

TITOLO: Potenziale proliferativi dei progenitori emopoietici e mesenchimali nelle sindromi mielodisplastiche pediatriche.

Le Sindromi Mielodisplastiche (SMD) sono malattie clonali della cellula staminale ematopoietica caratterizzate da un'emopoiesi inefficace e displastica, da citopenia periferica (anemia, granulocitopenia, piastrinopenia) e rischio di evoluzione più o meno rapida in leucemia acuta mieloide (LAM) (*Mariela B. et al, 2006*). Nei bambini e negli adolescenti le SMD rappresentano solo il 5% delle patologie ematopoietiche maligne ed è talvolta difficile la diagnosi differenziale con malattie midollari non clonali, quali l'anemia aplastica, le displasie midollari insorte in corso di malattie infettive croniche o malattie metaboliche, o conseguenti a trattamenti farmacologici (*Hasle H. et al, 2003*). La presentazione clinica delle SMD pediatriche è simile a quella degli adulti anche se nei bambini si osserva tipicamente una pancitopenia, piuttosto che una citopenia isolata (*Kardos G. et al, 2003*). Inoltre, in circa un terzo dei pazienti pediatrici la SMD è associata a malattie congenite o genetiche come la sindrome di Down, anemia di Fanconi, sindrome di Scwachman-Diamond, neutropenie congenite gravi, anemia di Blackfan-Diamond e neurofibromatosi. Anche la presenza di anomalie cromosomiche è diversa nelle popolazioni adulte e pediatriche, infatti, l'anomalia citogenetica più comune nei bambini è la monosomia del cromosoma 7, mentre negli adulti è la delezione del braccio lungo del cromosoma 5 (*Polychronopoulou S. et al, 2004; Niemeyer C.M. et al, 2008*). La quasi totalità degli studi riguarda pazienti adulti nei quali le caratteristiche biologiche, la

patogenesi e, conseguentemente, l'approccio terapeutico sono differenti rispetto alle SMD in età pediatrica.

E' noto che l'ematopoiesi è un complesso processo regolato dal microambiente midollare che consente la sopravvivenza, proliferazione e differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche (CSE). In molte patologie ematopoietiche è stato dimostrato che il microambiente può influire sull'evoluzione della malattia.

Fin dai primi anni 80, il potenziale proliferativo dei progenitori granulopoietici nelle SMD è stato oggetto di numerosi studi finalizzati ad identificare fattori prognostici che consentissero una miglior classificazione di tale eterogenea patologia per fasce di rischio ed alcuni Autori hanno correlato il pattern di crescita in vitro con l'andamento clinico (*Verma et al 1979, Greenberg 1986, Bianchi de Di Risio 1990, Sawada et al 1996*). Una crescita in vitro caratterizzata da un aumento dei clusters, associato o meno con un incremento del numero di colonie è stata definita "crescita di tipo leucemico" in quanto significativamente correlata con una prognosi sfavorevole mentre una crescita normale, l'assenza di crescita o una ridotta plating efficiency venivano considerati patterns non leucemici predittivi di una condizione clinica indolente che pertanto non richiedeva terapie aggressive. Il nostro studio, riferito esclusivamente a pazienti pediatrici, ha evidenziato una riduzione della crescita

dei progenitori ematopoietici nel 50% dei pazienti. Nella maggior parte dei casi la ridotta crescita coinvolgeva sia la linea granulopoietica che eritroide, soltanto in quattro casi è stato osservato un deficit isolato di un singolo lineage. In un unico studio, riportato in letteratura e riferito a pazienti pediatrici, è stata osservata una riduzione significativa della crescita dei progenitori ematopoietici (CFU-GM, BFU-E e CFU-GEMM) soltanto in pazienti ad alto rischio (AREB e AREBt) mentre valori di crescita normali venivano rilevati in pazienti a basso rischio (AR) (*Polychronopoulou S, 2004*). Tale dato era confrontabile con i risultati riportati da altri Autori in casistiche di pazienti adulti (Coutinho L.H, 1990; Flores-Figueroa E, 1999; Marisavljevic D., 2002). Nel nostro lavoro la netta prevalenza delle citopenie refrattarie sulle AREB non consente un'analisi statistica dei risultati ottenuti nelle due popolazioni. Stratificando però la nostra casistica in base alla severità della citopenia, è stato osservato che i pazienti che presentavano una citopenia su 2 o 3 linee ematopoietiche (17/26) mostravano una significativa riduzione del numero dei progenitori rispetto al numero di progenitori ottenuti dai pazienti con una moderata citopenia periferica (9/26). Pertanto, il nostro studio ha evidenziato una correlazione fra la capacità proliferativa dei progenitori ematopoietici e la severità del quadro clinico anche nella fascia di pazienti con mielodisplasia a basso rischio.

Un altro parametro correlato con forme a più elevata probabilità di evoluzione leucemica è la proporzione fra clusters e colonie. Dati riportati in letteratura e riferiti a casistiche pediatriche hanno evidenziato un pattern di crescita caratterizzato da una marcata riduzione del numero di colonie ed un aumento del rapporto clusters/colonie in pazienti con AREB e AREBt (*Polychronopoulou S, 2004*). Un alterato rapporto clusters/colonie associato ad una elevata percentuale di cellule CD34+, più frequente nelle AREB ed AREBt e correlato con prognosi sfavorevole, è stato riportato inoltre da Guyotat e collaboratori (*Guyotat D., et al, 1990*) Nella nostra casistica una abnorme proliferazione di clusters rispetto al numero di colonie è stata osservata soltanto in 2 casi, entrambi con citopenia severa, anche se complessivamente in circa la metà dei pazienti si osservava una aumentata proliferazione di clusters in rapporto alle colonie.

Recenti lavori hanno sottolineato una possibile associazione fra SMD e processi autoimmuni (*Hamblin et al, 1996*). Alcuni studi hanno evidenziato nelle SMD un effetto inibente dei linfociti T sulla crescita di colonie granulopoietiche ed eritropoietiche (*Smith MA., et al, 1991; Sugaowa T., et al, 1992; Mollidrem JJ., et al, 1998,*). La mielosoppressione mediata da cellule T, ed indotta da elevati livelli plasmatici di TNF- $\alpha$  e di IFN- $\gamma$ , può contribuire, come nell'aplasia midollare,

all'insorgenza della citopenia nelle SMD (*Barrett et al., 2000*). Poiché è noto che sia il TNF che l'IFN sono citochine ad attività inibente sui progenitori ematopoietici, al fine di valutare dal punto di vista funzionale la presenza di eventuali fattori umorali e la modificazione della capacità proliferativa da essi indotta in vitro, nel nostro studio è stato valutato in 18 pazienti, l'effetto del siero autologo sia su progenitori granulopoietici che eritropoietici. I risultati hanno mostrato in 5 casi un'attività inibente indotta dal siero sui progenitori eritropoietici con una riduzione pari al 40% del numero totale di BFU-E. In due di questi 5 pazienti la SMD era associata ad una patologia autoimmune. Per quanto riguarda i progenitori granulopoietici, in 4/18 pazienti è stata osservata una riduzione del numero di colonie granulopoietiche, 2 di questi pazienti erano ad alto rischio (AREB). Dai risultati ottenuti non è stata rilevata nessuna correlazione tra l'effetto inibitorio del siero e la severità della citopenia.

Negli ultimi anni lo studio del microambiente midollare nelle SMD è stato affrontato da numerosi ricercatori ma a tutt'oggi l'integrità funzionale del microambiente ematopoietico è un tema dibattuto. Alcuni Autori non hanno evidenziato particolari alterazioni morfologiche o quantitative a carico delle diverse componenti cellulari dello stroma di pazienti con SMD (*Coutinho CG. et al 1990, Alvi S. et al 2001*), mentre altri hanno riportato alterazioni funzionali in

particolare nella produzione di alcune citochine quali il TNF- $\alpha$ , prodotto prevalentemente dai macrofagi, e l'IL-6, prodotta dai fibroblasti, i cui livelli risultano elevati nelle SMD (*Flores-Figueroa E. et al, 2002 Raza A. et al, 1995*).

In uno studio su casistiche pediatriche è stato osservato che il microambiente midollare ha la tendenza a mantenere i progenitori ematopoietici in uno stato indifferenziato, sostenendo la proliferazione e ritardando il differenziamento in senso mieloide. Questo vantaggio proliferativo dei progenitori più immaturi potrebbe generare l'accumulo di mutazioni che favorirebbero la proliferazione del clone displastico proteggendolo dall'apoptosi (*Radovan Borojevic et al, 2004*).

Nel nostro studio è stata valutata la funzionalità del microambiente ematopoietico ed il ruolo svolto dalle cellule stromali nella proliferazione e differenziazione delle CSE. Il primo approccio è stato valutare in termini quantitativi il numero di progenitori dei fibroblasti (CFU-F) in pazienti mielodisplastici comparandolo con il potenziale proliferativo di soggetti normali. I risultati hanno evidenziato una significativa riduzione del numero di CFU-F in tutti i pazienti studiati rispetto al controllo normale. In letteratura la valutazione del numero delle CFU-F in tale patologia è stata riportata soltanto da uno studio riferito a pazienti adulti (*Flores-Figueroa E. et al, 2002* ). Diversamente da

quanto da noi osservato, il gruppo spagnolo non ha rilevato alcun deficit di CFU-F in pazienti mielodisplastici rispetto ai controlli normali.

Malgrado il deficit di CFU-F , nel 73% dei pazienti è stata osservata in colture liquide a lungo termine la formazione di uno stroma morfologicamente normale, ossia composto da fibroblasti, macrofagi e pre-adipociti, sebbene la confluenza completa sia ritardata di una settimana rispetto alle colture allestite da donatori normali. In entrambe le colture, siano esse originate da midolli mielodisplastici che normali, il numero di cellule nucleate presenti nel sovrinatante era sovrapponibile mentre il numero di progenitori granulopoietici rilevabili

settimanalmente nel sovrinatante era significativamente ridotto nei pazienti rispetto ai controlli. Risultato analogo è stato riportato da *Radovan Borojevic et al, (2004)* che hanno osservato una riduzione sia delle cellule del sopranatante che dei progenitori dalla seconda-terza settimana di coltura. Tale deficit di progenitori prodotti in colture a lungo termine potrebbe essere attribuito ad un'alterata funzionalità delle cellule stromali sia in termini di produzione di fattori stimolanti/inibenti la proliferazione delle CSE o a deficit di espressione di molecole di adesione. Alternativamente, il deficit potrebbe essere ascritto all'alterata capacità proliferativa delle CSE che è un'evidenza frequentemente rilevata nelle mielodisplasie. Pertanto, al fine di individuare quale delle citate

ipotesi fosse quella più probabile sono state allestite delle co-culture inoculando cellule CD34+, selezionate da sangue midollare e periferico di donatori normali, su stromi preformati di 3 pazienti con SMD e 3 controlli normali.

Lo stroma midollare generato da midolli mielodisplastici ha evidenziato in 2 su 3 casi studiati una ridotta capacità di indurre la proliferazione, differenziazione e sopravvivenza delle cellule CD34+ normali, anche se in misura diversa da paziente a paziente. Tale risultato, valutato singolarmente, non risulta conclusivo in quanto riferito ad un numero limitato di casi, ma valutato in associazione al risultato delle colture a lungo termine, suggerisce che nella maggior parte delle SMD lo stroma ha una ridotta funzionalità, anche se in alcuni pazienti lo stroma è quantitativamente e funzionalmente normale. I risultati riportati in letteratura confermano tale eterogeneità, infatti alcuni Autori hanno evidenziato un deficit funzionale (*Flores-Figueroa et al 2008, Radovan Borojevic et al 2004*), mentre altri studi non evidenziano alterazioni morfologiche o funzionali del microambiente (*Coutinho CG. et al 1990, Alvi S. et al 2001*).

In conclusione, il nostro studio, condotto su una casistica rappresentata prevalentemente da pazienti a basso rischio, conferma l'eterogeneità delle patologie che vengono complessivamente identificate come sindromi

mielodisplastiche. Infatti, sebbene in oltre il 50% dei casi sia presente un'alterazione della capacità proliferativa delle CSE, e che tale alterazione sia più frequente in pazienti con citopenia più severa, in un'altra metà dei pazienti la capacità proliferativa dei progenitori ematopoietici è conservata. Il pattern di crescita in vitro appare comunque correlato all'andamento clinico, infatti, fra i pazienti in cui all'esordio si evidenziava una ridotta crescita in vitro in tre casi è stata osservata un'evoluzione leucemica, tali pazienti sono stati successivamente avviati a trapianto, altri 3 pazienti sono stati trapiantati in quanto ad alto rischio per alterazioni citogenetiche o per presenza di blasti midollari. Pertanto, del gruppo caratterizzato da ridotta crescita soltanto 5 pazienti hanno malattia stabile ad un follow-up mediano di 3 anni mentre nel gruppo di pazienti con normale proliferazione in vitro soltanto un paziente è stato trapiantato per grave citopenia ed importante fabbisogno trasfusionale ed è vivo a 4,5 anni e gli altri pazienti hanno condizioni cliniche stabili ad un follow-up mediano di circa 5 anni.

Il microambiente midollare, sebbene deficitario in alcuni pazienti, non sembra fornire la possibilità di identificare pazienti con prognosi sfavorevole, sarebbe comunque interessante ampliare lo studio al fine di valutare l'evoluzione della

malattia nei pazienti in cui si osserva la concomitanza di alterazioni a carico del  
compartimento ematopoietico e del microambiente.

[Dott.ssa Maria Cristina Scerpa](#)