

TRAPIANTO DI CELLULE EMOPOIETICHE

Informazioni per il proprietario
sul trapianto di cellule emopoietiche

Bone Marrow Transplant- An Owners' Guide

Version 2.5, March, 2010



Sommario

Sezione I. Informazioni di Base

Linfoma: Cause e Terapie Attuali

Trapianto di Cellule staminali: Teoria, Storia e Applicazioni

Sezione II. Procedura per il Trapianto di Midollo Osseo

Stadiazione e Consolidamento

Giorno dell'Aferesi

Giorno della Radioterapia

Recupero Post-Trattamento

Follow-up del Paziente Dimesso

Sezione III. Appendice e Riferimenti Bibliografici

Domande frequenti

Riferimenti Bibliografici

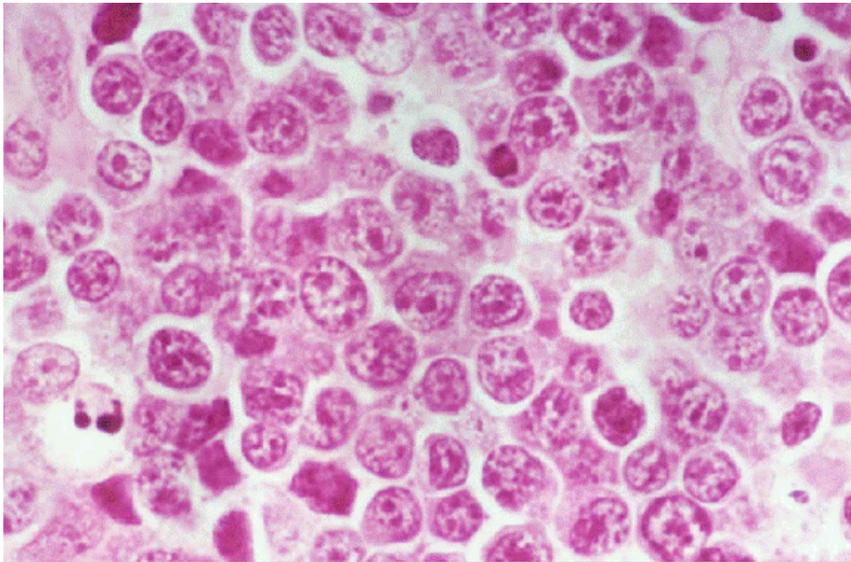
Informazioni per i Veterinari e per le Strutture Affiliate

Sezione I.

Il Linfoma

Il linfoma è un tumore che origina da una tipologia di globuli bianchi chiamati linfociti I quali, normalmente, sorvegliano l'organismo affrontando agenti patogeni distruggendoli. Quando un linfocita normale incontra il proprio bersaglio si divide e si moltiplica producendo milioni di cellule figlie deputate a sconfiggere l'infezione. Per questa loro prerogativa i linfociti vivono sotto stretto controllo e regolazione continua da parte dell'organismo donde evitare una proliferazione incontrollata. Occasionalmente si sviluppa una cellula mutante che ignora questa regolazione e sfocia in una proliferazione incontrollata. Questa cellula e le sue figlie aumentano vertiginosamente di numero determinando, nel nostro cane, un aumento volumetrico dei linfonodi, organi deputati alla raccolta e reclutamento dei linfociti. Tali cellule possono accumularsi anche nel tratto gastrointestinale.

Questa cellula mutante e la sua progenie ha dato origine ad un *linfoma*. This mutant and its progeny have now become a *Lymphoma*. Nonostante la maggior parte dei linfomi canini sia di tipo B (producono anticorpi), questo tumore può originare anche dai linfociti T (combattono contro virus e cellule neoplastiche) e sono abbreviati LcB e LcT rispettivamente. Il linfoma B del cane è paragonabile al linfoma umano *Non-Hodgkin* (maligno) ed hanno la stessa progressione ed esito.



Cellule di LcT, ingrandimento a 500x (NIH)

La terapia standard per i cani affetti da linfoma è costituita da una combinazione di farmaci chemioterapici, di solito chiamata CHOP per indicare, con ogni lettera

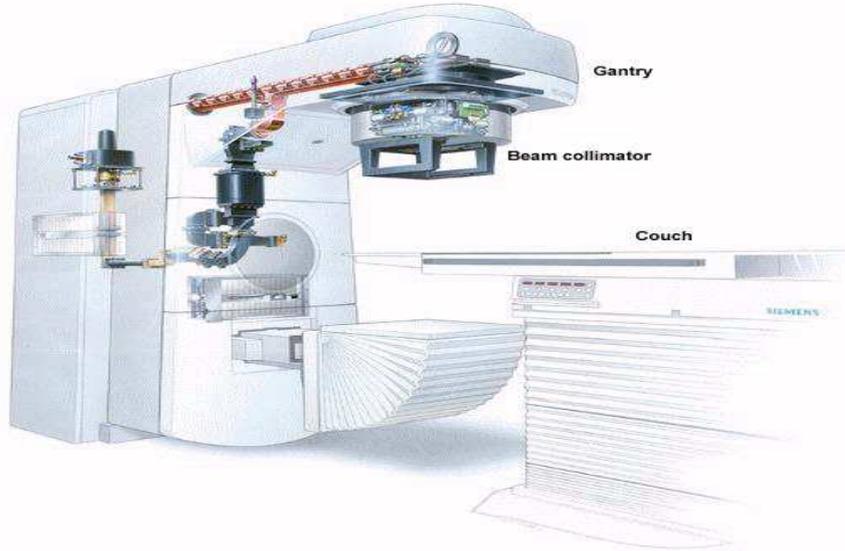
maiuscola, le iniziali del farmaco utilizzato. Attaccare il linfoma con diversi farmaci contemporaneamente ha il fine di evitare la formazione di chemio resistenza. Sfortunatamente spesso il linfoma contrasta questo approccio sviluppando resistenza multipla ai farmaci la quale istruisce la cellula neoplastica sul come bloccare l'ingresso del chemioterapico al proprio interno. Un'altra strategia usata dalle cellule cancerose è quella di nascondersi in posti non raggiungibili dai farmaci; in qualità di ex cellule B o T, il linfoma ha accesso a qualsiasi distretto dell'organismo che altri tipi cellulari non possono avere.

Appena iniziata la chemioterapia, il paziente entra in uno stato libero da malattia chiamato *remissione clinica* (RC) in cui i linfonodi ritornano di dimensioni normali oppure la massa neoplastica scompare e non vi è nessuna evidenza di malattia clinica. Questo remissione purtroppo è apparente poiché in quasi tutti i casi, nascoste nel midollo osseo o nel sangue periferico, sopravvivono cellule linfomatose capaci di farmaco resistenza; non appena queste iniziano a proliferare la remissione cessa e la prognosi diventa fatale nella maggior parte dei casi in un tempo stimato compreso tra i 6 mesi e i due anni. Nell'uomo l'andamento della malattia è simile con tempi di sopravvivenza leggermente più lunghi compresi tra i tre e i cinque anni.

Tuttavia in medicina umana esiste una forma di terapia ben definita che prende il nome di *Trapianto di Midollo Osseo* (TMO), la quale offre la possibilità di curare definitivamente il linfoma. Lo scopo di questo protocollo è quello di trasferire questo protocollo in campo medico veterinario.

Trapianto di Midollo Osseo (TMO)

Il Trapianto di Midollo Osseo è stato progettato per eludere la resistenza multifarmaco creando una nuova linea di attacco contro la quale il linfoma non abbia nessun mezzo di resistenza. Ciò si esplica con la radioterapia attraverso raggi gamma ad alta intensità distribuiti tramite un *acceleratore lineare* (linac). Queste radiazioni sono capaci di uccidere le ultime cellule linfomatose sopravvissute ovunque esse si trovino nell'organismo. Poiché il fascio di radiazioni ingloba tutto il corpo del paziente per evitare che nessuna cellula neoplastica possa sfuggire, questa forma di trattamento viene chiamata Irradiazione Totale del Corpo.



Acceleratore Lineare (Siemens Corp)

L'intensità di radiazioni necessarie per uccidere tutte le cellule neoplastiche, tuttavia, porterà anche all'ablazione delle *cellule staminali* del midollo osseo che sono un gruppo di speciali cellule deputate a produrre precursori della serie rossa (trasporto di ossigeno), della serie bianca (difesa) e piastrinica (coagulazione). Perciò, per preservarle, le cellule staminali vengono isolate e raccolte dal paziente prima dell'irradiazione e conservate; dopo la radioterapia vengono rimesse nell'organismo così da ripopolare il comparto midollare e ripristinare la normale omeostasi del sangue.

Questa metodologia suddivisa in tre fasi: preservare le cellule staminali, irradiare il paziente per uccidere le cellule tumorali e reinserire le staminali dopo irradiazione, è disponibile in medicina umana da tanti anni. Fu investigata come possibilità per salvare la vita alle vittime della bomba atomica e dal 1957, la metodologia sopra descritta fu iniziata e portata avanti ad Harvard dal Dr E. Donnall Thomas per il trattamento delle leucemie e successivamente alla Columbia University. Durante tutti gli anni '60 e '70 sono state messe a punto le metodologie corrette per quanto riguarda dose di radiazioni, isolamento e conservazione delle staminali e reinserimento di queste nell'organismo fino a diventare oggi un metodo standardizzato per il trattamento dei linfomi e delle leucemie. Nel 1990 il Dr Thomas è stato insignito del Premio Nobel per la Medicina per il suo contributo alla scoperta di questo metodo.

Negli anni '70 si notò la similitudine esistente tra linfoma canino e umano e si iniziarono ad usare protocolli chemioterapici estrapolati dalla medicina umana per il trattamento dei linfomi nel cane. Paradossalmente, nonostante per mettere a punto la metodica di Trapianto di Midollo Osseo furono usati modelli di linfoma canino, questa forma di terapia non è mai stata disponibile in medicina veterinaria. Il motivo principale risiede

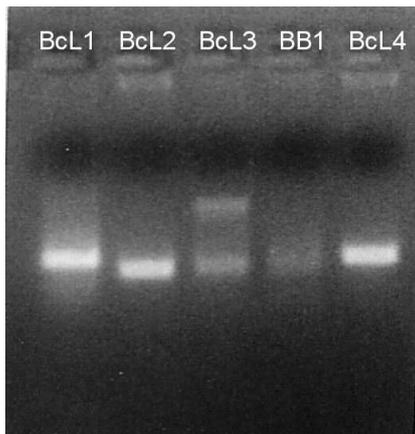
nella disponibilità di Centri d' Eccellenza come il Veterinary Specialty Center dell' Hudson Valley (www.vschr.com) in grado di eseguire correttamente la procedura e livelli di avanguardia nella tecnologia del DNA.

Sezione II.

Il trapianto di midollo osseo è costituito da 5 fasi cliniche ognuna delle quali verrà descritta in dettaglio di seguito. Le prime due fasi rappresentano dei *check-points*, solo superando perfettamente i quali il cane può passare alla radioterapia e alla guarigione.

Stadiazione e Terapia di Consolidamento

Il termine “stadiazione” si riferisce alla valutazione dell'estensione della malattia tumorale nell'organismo ed è finalizzata a stabilire per mezzo di test del DNA lo stato di remissione della malattia. La chemioterapia prima del trapianto può essere effettuata presso il nostro centro oppure presso il proprio veterinario di fiducia o, ancora, presso altri specialisti oncologi o medici interni. Ci deve essere grande comunicazione tra il nostro team ed il veterinario referente affinché tutto vada a buon fine. Finita la chemioterapia con protocollo CHOP e prima di iniziare il consolidamento, il cane dovrà essere sottoposto, qui al nostro centro, ad alcuni test per rilevare malattia neoplastica residua. Se non viene rilevato nulla si è raggiunta la *remissione clinica* (RC). Se i test del DNA risultano anch'essi negativi, allora si è raggiunta anche la *remissione molecolare* (RM) ed il paziente può procedere alla fase di consolidamento.



Rilevamento tramite PCR di DNA di linfociti B neoplastici nel sangue di 5 pazienti: BcL3 è in RC ma non in RM, BB1 è in RC e RM, e i rimanenti non hanno raggiunto nessuna forma di remissione (Engene Corp).

La terapia di consolidamento utilizza lo stesso metodo usato in medicina umana; lo scopo è quello di ridurre ulteriormente il numero di qualsiasi cellula cancerosa nascosta nell'organismo o nel midollo che possa contaminare la preparazione delle cellule staminali il giorno dell'afèresi. Viene usata ciclofosfamida ad alte dosi; il paziente trascorre la notte in clinica per essere monitorizzato e viene poi dimesso la mattina successiva. La settimana successiva viene inviato un campione di sangue ad un laboratorio specializzato in grado, tramite PCR, di rilevare fino ad una sola cellula neoplastica presente nel campione. Se risulta tutto negativo allora il paziente ha raggiunto una remissione molecolare (RM) e può passare alla fase successiva, l'afèresi. La remissione molecolare è la condizione migliore per procedere alla fase di trapianto di cellule staminali.

In previsione della radioterapia, il paziente inizia anche una terapia antibiotica per bocca al fine di ridurre il numero di batteri nel tratto gastroenterico. Ciò minimizzerà il rischio di una traslocazione batterica dall'intestino al circolo sanguigno dopo la radioterapia con conseguente rischio di sepsi. Gli antibiotici vengono mantenuti da questo momento fino alle dimissioni dalla clinica. Se il paziente presenta evidenze di infezione in qualsiasi distretto anatomico (tratto urinario, cavo orale, cute), queste devono essere trattate e curate prima di passare alla fase successiva del protocollo.

Giorno dell'afèresi

Adesso il cane è pronto per la raccolta di cellule staminali attraverso la macchina da afèresi. La procedura si esegue in anestesia o sedazione profonda. Si tratta di una centrifuga speciale che separa le cellule sulla base delle dimensioni (le cellule staminali sono molto più grandi dei globuli rossi). Queste vengono poi purificate e reinserite nel paziente attraverso un processo ciclico. Al fine di arricchire il sangue di cellule staminali, il paziente deve arrivare in clinica la sera prima dell'afèresi e la mattina presto viene somministrato un farmaco che stimola il rilascio di cellule staminali dal midollo osseo al sangue periferico..

Dopo circa 6 ore il sangue è pronto per la raccolta ed il cane viene portato nella zona dedicata all'afèresi. Il cane viene sedato/anestetizzato come precauzione affinché rimanga fermo ma la procedura di per se non è dolorosa.

L'afèresi consiste nel posizionare il paziente in un comodo lettino, attaccare la macchina per l'afèresi ad un apposito catetere inserito la mattina presto e raccogliere le cellule staminali dal paziente. La procedura è terminata in circa 3-4 ore. Parte del campione viene inviato tramite FedEx per la valutazione di adeguatezza; l'altra parte del campione viene spedita ad un laboratorio per l'analisi del DNA per verificare che non vi sia contaminazione di cellule neoplastiche. Il paziente rimane in clinica ricoverato tutta la notte per iniziare subito un nuovo ciclo di afèresi (anche se non sempre è necessario)

oppure di radioterapia. Se il campione di staminali è adeguato ed esente da cellule tumorali, il paziente può accedere alla radioterapia.



Cobe Spectra Apheresis Machine (Caridian Corp)

Giorno Della Radioterapia

Dopo 1-4 giorni dall'afèresi, il paziente va incontro a due cicli da 70 minuti di radioterapia intervallati da 3 ore di riposo. Durante la radioterapia, il paziente viene sedato/anestetizzato per garantire il posizionamento corretto e la massima immobilità senza, tuttavia, arrecargli il minimo disagio. Subito dopo la dose finale di radiazioni, le cellule staminali precedentemente raccolte, vengono reimpiantate nel paziente per via endovenosa dalla quale poi raggiungono il midollo osseo, si stanziano ed iniziano a crescere.

Ripresa post-trattamento

Questa fase dura un tempo critico di circa 2 settimane durante il quale le staminali rientrano nell'organismo, si dividono e sostituiscono le cellule del sangue. È sempre in questa fase che vecchie cellule ematiche e cellule neoplastiche moriranno. I leucociti invecchiati moriranno poco prima che le staminali siano in grado di sostituirli; questo determinerà un *nadir* leucopenico nel sangue. In questa fase il sistema immunitario del paziente è debole ed è incapace di combattere le infezioni; si manifesta di solito dopo 7-10 giorni dalla radioterapia. Superata questa fase le cellule staminali avranno prodotto leucociti a sufficienza per una rapida ripresa del sistema immunitario.

Dalla prima notte successiva alla radioterapia il paziente viene portato in terapia intensiva in modo da ricevere fluidi in vena ma non potrà alimentarsi o assumere acqua per diversi

giorni. E' difficile che il paziente desideri cibo in questa fase poiché il tratto gastroenterico viene in un certo modo irritato i primi giorni successivi alla radioterapia. Il paziente verrà monitorizzato diverse volte al giorno attraverso l'esame fisico e l'osservazione dei segni vitali; verranno eseguiti esami ematologici quotidiani per valutare il mantenimento delle funzionalità d'organo e per rilevare il *nadir* leucopenico.

Il paziente dovrà rimanere ricoverato per 15-20 giorni (o almeno finché la conta leucocitaria non arriva a livelli accettabili di sicurezza). Non appena i leucociti cominciano ad abbassarsi, inizia un attento monitoraggio ed il paziente viene ricoverato in un'area separata dagli altri cani. In questa fase non saranno permesse visite giornaliere dei proprietari e verrà mantenuta una sterilità come quella presente nelle sale operatorie. Nella fase di isolamento il paziente è seguito 24 ore su 24 da personale medico veterinario e dai tecnici veterinari più qualificati utilizzando le più accurate tecniche di sterilità al fine di massimizzare il benessere del paziente così come la sua sicurezza. Se il paziente sviluppa febbre o segni di infezione, viene subito iniziata una terapia antibiotica aggressiva e se sono presenti sanguinamenti dovuti a piastrinopenie, verranno effettuate delle trasfusioni per evitare l'insorgere di stati anemici. Qualsiasi disordine gastroenterico verrà accuratamente gestito con farmaci, fluidi e cure infermieristiche.

Una volta che i globuli bianchi del paziente sono ritornati ad un livello di sicurezza, si aspetterà qualche altro giorno per far rientrare anche la conta piastrinica: visto che si tratta delle cellule che regolano la coagulazione, il paziente deve rimanere tranquillo e non deve agitarsi in questa fase. Per aiutare il cane in questa fase può essere utile anche somministrare una trasfusione di piastrine. Successivamente il paziente può lasciare la fase di isolamento e può rientrare in terapia intensiva dove verrà monitorizzato quotidianamente. Una volta che tutti gli esami del sangue saranno normali, si potrà allora dimettere il paziente dalla clinica; di solito questo avviene 14 giorni dopo la radioterapia.

Follow-up:

Lasciato l'ospedale, sarà necessario monitorizzare l'andamento ematologico del paziente con esami del sangue periodici nelle settimane successive. La remissione clinica verrà monitorizzata mensilmente attraverso un esame fisico ed una PCR (RM) ed una volta ogni 3-4 mesi verrà effettuato uno studio radiografico del torace ed un'ecografia addominale. Se tutto questo trattamento è efficace, non sarà più necessario adottare chemioterapie o altri regimi terapeutici anti-tumorali.

Summer 2006



VETERINARY

executive report

Dog stem cell transplant puts WSU on world stage

CNN: procedure video among its most requested

The image of a sleeping beagle captured the attention of the nation, as Bailey rested quietly after undergoing a rigorous stem cell transplant procedure. The six year old Beagle was brought to WSU's College of Veterinary Medicine for full body radiation, vital in helping treat her lymphoma.

"It's exciting, but somewhat nerve wracking," said Dr. Pat Gavin '71, a veterinary radiation oncologist with WSU. "You take those extra steps to ensure this first case goes smoothly, but it's exciting in that this really is groundbreaking in the treatment of cancer in pets."

Bailey was brought here by Dr. Ed Sullivan, a veterinarian from Bellingham who completed the very first stem cell procedure worldwide for a client animal. "This was no easy task," said Dr. Sullivan, adding, "the real challenge came in finding one of Bailey's siblings who was a perfect match for a stem cell treatment."

Much of the work in using radiation treatment for animals was pioneered at WSU by Dr. Gavin. For him, it's just the latest chapter in advancing care. "With lymphoma right now there is no cure, in both animals and humans, unless you get pretty aggressive, so for animals this is a whole new area with plenty of promise."

At last check, Bailey's recovery continues. The story was picked up by television stations in Seattle, and ultimately CNN. By mid-afternoon CNN's Web site showed the story to be among its more requested videos in the country.



Bailey rests comfortably after procedure

Primo Report sul Trapianto di Midollo Osseo (University of Washington Newsletter, 2006)

Sezione III.

Domande più richieste (FAQ)

>Che possibilità ha il mio cane di ottenere una cura definitiva dopo irradiazione totale e trapianto di midollo osseo?

In medicina umana l'aspettativa di cura per linfomi e leucemie, dopo irradiazione totale e trapianto di cellule staminali va dal 40% al 60%. Al momento sono stati trattati 23 pazienti canini con questo protocollo in due centri diversi. I risultati ottenuti sono sufficienti per poter affermare che la procedura è sicura e che il tasso di guarigione è sovrapponibile se non superiore quello riportato in medicina umana.

>Se il mio cane ottiene una remissione complete (RC) ma non una remissione molecolare (RM), potrà accedere al trapianto di cellule staminali?

In medicina umana la procedura viene portata a termine anche se il sangue o il midollo del paziente rimane contaminato da cellule neoplastiche. Come si può immaginare, più radicale è la remissione, più basso è il numero di cellule neoplastiche nel sangue,

migliore è la prognosi. Quindi un paziente che ottiene una RC ma non una RM può tranquillamente procedere al trapianto di midollo osseo ma è possibile che abbia ridotte possibilità di ottenere una guarigione definitiva.

>Ci sono dei fattori che impediscono l'accesso del mio cane a questo tipo di trattamento?

Non sono candidati adatti al trapianto di midollo osseo pazienti inferiori ai 15 kg (nei quali è difficile eseguire l'aferesi), pazienti con insufficienza d'organo (cuore, reni, fegato), pazienti con infezioni fuori controllo o a rischio di contrarre infezioni secondarie ad altre patologie (diabete mellito, ipercorticosurrenalismo). Preclude il proseguimento del protocollo qualsiasi fallimento alle suddette fasi come ad esempio: il raggiungimento di una RC (CHOP), RM (consolidamento) oppure l'isolamento di una coltura di cellule staminali esenti da elementi neoplastici.

>Quale è il tasso di mortalità per questa procedura?

Ad oggi, solo un caso (su 23 trattati) è deceduto in seguito al trapianto di midollo a causa di una infezione. Lo stato clinico di questo paziente era stato valutato ad alto rischio già prima di entrare nel protocollo. Nei cani, così come nelle persone, si sono fatti grandi progressi per ridurre complicazioni di questo tipo grazie al continuo monitoraggio nelle 24 ore e all'immediato utilizzo di potenti antibiotici

>Quali sono le possibili complicazioni associate al trapianto di midollo osseo?

Le complicazioni più comuni sono diarrea, nausea (gestite in maniera sintomatica con fluidi ed imodium) che si manifestano nei giorni successivi al trattamento. Effetti collaterali meno comuni sono anemia secondaria al sanguinamento (trattata con trasfusioni), infezioni batteriche (trattate con aggressiva terapia antibiotica) e nausea prolungata (trattata con farmaci anti-nausea).

Raramente sopravviene cistite emorragica secondaria al trattamento con alte dosi di ciclofosfamide, formazioni di tromboemboli a livello polmonare o cerebrale (trattati con eparina) ed infezioni insolite ad eziologia fungina o parassitaria (trattate con antidoti specifici).

Infine è da considerare la possibilità che le cellule staminali, reinserite nel compartimento midollare del paziente dopo l'irradiazione totale, non riescano a crescere. Questa evenienza è più frequente in medicina umana quando vengono utilizzate cellule staminali di donatori (trapianti *allogenici*) ma questo non è la metodica da noi utilizzata che invece prende il nome di trapianto *autologo*. Per i nostri pazienti viene usato anche un piano di riserva in cui vengono congelate e stoccate cellule staminali in eccesso questo perché durante l'aferesi si ottiene un numero di staminali eccessivo rispetto alle reali necessità

terapeutiche. Queste extra cellule verranno poi scongelate e somministrate al paziente nel caso sfortunato in cui l'attecchimento del trapianto è lento o fallimentare.

Riferimenti Bibliografici

Riferimenti Recenti

Lupu, M., Sullivan, E., et al, *JAVMA*, vol. 228, #5, 728-732, 2006; "Use of multi-generational-family dog leukocyte antigen typing to select a hematopoietic transplant donor for a dog with T-cell lymphoma".

Lupu, M., and Storb, R, *Vet Comp Oncol.*, vol. 5, # 1, 14-30, 2007; "Five decades of progress in hematopoietic cell transplantation based on the preclinical canine model"

Burroughs, L., and Storb, R., *Blood*, vol. 106, #12, 4002-4008, 2005; "Durable engraftment of AMD3100-mobilized autologous and allogeneic peripheral blood mononuclear cells in a canine transplantation model".



www.vschr.com

**Centro Specialistico Veterinario
dell'Hudson Valley
Staff medico per il Trapianto di Midollo Osseo**

**Dr. J.A. Impellizeri DVM, DACVIM (Oncology)-Director
Dr. Keith Sobel, DVM, DACVIM (Internal Medicine), Residency Trained-
Emergency/Critical Care**

**Debbie Glynn B.S. LVT
Jodi Schumacher LVT, VTS (ECC, SAIM)
Nicole Van Sant LVT, VTS (ECC)
KJ DeAngelis B.S. LVT-IT**

**Dr. John Farrelly DVM, DACVIM (Oncology), DACVR (Radiation Oncology)
Rosemary Calderon, LVT, VTS (Oncology)**

**Veterinary Specialty Center of the Hudson Valley
New York/New Jersey/Connecticut
Dr. Joe Impellizeri, DVM, DACVIM
845-632-3200
www.vschr.com**

Per informazioni: info@vschr.com

Referente per l'Italia: Dr Fabio Valentini DVM, MS: f.valentini@oncovet.it