellule clivate) sono il tipo cellulare predominante, mentre i centroblasti (cellule di grandi dimensioni non-clivate) sono presenti in numero variabile e in genere in minoranza. Rispetto ad altri linfomi maligni nel FL si distinguono 3 differenti gradi di malignità sulla base del numero dei centroblasti valutati ad alta risoluzione e a sua volta il grado 3 è suddiviso in altri 2 sottotipi (3a e 3b). Mentre è ampiamente accettato che il grado 3b di FL si comporta clinicamente più come un linfoma diffuso a grandi cellule, e pertanto dovrebbe esser trattato come tale, rimane ancora da definire se la differenziazione tra grado 1 e 3a abbia un significato clinico.³⁻⁵

L’eziologia del FL è sconosciuta, ma molto è stato scoperto recentemente nell’ambito dei meccanismi biologici alla base del suo sviluppo. Nel 85-90% dei casi di grado 1 e 2, il FL è associato a una traslocazione cromosomica - $t(14;18)(q32;q21)$ -, che giustappone il gene *BCL-2*, posizionato sul cromosoma 18, sotto l’influenza trascrizionale del gene delle catene pesanti delle immunoglobuline sul cromosoma 14, portando all’espressione costituzionale di *BCL-2*. Il Bcl-2 è una protoproteina facente parte della famiglia delle proteine del Bcl-2, che sono importanti regolatori dell’apoptosi. Il Bcl-2 è una proteina con funzione anti-apoptotica, in quanto in grado di ridurre la permeabilità della membrana mitocondriale, impedendo così il rilascio del citocromo-c. In genere questo

citocromo se rilasciato, attiva il processo dell'apoptosi tramite la via delle caspasi. L'alterata espressione di BCL-2 è sicuramente un evento critico ed iniziale nella "linfomagenesi" del FL, ma non è il solo, infatti il FL è caratterizzato alla diagnosi da una marcata eterogeneità nel numero degli eventi clonali (in genere almeno 6), che potrebbe giustificare anche la variabilità del suo comportamento clinico.⁶⁻⁸

E' una patologia che interessa nei 2/3 dei casi pazienti di età inferiore ai 60 anni senza prevalenza di un sesso sull'altro. Sin dall'esordio si presenta con linfadenopatie diffuse in assenza di sintomi specifici, con il coinvolgimento del midollo in circa il 50% dei casi. Infrequente è l'interessamento della milza.⁹

Nel corso della malattia il FL può variare di istologia in un linfoma diffuso a grandi cellule, la cui incidenza in letteratura è stata riportata variamente fra il 10-70% dei casi e la cui frequenza è indipendente da quando è stato inizio il trattamento. La trasformazione in un linfoma aggressivo è generalmente un fattore prognostico negativo e può essere l'evento finale, in quanto associata a un cambiamento del comportamento della malattia con lo sviluppo rapido e progressivo di linfadenopatie e con la comparsa di sintomi sistemici.¹⁰⁻¹¹

La prognosi e la terapia nel FL sono strettamente correlate con l'estensione della malattia alla diagnosi, che è definita secondo il sistema di Ann Arbor. La maggior parte dei pazienti si presenta in stadio avanzato III o V ed è considerata una patologia non curabile con i regimi di chemioterapia convenzionale, in quanto la sua storia naturale è caratterizzata, dopo il trattamento di prima linea e la prima recidiva di malattia, da un continuum di recidive chemiosensibili di durata progressivamente più breve sino alla morte per progressione di malattia.

Nella storia del trattamento del FL, agli inizi degli anni ottanta risultò chiaro che la storia naturale del FL potesse essere modificata dall'impiego della chemioterapia e della radioterapia, portando così il tempo mediano di sopravvivenza a circa 10 anni.¹²⁻¹³ Le

probabilità di cura erano scarse ad eccezione forse di una porzione di pazienti con malattia localizzata trattati con radioterapia.¹⁴⁻¹⁵ Tentativi di migliorarne la prognosi con l'intensificazione della prima linea portarono sicuramente a una maggiore entità di risposte, anche complete, e a una prolungata durata della remissione rispetto all'uso dell'alchilante in monoterapia, senza però avere impatto sulla sopravvivenza.¹⁶⁻¹⁷ Sulla scia degli entusiasmi per l'impiego di regimi di radio-chemioterapia mieloablativi con supporto di cellule staminali autologhe (ASCT) nel LNH aggressivo¹⁸⁻¹⁹, il concetto di terapia intensificata con alte dosi di chemioterapici venne estesa alla gestione dei pazienti con linfoma indolente con la speranza che una prolungata remissione si convertisse in cura. Dalla metà degli anni novanta da diversi studi di fase II emersero evidenze significative che la chemioterapia ad alte dosi con ASCT portasse al prolungamento della sopravvivenza libera da malattia (DFS) in pazienti con ricorrente FL in stadio avanzato. Nonostante ciò il ruolo di una definita superiorità del ASCT in pazienti recidivati con FL avanzato sulla terapia convenzionale rimane ancora una questione aperta, in quanto non è attualmente disponibile alcun studio prospettico randomizzato valutabile, visto che l'unico studio di questo tipo ad oggi pubblicato è stato inficiato da un lento arruolamento e da un numero di pazienti inferiori all'atteso (140 versus 250), oltre che da una estrema complessità del disegno dello studio.²⁰⁻²³

Diversi aspetti tecnici, quali la metodica di raccolta delle cellule staminali oppure il tipo di regime di condizionamento utilizzato, possono avere un'influenza non indifferente sull'esito finale della procedura trapiantologia. Nonostante la maggior parte dei pazienti affetti da FL presenti uno stadio avanzato di malattia con interessamento midollare, di fronte a una non-evidenza istologica di coinvolgimento del midollo si possono ancora trovare, con tecniche di "polymerase chain reaction" (PCR), cellule linfomatose occulte. Queste nell'atto della raccolta delle cellule staminali potrebbero contaminare l'aferesi e una volta reinfuse, contribuire alla recidiva

di malattia post-trapianto.²⁴ Al fine di ridurre il rischio di reinfusione di cellule patologiche nel corso degli anni sono state applicate diverse tecniche di “purgino” inizialmente “in vitro” al momento della raccolta dei progenitori ematopoietici midollari o periferici. Tra questi si distinguono metodiche di “selezione positiva” (es. arricchimento della graft con cellule CD34+, marker supposto mancante nelle cellule linfomatose)²⁵ di “selezione negativa” (es. con l’esposizione a specifici anticorpi linfoma-specifici).²⁶ Diversi studi hanno dimostrato come la riduzione delle cellule contaminanti nella raccolta tramite “purgino in vitro” correli con una più prolungata sopravvivenza libera da malattia, anche se l’ottenimento di una raccolta esente da cellule tumorali potrebbe essere espressione della chemio-sensibilità della malattia al trattamento.^{22,27} L’unico studio che ha cercato in maniera prospettica randomizzata di testare l’efficacia della terapia mieloablativa di consolidamento seguita dalla reinfusione di cellule staminali purgate e non è stato il CUP trial, ma per i motivi sopra riportati la sopravvivenza era valutabile solo su 89 pazienti limitando così l’interpretazione dei dati.²³ La recente introduzione dell’anticorpo monoclonale anti-CD20+ - Rituximab® - ha permesso di considerare nuove vie terapeutiche, quali l’impiego dell’anticorpo monoclonale come agente di “purgino in vivo” nel regime preparatorio alla procedura trapiantologia oppure come consolidamento dopo trapianto per eradicare la malattia minima residua. La fattibilità del “purgino in vivo” è stato dimostrato da uno studio pilota, in cui è stato possibile ottenere raccolte di cellule staminali periferiche PCR negative in pazienti fortemente pretrattati con malattia refrattaria o recidivata.²⁸ Studi successivi hanno poi dimostrato come nei pazienti trattati nella fase pre-trapianto con Rituximab, vi fosse una maggiore percentuale di raccolte PCR negative rispetto a un gruppo di controllo.²⁹⁻³⁰

Al fine di verificare la fattibilità e l’efficacia della condotta sino ad ora da noi seguita per pazienti pretrattati con FL, abbiamo analizzato una coorte di 28 pazienti che nell’ultimo decennio sono stati avviati

presso l'istituto alle alte dosi con reinfusione di cellule staminali autologhe e questo anche alla luce di recenti reports di diversi gruppi, in cui è stato riportato un miglioramento significativo della sopravvivenza nei FL con la chemioterapia mieloablativa seguita da reinfusione di cellule staminali autologhe, grazie anche all'associazione di nuove strategie terapeutiche, quali gli anticorpi monoclonali e i radio-immunoconiugati con un potenziamento dell'efficacia del regime ad alte dosi.³¹⁻³²

PAZIENTI E METODI

Dall'agosto 1997 al dicembre 2007 presso l'Istituto Europeo di Oncologia di Milano 28 pazienti refrattari/recidivati affetti da FL sono stati sottoposti ad alte dosi di chemioterapia seguita da reinfusione di cellule staminali periferiche autologhe. Per "refrattari" intendiamo pazienti, che sottoposti a una o più linee di trattamento, abbiano ottenuto quale migliore riposta una riduzione della malattia $\geq 50\%$, seguita poi da progressione di malattia, mentre per "recidivati", pazienti che hanno mostrato una remissione completa di malattia di durata uguale o superiore a 1 anno.

Prima di accedere alla fase di intensificazione i pazienti venivano sottoposti a 2-3 cicli di terapia secondo schema CHOP-like,³³ seguiti da chemioterapia di mobilizzazione con Ciclofosfamide 4 gr/mq associata a fattore di crescita granulocitario (G-CSF 5 μ g/Kg/die sottocute) per la raccolta di cellule staminali periferiche autologhe. Per la raccolta è stata utilizzata una macchina per leucoaferesi della COBE (Denver, CO, USA). Dal 1999 al 2001 le aferesi, al momento antecedente alla criopreservazione, venivano sottoposte in maniera non-random a "purging in vitro" con selezione positiva delle CD34+ con bande immunomagnetiche, utilizzando la tecnica di separazione cellulare CliniMACS.²⁵ Dal 2002 ad oggi è stato invece inserito quale "agente per purging in vivo" il Rituximab in tutte le fasi di trattamento (preparatoria e successivamente anche nel regime di condizionamento). Tutte le raccolte sono state inoltre testate qualitativamente in PCR per quanto riguarda il riarrangiamento di bcl-2/IgH al fine di valutare l'eventuale contaminazione tumorale residua.³⁴

Dopo aferesi, considerata soddisfacente se CD34+/Kg $\geq 2,0 \times 10^6$, seguivano 3 cicli di terapia con l'impiego di un analogo purinico (2-clorodeossadenosina -2-CdA-) alla dose di 0,14-0,1 mg/Kg/die sottocute per 5 giorni consecutivi ogni 3-4 settimane a seconda del periodo considerato. Il regime di condizionamento comprendeva l'associazione tra un antibiotico antitumorale e un alchilante:

Mitoxantrone 60mg/mq in 3 somministrazioni da 20mg/mq in unico giorno + Alkeran 120mg/mq/die a distanza di 2 giorni dal precedente. Per ulteriori specifiche relative alla schedula di trattamento si veda **figura 1**.

Tra gli obiettivi primari dello studio vi era la valutazione della fattibilità e della sicurezza dello schema di terapia descritto e in particolare la tossicità a breve e a lungo termine delle alte dosi globalmente e per tipo di cellule staminali autologhe reinfuse secondo i criteri NCI versione 2.0³⁵

Secondariamente sono stati valutati la percentuale di risposta al trattamento, definita secondo criteri riconosciuti internazionalmente,³⁶ per l'intera coorte e anche per sottogruppi di pazienti refrattari/recidivati e per il tipo di cellule ricevute (purgate e non). Inoltre sono stati definiti il tempo libero da malattia, inteso come il tempo dalla terapia mieloablativa sino alla documentata progressione o recidiva e la sopravvivenza, definita come il tempo dalla procedura trapiantologia alla morte per ogni causa, utilizzato il metodo di Kaplan-Meier.³⁷

RISULTATI

Le caratteristiche dei 28 pazienti al momento della diagnosi sono riportate in **Tabella 1** e risultano essere sovrapponibili a quelle attese per il sottotipo di linfoma considerato, soprattutto in termini di sesso, età mediana (50 anni), estensione di malattia (64% in stadio avanzato di malattia) ed sintomi all'esordio (assenti nel 71% dei casi). Minore all'atteso, la percentuale di pazienti con interessamento midollare al momento della diagnosi. Si distinguono 2 sottogruppi di pazienti: 18 "refrattari" e 10 "recidivati", in cui 13 e il 6 rispettivamente tali dopo una sola linea di terapia, pari al 68% dell'intera casistica. La demografica per sottogruppo non si discosta da quella dell'intera coorte, ad eccezione di una età mediana inferiore alla diagnosi nel sottogruppo dei resistenti (46 anni versus 51 anni).

Nella fase di induzione tutti i pazienti hanno ricevuto in media 2 cicli di chemioterapia secondo schema ACOD in assenza di tossicità limitanti il proseguo terapeutico. Al momento della raccolta delle cellule staminali periferiche 19 pazienti (68%) presentavano una remissione parziale di malattia e 3 una completa, di cui due nel sottogruppo dei recidivati. La mediana di CD34+/Kg raccolte è stata di $4,5 \times 10^6$ pro Kg e con una sola procedura aferetica nel 54% dei casi. Nonostante 3 pazienti abbiano fallito la raccolta, in quanto la quantità di CD34+/Kg è stata $\leq 2,0$, tutti e 3 sono passati comunque alle fasi successive del trattamento. Nessuna differenza in termini di raccolta di CD34+ è stata osservata all'interno dei 2 sottogruppi pazienti refrattari/recidivati. In più di terzo dei pazienti le aferesi sono state sottoposte a processo di "purgino in vitro" con un grado di purezza di CD34+ uguale o superiore al 90% in 6 casi su 10 e con un recupero di cellule raccolte di più del 70%, anche in questo caso in 6 aferesi su 10 processate. Nei restanti 18 pazienti, in 9 casi le aferesi non sono state sottoposte a nessun processo di purgino prima della criopreservazione, mentre 9 pazienti erano stati trattati con immuno-chemioterapia, ricevendo in media 3 somministrazioni di

Rituximab a dosi standard prima della raccolta. In circa l'80% dei pazienti, le raccolte sono state inoltre valutate qualitativamente in PCR per il riarrangiamento di Bcl-2/IgH, che è risultato assente nel 64% dei casi, mentre in 3 casi era presente, nonostante in un caso su 3 l'aferesi fosse stata sottoposta a purging in vitro.

Successivamente tutti i pazienti hanno eseguito 3 cicli di chemioterapia con l'impiego dei 2CdA, ad eccezione di un paziente nel quale non si è proceduto con il 3° ciclo, perché il secondo è stato complicato da neutropenia febbrile severa non attesa.

Nella fase pre-trapianto, in 24 pazienti valutabili, si sono osservate 11 remissioni complete, 9 parziali e stabilità di malattia in 2 pazienti. Al febbraio 2008 dopo un tempo mediano dalla diagnosi di 24 mesi (13-95) 25 pazienti, pari al 89% dell'intera casistica, ha completato la fase finale di intensificazione e risultano essere valutabili. Dei restanti 3 pazienti, una paziente sta eseguendo attualmente il regime di condizionamento, mentre due non sono acceduti alla fase finale, in quanto in progressione di malattia.

Lo schema di condizionamento è risultato ben tollerato con l'assenza di sintomi attesi quali nausea e vomito rispettivamente nel 30% e 60% dei pazienti. Altri effetti collaterali di rilievo correlabili in primis al tipo di chemioterapia mieloablativa utilizzata non sono stati riportati.

In termini di cellule staminali autologhe reinfuse, la mediana di CD34+ per paziente è stato di $2,6 \times 10^6$ pro Kg. Dopo condizionamento 6 pazienti hanno ricevuto una quantità di cellule inferiori a $2,0 \times 10^6$ pro Kg con una fase di aplasia caratterizzata in 3 casi su 6 da un recupero ematologico post-trapianto tardivo, soprattutto in termini di piastrine, e da un alto tasso infettivo, tra cui 4 casi di polmonite, in un caso con decesso di una paziente 23 giorni dal trapianto, e uno shock settico in un paziente con decesso a 7 mesi dal trapianto.

Nel corso della fase di aplasia tutti i pazienti hanno presentato mucosite; nella maggior parte dei casi il grado massimo riportato è

stato ≤ 2 (17 casi) e solo nel 30% dei casi è risultata essere di grado ≥ 2 .

Per quanto riguarda il recupero ematologico e l'incidenza di complicazioni correlabili alla procedura trapiantologica, è stata eseguita anche un'analisi per sottogruppi di pazienti sulla base del tipo di cellule reinfuse (purgate e non), oltre che quella sull'intera coorte di pazienti (**Tabella 2**). In pazienti in cui le aferesi non sono state sottoposte a purging, si è osservato una durata dell'aplasia minore (10 giorni versus 11 giorni dell'intera casistica) e un più veloce recupero dei valori di piastrine $>20.000/\text{mmc}$ (11 giorni rispetto 14 giorni di mediana dell'intera casistica). Nei pazienti, le cui cellule hanno subito un processo di "purging in vitro" con selezione e reinfusione delle sole CD34+, un tempo maggiore nell'attecchimento era atteso, in quanto le aferesi sono state private di cellule già in parte commissionate e utili per un più rapido nel recupero ematologico dopo alte dosi. Ciò ha comportato la necessità di un ricovero più prolungato rispetto a quello dei pazienti riceventi cellule non manipolate, ma data l'esiguità della campione in studio queste evidenze permangono non statisticamente significative. Non è stato osservata una relazione tra numero di CD34+ pro Kg reinfuse e tempo di recupero dei globuli bianchi, mentre sembra esserci una correlazione in termini di recupero piastrinico, soprattutto in pazienti con CD34+ pro Kg $<2,0 \times 10^6$, non statisticamente significativa per la scarsa potenza della coorte. In termini di terapia trasfusionale 21 pazienti su 25 ha richiesto un supporto con una media di 3 unità globuli rossi per paziente trasfuso e tutti i pazienti in media hanno ricevuto 2 pool piastrinici.

In fase di aplasia il 88% dei pazienti ha presentato febbre. Sono state documentate 6 infezioni batteriche microbiologicamente documentate con una prevalenza di Gram+ (4 casi) e 6 polmoniti radiologicamente documentate, di cui 4 casi in pazienti che hanno ricevuto un quantitativo di CD34+ pro Kg $<2,0 \times 10^6$. Tra questi è compreso un caso di legionella che è stato causa del decesso della paziente entro un mese dal trapianto. Non è stata documentata

un'aumentata incidenza di complicazioni infettive in pazienti a seconda del tipo di cellule ricevuti (purgate e non) al momento della reinfusione.

A tre mesi dal trapianto, 22 pazienti erano in remissione completa di malattia, due in parziale e uno non era valutabile in quanto deceduto a 23 giorni dalla reinfusione per complicazione infettiva. Nessuna differenza sostanziale in termini di risposta tra i sottogruppi "refrattari" e "recidivati" (**Tabella 3**). Dopo un tempo mediano di 14 mesi (8-97) 9 pazienti, in remissione completa a 3 mesi, hanno presentato progressione di malattia e 4 sono deceduti, compresi 2 per trasformazione verso linfoma ad alto grado. In particolare tra i pazienti in progressione post-trapianto nel sottogruppo dei "recidivati" al baseline si è osservato un tempo alla recidiva più lungo (20 mesi versus 12 mesi) rispetto al sottogruppo dei "refrattari" e con recidiva solo in pazienti che avevano ricevuto precedentemente due o più linee di chemioterapia.

Solo una paziente a 18 mesi dal trapianto ha presentato un quadro di mielodisplasia permanendo ad oggi in remissione completa per linfoma.

Dopo un tempo mediano di osservazione di 60 mesi (2-119), il 64% dei pazienti è vivo e di questi 11 in remissione completa. Nove pazienti sono deceduti, di cui 7 del sottogruppo "refrattari" in 6 casi ricevuti cellule staminali sottoposte a "purgating in vitro". Oltre ai 4 decessi per linfoma sopra riportati, 4 pazienti sono morti per complicazioni infettive con una mediana di 5 mesi (23 giorni-7 mesi) dalla procedura in assenza di progressione di malattia e non tra i trattati con Rituximab, mentre una paziente a più di 4 anni dal trapianto è deceduta per complicazioni polmonari correlate a un quadro di bronchiolite obliterante.

DISCUSSIONE

L'introduzione di nuovi approcci terapeutici, quali gli anticorpi monoclonali, la chemio-immunoterapia o la radioimmunoterapia nel trattamento del FL in grado di prolungare il tempo libero da malattia e anche la sopravvivenza, ha ridotto sicuramente l'entusiasmo nella comunità oncoematologica nei confronti della terapia mieloablativa. Ad oggi comunque la mancanza di un congruo follow-up per le nuove terapie e la mancanza di studi di fase III, fa sì che la chemioterapia ad alte dosi con reinfusione di cellule staminali autologhe permanga un'alternativa terapeutica per il FL, soprattutto in pazienti giovani (<65 anni) e con malattia ricorrente in stadio avanzato. La nostra esperienza monocentrica sembra confermarlo con i vantaggi di una prolungata durata della risposta e di un potenziale impatto sulla sopravvivenza in pazienti pretrattati.³⁸

Nel FL l'interessamento midollare è frequente e difficile da eradicare. Dopo un decennio di dibattiti ad oggi è generalmente accettato che la presenza di cellule patologiche nella raccolta possa essere predittiva di recidiva di malattia.^{39,40} All'interno della nostra casistica solo 3 pazienti presentavano nell'aferesi il riarrangiamento bcl-2/IgH. In 2 casi le cellule non sono state sottoposte a purging e di questi uno è recidivato a poco più di anno dalla procedura trapiantologia, mentre l'altro è vivo in remissione completa a 6 anni dal trapianto. Al fine di ridurre il più possibile la contaminazione da parte di cellule patologiche nella raccolta di cellule staminali autologhe, nel passato sono state impiegate tecniche di purging, soprattutto in vitro, che si sono rilevate efficienti. L'introduzione dell'anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD20 (Rituximab) ha sicuramente cambiato e potenziato la terapia nei FL, visto che il 95% delle cellule B normali e patologiche esprime il CD20 quale proteina di superficie.⁴¹ Pazienti trattati con solo Rituximab hanno mostrato inoltre una risposta molecolare, suggerendo così che l'anticorpo monoclonale svolga anche funzione di "pulizia" delle cellule linfomatose.⁴² Oltre che essere un approccio attivo contro il

linfoma e poco tossico, il Rituximab, usato come purging in vivo prima della chemioterapia di mobilizzazione, può risultare una valida alternativa alle tecniche di purging in vitro, che risultano essere a confronto più laboriose e costose.³⁰ Dal 2003 tutti i pazienti da noi trattati hanno ricevuto esclusivamente l'anticorpo monoclonale come purging e tutti e 9 hanno reinfuso cellule bcl-2/IgH negative. Sulla base della processazione o meno delle cellule alla raccolta, nella nostra analisi in termine di recupero ematologico si è osservato un tempo significativamente più prolungato (14 giorni versus 10 giorni) per la ricostituzione piastrinica in caso di aferesi sottoposte a purging rispetto a quelle non manipolate, mentre per quanto riguarda il recupero leucocitario la differenza è stata minore. Questi tempi però risultano essere congrui con quelli riportati in letteratura.⁴³

Le alte dosi di chemioterapia con la reinfusione di cellule staminali autologhe hanno tra i loro maggiori svantaggi la tossicità a breve e a lungo termine. Nella nostra analisi è risultato che circa il 90% dei pazienti in fase di aplasia ha manifestato febbre e tra questi sono stati riportati 6 casi di batteriemia microbiologicamente documentata e 6 casi di polmonite, che corrisponde a una percentuale del 48% di infezioni. Nel caso specifico di pazienti trattati con solo Rituximab, in cui si induce una marcata B-deplezione, è atteso un rischio infettivo più elevato e neutropenia tardiva, come riportato in letteratura.⁴⁴ In termini di infezioni nella nostra corte di pazienti trattati con Rituximab (7) non sono state descritte differenze sostanziali rispetto agli altri sottogruppi (purging in vitro e non), se non che si è riportato una maggiore incidenza di batteriemie (4 su 6 casi descritti), soprattutto da Gram+. Nell'ambito del nostro studio si sono osservate 4 morti per infezione entro il primo anno dal trapianto, una percentuale certamente elevata visto il numero di pazienti, comprendente però 2 pazienti che avevano ricevuto un quantitativo di CD34+ all'atto della reinfusione $<2.0 \times 10^6$ CD34+/Kg. Da una sottoanalisi inoltre è risultato che questi pazienti sono stati trattati nella fase di "debulking" con dosi

intermedie (0,14mg/Kg) di 2CdA, un analogo purinico con noto effetto immunosoppressivo, e con cadenza trisettimanale. Questa osservazione ha portato negli ultimi 5 anni a un aggiustamento della dose di 2CdA (0,1mg/Kg) sempre per 5 giorni consecutivi, ma ogni 28 giorni e da allora non sono stati descritti ulteriori decessi per infezioni.

Negli anni i miglioramenti nella terapia di supporto hanno significativamente ridotto la percentuale di mortalità a breve termine correlata al trapianto, mentre nel tempo gli effetti a lungo termine come le mielodisplasie o le leucemie acute secondarie sono da 5 a 15 volte aumentate in incidenza.⁴⁵ All'interno della nostra casistica tutti i pazienti inclusi sono dei pretrattati, ma nonostante ciò il regime di sola chemioterapia da noi adottato (+/- Rituximab a seconda del periodo considerato) ha mostrato un basso rischio di leucemie mieloidi acute secondarie o sindromi mielodisplatiche, riportando un solo caso di mielodisplasia con un tempo di osservazione mediano di 6 anni.

A riconferma di ciò che è riportato in letteratura,^{46,47} anche dalla nostra analisi si evince come la chemioterapia mieloablative con reinfusione di progenitori emopoietici periferici possa avere ancora un ruolo nel trattamento del FL, traducendosi in una consistente percentuale di remissioni complete (22/25 pazienti sottoposti a trapianto) che si mantengono nel tempo (44% a 6 anni di osservazione mediana) in pazienti con malattia ricorrente in stadio avanzato soprattutto dopo il fallimento della prima linea di terapia.

Potenzialmente questo prolungato tempo libero da malattia osservato con la nostra esperienza, può tradursi in un vantaggio sulla sopravvivenza a lungo termine, ma ciò richiede una più lunga osservazione per la conferma (>10 anni) come riportato in altri scritti,^{11,47} oltre che un ampliamento della casistica in considerazione dell'incidenza del FL.

In conclusione il nostro regime costituito da una fase di induzione seguito da una di intensificazione in pazienti pretrattati affetti da FL risulta essere fattibile e con una percentuale di rischio infettivo e

non accettabile, considerando l'alta efficacia in termini di remissioni complete che si potrebbero tradurre in un vantaggio di sopravvivenza valutabile con una maggiore osservazione nel tempo.

Figura 1

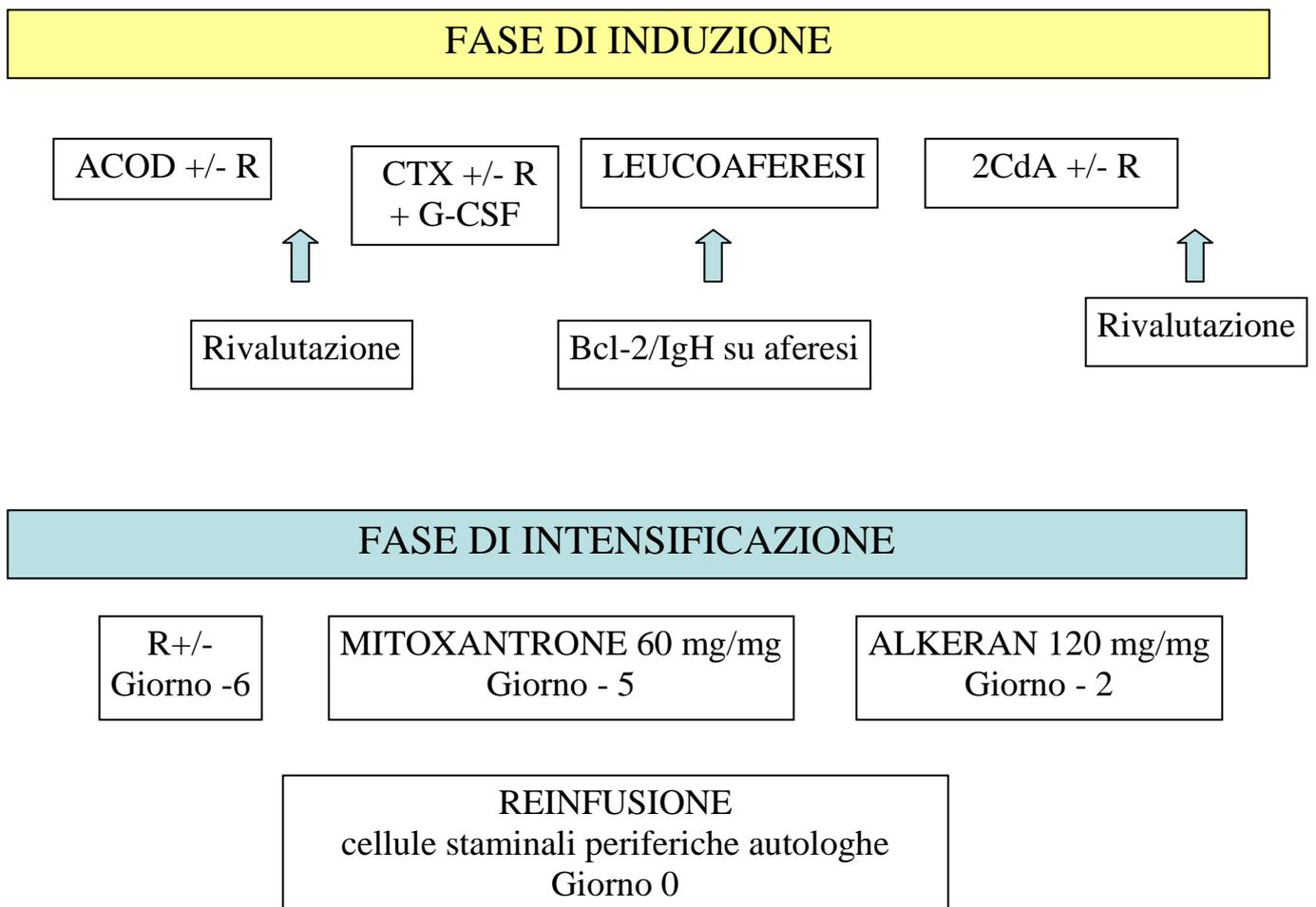


Tabella 1 – Caratteristiche dei pazienti alla diagnosi –

N° pazienti	28	%	Refrattari 18	Recidivati 10
Sesso M	16	57	12	4
F	12		6	6
Età mediana (range)	49 (25-62)		46 (25-62)	51 (30-59)
Grado 1	2			
2	10			
3	1			
ND	15	53		
Stadio II	10		7	3
III	6	21	3	3
IV	12	43	8	4
Sintomi A	20	71	13	7
B	8		5	3
Bulky SI'	10	36	7	3
NO	13		9	4
ND	5		2	3
Extranodale	6	21		
BOM pos	8			
neg	18	64		
ND	2			
FLIPI 0	5			
1-2	11			
>2	1			
NC	11	39		
Linee di CT precedenti				
1	19	68	13	6
2	5		3	2
>2	4		2	2

ND: non disponibile NC: non calcolabile

CT: chemioterapia

Tabella 2 – Recupero ematologico post-trapianto –

		Purging	In vitro	In vivo	No purging
N° pazienti	25	17	10	7	8
Durata neutropenia G4* (giorni)	11 (7-20)	12 (7-20)	12	12	10 (8-15)
Recupero piastrinico* (giorni)	14 (10-96)	14 (10-96)	14	15	11 (11-30)
Supporto piastrinico NO	/				
SI'	25 (100%)				
N° medio di pool per paziente trafuso	2,4 (1-8)	2,4	2,2	2,8	2,3
Anemia** G1	1				1
G2	6	5	2	3	1
G3	18 (72%)	12	8	4	6
Supporto trasfusionale NO	4	2	2		2
SI'	21 (84%)	15	8	7	6
N° medio di unità per paziente trasfuso	3,5 (2-8)	3,4 (2-8)	4,2	3,4	3 (2-6)
Giorni ospedalizzazione*	21 (16-38)	22 (17-32)	21,5	23	20 (16-38)

* Mediana

** Grado massimo osservato nel corso del ricovero per procedura trapiantologia

Tabella 3 - Risposta post-trapianto –

N° pazienti	25	%	Refrattari 16	Recidivati 9	Purging 17	No Purging 8
RC	22	88	15	7	16	6
RP	2		1	1	1	1
NA	1*			1		1
Recidivati	9	36	6	3	7	2
Tempo mediano alla recidiva (mesi)	14 (8-97)		12,5	20	14	16

* deceduta entro 23 gg dalla reinfusione per complicazione infettiva

BIBLIOGRAFIA

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon; IARC Press 2001.
2. Groves FD, Linet MS, Travis LB, et al. Cancer surveillance series : non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United states from 1978 through 1995. J Clin Oncol 2000; 92: 1240-57.
3. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms : a proposal from the International Lymphoma study group. Blood 1994; 84: 1361-92.
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al . World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues : report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. J Clin Oncol 1999; 17: 3835-49.
5. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, et al. Cytomorfologic, immunohistochemical and cytogenetic profiles of follicular lymphoma : 2 types of follicular lymphoma grade 3. Blood 2002; 99: 3806-12.
6. Yuniss JJ, Frizzera G, Oken MM, et al. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. N Engl J Med 1987; 316: 79-84.

7. Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, et al. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood* 1994; 84: 1043-9.
8. Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, et al. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14 ;18). *Gene Chromosomes Cancer* 2001; 30: 375-82.
9. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004 ; 104 : 1258-65.
10. Bastion Y, Sebban C, Berger F, et al. Incidence, predictive factors and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1587-94.
11. Montoto S, Lopez-Guillermo A, Ferrer A, et al. Survival after progression in patients with follicular lymphoma: analysis of prognostic factors. *Ann Oncol* 2002; 13: 523-30.
12. Horning S and Rosenberg S. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1984; 311: 1471-508.
13. Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE, et al. Follicular lymphoma : prognostic factors for response and survival . *J Clin Oncol* 1986; 4: 1470-80.
14. Mac Manus MP, Hoope RT. Is radiotherapy curative for stage I and II low-grade follicular lymphoma? Results of a long-term follow up study of patients treated at Stanford University. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1282-90.

15. Reddy S, Saxema V, Pellettiere E. stage I and II non-Hodgkin's lymphomas: long-term results of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16: 687-92.
16. Lister TA, Cullen MH, Beard ME, et al. Comparison of combined and single-agent chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma of favorable histological type. *BMJ* 1978; 1: 533-37.
17. Dana BW, Dahlberg S, Nathwani BN, et al. Long-term follow-up of patients with low-grade malignant lymphomas treated with doxo-rubicin-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *J Clin Oncol* 1993; 11: 644-51.
18. Philip T, Armitage JO, Spitzer G, et al . High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1987; 316: 1493-98.
19. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl Med* 1995; 333: 1540-45.
20. Bierman PJ, Vose JM, Anderson JR, et al. High-dose therapy with autologous hematopoietic rescue for follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 445-50.
21. Freedman AS, Neuberg D, Mauch P, et al. Long-term follow-up of autologous bone marrow transplantation in patients with relapsed follicular lymphoma. *Blood* 1999; 94. 3325-33.

22. Apostolidis J, Gupta RK, Grenzeliias D, et al. High-dose therapy with autologous bone marrow support as consolidation of remission in follicular lymphoma: long-term clinical and molecular follow-up. *J Clin Oncol* 2000; 18: 527-36.
23. Schouten HC, Qian W, Kvaloy S, et al. High-dose therapy improves progression-free survival and survival in relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma: results from the randomized European CUP trial. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3918-27.
24. Sharp JG, Kessinger A, Mann S, et al. Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma based on the presence of tumour in the marrow or infused hematopoietic harvest. *J Clin Oncol* 1996; 14: 214-19.
25. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, et al. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 11: 231-8.
26. Nadler LM, Takvorian T, Botnick L, et al. Anti-B1 monoclonal antibody and complement treatment in autologous bone-marrow transplantation for relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 1984; 2: 427-31.
27. Fouillard L, Laporte JP, Labopin M, et al. Autologous stem-cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma : the role of graft purging and radiotherapy posttransplantation – results of a retrospective analysis on 120 patients autografted in a single institution. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2803-16.

28. Lazzarino M, Arcaini L, Bernasconi P, et al. A sequence of immuno-chemotherapy with Rituximab, mobilization of in vivo purged stem cells, high-dose chemotherapy and autotransplant is an effective and non-toxic treatment for advanced follicular and mantle lymphoma. *Br J Haematol* 2002; 116: 229-35.
29. Galimberti S, Guerrini F, Morabito F, et al. Quantitative molecular evaluation in autotransplant programs for follicular lymphoma: efficacy of in vivo purging by Rituximab. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 57-63.
30. BelhadJ K, Delfau-Larue MH, Elgnaoui T, et al. Efficiency of in vivo purging with rituximab prior to autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a single institution study. *Ann Oncol* 2004; 15: 504-10.
31. Fisher R, LeBlanc M, Press OW, et al. New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8447-52.
32. Liu Q, Fayad I, Cabanillas F, et al. Improvement of overall and failure-free survival in stage IV follicular lymphoma: 25 years of treatment experience at the University of Texas M.D. Anderson cancer Center. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1582-89.
33. Martinelli G, Ferrucci PF, Mingrone W, et al. ACOD, a modified CHOP regimen for elderly patients with aggressive non-Hodgking's lymphoma. *Leuk lymphoma* 2003; 44:1265.
34. Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS, et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2translocation is associated with increased risk for relapse

after autologous transplantation for B cell lymphoma. *Blood* 1993; 81: 3449-57.

35. National Cancer Institute Common Toxicity Criteria version 2.0 (CTC), 1999 <http://Ctep.cancer.gov/reporting/CTC3.html>
36. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al Report of an International Workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1999;17: 1244-53.
37. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-81.
38. Hiddemann W, Buske C, Dreyling M, et al. Current management of follicular lymphomas. *Br J Haematol* 2007;136:191-202.
39. Gribben J,G, Saporito L, Barber M, et al. Bone marrows of no-Hodgkin's lymphoma patients with a bcl-2 translocation can be purged of polymerase chain reaction-detectable lymphoma cells using monoclonal antibodies and immunomagnetic bead depletion. *Blood* 1992; 80: 1083-89.
40. Ladetto M, Corradini P, Vallet S, et al. High rate of clinical and molecular remissions in follicular lymphoma patients receiving high-dose sequential chemotherapy ad autografting at diagnosis: a multicenter, prospective study by the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Blood* 2002; 100: 1559-65.
41. McLaughlin P, Grillo-lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2825-33.

42. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White Ca, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 2188-95.
43. Voso MT, Hohaus S, Moos M, et al. Autografting with CD34+ peripheral blood stem cells: retained engraftment capability and reduced tumour cell content. *Br J Haematol* 1999, 104: 382-91.
44. Lemieux B, Tartan S, Tralle C, et al. Rituximab-related late-onset neutropenia after autologous stem cell transplantation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 921-3.
45. Metayer C, Curtis RE, Vose J, et al. Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after autotransplantation for lymphoma: a multicenter case-control study. *Blood* 2003; 101: 2015-23.
46. Vignot S, Mounier N, Larghero J, et al. High-dose therapy and autologous stem-cell transplantation can improve event-free survival for indolent lymphoma: a study using patients as their own controls. *Cancer* 2007;109:60-7.
47. Rohatiner AZ, Nadler L, Davies AJ, et al. Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma at the time of second or subsequent remission: long-term follow-up. *J Clin Oncol* 2007 20; 25: 2554-9.