



Terapia cellulare per l'arteriopatia periferica: Revisione sistematica e meta-analisi della letteratura

Gian Paolo Fadini¹, Mauro Rigato¹, Matteo Monami², Guido Pantè³
a nome del Gruppo di Studio Medicina Rigenerativa della Società Italiana di Diabetologia

Affiliazioni

¹ Dipartimento di Medicina, Università di Padova, 35128 Padova, Italia.

² Diabetologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, 50141 Firenze, Italia.

³ Agenzia Italiana del Farmaco, AreapPre-autorizzazione, 00187 Rome - Italy

RIASSUNTO

L'ischemia critica degli arti inferiori rappresenta lo stadio terminale dell'arteriopatia periferica e si associa a un elevato rischio di amputazioni e mortalità nei pazienti non suscettibili a procedure di rivascularizzazione. Questa condizione è particolarmente frequente nella popolazione diabetica e contribuisce frequentemente al quadro del piede diabetico ischemico.

Questo documento presenta una revisione sistematica della letteratura ed una meta-analisi degli studi che hanno valutato l'efficacia e la sicurezza della terapia con cellule autologhe nell'ischemia critica degli arti inferiori non suscettibile a rivascularizzazione.

Sono stati analizzati 19 trials randomizzati controllati (RCTs, 837 pazienti), 8 trials non randomizzati (338 pazienti) e 41 studi non controllati (1,177 pazienti). Le amputazioni maggiori sono state considerate l'outcome primario. L'analisi primaria condotta sugli RCTs ha dimostrato che la terapia cellulare riduce significativamente il rischio di amputazioni del 37%, migliora la sopravvivenza libera da amputazioni del 18% (sebbene la mortalità non sia ridotta) e incrementa il tasso di guarigione delle ulcere del 59%. Inoltre, la terapia cellulare migliora significativamente l'ABI, la TcPO₂ e riduce il dolore a riposo. L'analisi secondaria su tutti i trials controllati (1,175 pazienti) ha evidenziato che il numero di pazienti da trattare per prevenire un'amputazione maggiore nel corso dei successivi 12 mesi era pari a 2. L'analisi terziaria condotta su tutti gli studi (2,332 pazienti) ha valutato i cambiamenti rispetto al basale dei seguenti endpoints: ABI, TcPO₂, dolore a riposo, distanza percorsa senza dolore. Nelle sotto-analisi, la via di somministrazione intramuscolare sembrava essere più efficace rispetto a quella intra-arteriosa, e le cellule mononucleate raccolte dal sangue periferico dopo mobilizzazione (PB-MNCs) sembravano più efficaci rispetto a quelle midollari (BM MNCs) e mesenchimali (BM-MSCs). Le analisi di meta-regressione hanno evidenziato che il beneficio della terapia cellulare sull'end-point primario era maggiore nei trials con una elevata prevalenza di diabete. La terapia cellulare non era associata con un incremento

degli eventi avversi severi. E' importante evidenziare che l'effetto della terapia cellulare su tutti gli endpoints perdeva di significatività quando l'analisi era ristretta ai soli RCTs controllati verso placebo, e scompariva considerando i soli studi a basso rischio di bias.

In conclusione, sebbene questa meta-analisi metta in luce la necessità di ulteriori studi di elevata qualità, randomizzati e controllati verso placebo, il principio di equità potrebbe non essere assicurato, poiché la terapia cellulare ha il potenziale di modificare la storia naturale dell'ischemia critica degli arti inferiori non rivascolarizzabile.

Introduzione

L'arteriopatia periferica (PAD) è una complicanza comune dell'aterosclerosi e di rare patologie sistemiche quali la tromboangiite obliterante (TAO o malattia di Buerger). Nel 2014, un'indagine su scala nazionale ha evidenziato che la prevalenza di PAD negli Stati Uniti era pari al 10.7% degli individui di età uguale o superiore a 40 anni.¹ Ogni anno, l'11.2% dei pazienti affetti da PAD evolve verso l'ischemia critica (CLI), definita dalla presenza di dolore ischemico a riposo o di lesioni ischemiche delle estremità. In un terzo dei casi, l'ischemia critica si sviluppa senza una precedente diagnosi di PAD, specialmente nei pazienti con storia di diabete, stroke o insufficienza renale o cardiaca. L'ischemia critica è associata ad una prognosi infausta, con un tasso di amputazione e mortalità ad un anno pari al 30% e al 25%, rispettivamente.² La rivascolarizzazione, chirurgica o percutanea, rappresenta il trattamento di scelta,^{3, 4} permettendo di migliorare la sopravvivenza e di ridurre il tasso di amputazioni.⁵ Tuttavia, nonostante sia aumentata la possibilità di accedere a tali procedure negli ultimi anni, fino al 50% dei pazienti affetti da CLI non è candidabile alla rivascolarizzazione e pertanto la mortalità a lungo termine rimane elevata.⁶ Per tali ragioni, la prognosi dei pazienti affetti da CLI è peggiore di quella di molti tipi di cancro.⁷ I pazienti con PAD presentano un'elevata prevalenza di coronaropatia e patologie cerebrovascolari con un aumento fino a sei volte del rischio di mortalità cardiovascolare.⁸ Infatti, la morte avviene principalmente per cause cardiovascolari non necessariamente direttamente correlate all'ischemia degli arti inferiori o alle sue complicanze.⁸ Questi dati clinici ed epidemiologici dimostrano che, in un elevato numero di pazienti, le terapie al momento disponibili non sono sufficienti, suggerendo il razionale per l'utilizzo di nuovi trattamenti avanzati per la gestione dell'ischemia critica.⁹ Da quando è stato scoperto il ruolo delle cellule circolanti nell'angiogenesi post-natale, numerosi studi clinici sono stati realizzati al fine di valutare l'efficacia della terapia cellulare nel trattamento dell'ischemia critica degli arti inferiori. Gli studi sono molto eterogenei e comprendono: case reports, trials non controllati, trials non randomizzati controllati e trials randomizzati controllati (RCTs).¹⁰ Nell'ultimo decennio, le meta-analisi di questi studi non hanno raggiunto conclusioni univoche circa l'efficacia della terapia cellulare nell'arteriopatia periferica.¹¹⁻¹⁷ In particolare, l'analisi cumulativa di un numero limitato di RCTs controllati verso placebo, non ha complessivamente dimostrato un effetto a favore della terapia cellulare, mentre l'analisi combinata di RCTs di alta e bassa qualità, ha fornito evidenze a favore della terapia cellulare.^{12, 14} L'utilizzo delle meta-analisi sta aumentando al fine di supportare la medicina basata sull'evidenza, tuttavia è necessario prestare molta attenzione ad interpretare le loro conclusioni.¹⁸ La generale bassa qualità dei trials di terapia cellulare rappresenta un importante elemento di criticità. Tuttavia, un'analisi di meta-regressione che ha valutato la relazione tra entità dell'effetto e numero di errori riportati negli studi di terapia cellulare cardiaca, è stata estensivamente criticata.^{19, 20} Nonostante i loro limiti, le meta-analisi sono strumenti importanti nella ricerca scientifica, in quanto permettono di riassumere le evidenze accumulate nel corso degli anni e di generare analisi esplorative al fine di indirizzare future ricerche.²¹ Un esempio recente è quello di una meta-analisi che ha chiarito come la terapia cellulare non sia efficace nell'ischemia miocardica acuta ma determini degli enormi vantaggi in soggetti affetti da cardiopatia ischemica cronica.^{22, 23} In questo documento, presentiamo una revisione sistematica della letteratura e una meta-analisi dei trials che hanno valutato il ruolo della

terapia cellulare nell'ischemia critica degli arti inferiori senza indicazioni alla rivascolarizzazione. Una particolare attenzione è stata rivolta alla PAD associata al diabete e gli studi condotti sulla popolazione diabetica sono stati discussi a parte. Riteniamo che, oltre a fornire maggiori evidenze scientifiche, l'analisi attenta dei dati al momento disponibili consentirà di affrontare questioni etiche ancora aperte e di promuovere ricerche future.

Metodi della ricerca

Strategia di ricerca ed estrazione dei dati

Il protocollo di questa meta-analisi (CRD42016050239) è stato registrato nel database PROSPERO consultabile al seguente indirizzo: <http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO>. La meta-analisi è stata condotta in accordo con le linee guida PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses).²⁴ Sono stati selezionati tutti gli studi clinici effettuati in pazienti con ischemia critica degli arti inferiori trattati con terapia cellulare. Sono state considerate le seguenti tipologie di studi: trials randomizzati controllati, trials non randomizzati controllati, trials non controllati e case series con almeno 8 pazienti. La ricerca degli studi è stata condotta nei seguenti database: PubMed, ISI Web of Science, Scopus, www.clinicaltrials.gov, registro centrale Cochrane dei trials controllati. Sono stati considerati solo studi in lingua inglese pubblicati fino a luglio 2016. I dati sono stati estratti dai singoli studi da due autori (MR e GPF) e in caso di disaccordo un terzo autore (MM) è stato interpellato per risolvere la controversia. L'outcome primario della presente meta-analisi è stato il tasso di amputazioni maggiori (sopra il ginocchio) valutato nel gruppo in terapia cellulare e nei controlli. Gli outcomes secondari sono stati suddivisi in "hard" e "soft". I primi comprendevano la sopravvivenza libera da amputazioni (AFS), la mortalità per tutte le cause e il tasso di guarigione completa delle ulcere. I secondi, gli indici surrogati di perfusione (ankle brachial index [ABI] e pressione transcutanea di ossigeno [TcO₂]) e di ischemia (dolore a riposo e distanza percorsa in assenza di dolore [PFWD]).

Strategia di analisi

L'analisi primaria è stata eseguita su tutti gli RCTs. In seguito, abbiamo analizzato separatamente i trials non randomizzati e un'analisi secondaria è stata condotta su tutti i trials controllati (randomizzati e non-randomizzati). Infine, abbiamo analizzato separatamente i trials non controllati valutando l'effetto della terapia cellulare sugli endpoints surrogati di perfusione e ischemia rispetto al basale, e un'analisi terziaria è stata condotta su tutti i trials (controllati e non-controllati). Sono state pianificate a priori le seguenti analisi per sottogruppi in funzione di: qualità degli studi (RCTs, controllati versus placebo), tipo di cellule, via di somministrazione, durata del follow-up, utilizzo del modello ad effetti casuali o fissi (random o fixed effect).

Sintesi dei dati e analisi statistica

Le variabili continue sono state riportate come medie e deviazioni standard (SD). Gli autori dei singoli studi sono stati contattati qualora i dati riportati fossero incompleti o discrepanti. Per le variabili continue (ABI, TcPO₂, RPS, PFWD), abbiamo considerato la differenza media (MD) tra i gruppi dei valori misurati al termine del periodo di follow-up, poiché solo una minoranza di studi riportava le variazioni rispetto al basale nei singoli gruppi. La misurazione del dolore a riposo è stata normalizzata in una scala da 0 a 4. Per le variabili dicotomiche, sono stati calcolati i rischi relativi (RR) per l'amputazione, la sopravvivenza libera da amputazione, la mortalità e la guarigione delle ulcere. Il tasso annuale di amputazioni è stato calcolato considerando una distribuzione lineare di eventi anche nei trials con durata di follow-up inferiore a 12 mesi. Poiché in alcuni trials non sono state registrate amputazioni, il tasso annualizzato potrebbe essere

sottostimato. In considerazione dell'elevato grado di eterogeneità (I^2), intrinseca ai trials di terapia cellulare, le meta-analisi sono state condotte utilizzando sempre il modello a effetti casuali (random effect). In una delle analisi per sottogruppi, sono stati riportati anche i risultati ottenuti con il modello a effetti fissi (fixed effect model). E' stato sempre applicato un approccio intention-to-treat per derivare il numero di pazienti (n), anche quando le variabili continue al termine del follow-up sono state misurate in un numero di pazienti inferiore rispetto al basale, a causa dei decessi e delle amputazioni. In tal modo, i pesi dei singoli studi nella meta-analisi sono indipendenti dalla sopravvivenza libera da amputazione. I bias di pubblicazione sono stati ricercati a mezzo dei Funnel plots, utilizzando il test di Egger per valutarne la simmetria.²⁵ Le analisi di sensibilità sono state condotte per indagare le cause di eterogeneità. Tutte le analisi sono state condotte utilizzando il software RevMan.

Valutazione della qualità degli studi

Due autori (MR e GPF) hanno valutato, in modo indipendente, la qualità metodologica degli studi selezionati, utilizzando i criteri proposti dalla Cochrane Collaboration. Questi criteri valutano: l'appropriatezza dei metodi utilizzati per generare la sequenza di randomizzazione, la modalità di occultamento della sequenza di randomizzazione, il blinding dei partecipanti e del personale sanitario, il blinding di chi rileva gli outcomes, la presenza di outcomes incompleti, l'eventuale selettività nel riportare determinati outcomes e infine altri potenziali fonti di bias. In caso di dubbi, gli autori dei singoli studi sono stati contattati per ottenere chiarimenti.

Analisi sequenziale dei trial (TSA)

In ambito meta-analitico, la TSA è un approccio che consente di stimare la numerosità campionaria necessaria per evidenziare una differenza statisticamente valida dell'effetto tra il gruppo trattato e quello di controllo. La TSA è utile al fine di ridurre il numero di errori casuali che si accumulano quando una meta-analisi viene ripetutamente aggiornata. La numerosità campionaria è stata stimata considerando la riduzione del rischio relativo (RRR) dei soli studi controllati versus placebo, una potenza statistica dell'80% e un errore alfa del 5%.

Meta-regressioni

Per esplorare l'eventuale associazione tra le caratteristiche dei singoli trials e l'entità degli effetti riportati, sono state condotte delle analisi di meta-regressione su tutti gli RCTs. Dato l'elevato numero di endpoints e di covariate, le analisi di meta-regressione sono state condotte seguendo un preciso ordine gerarchico. In primo luogo, sono state valutate le correlazioni tra il logaritmo del rischio relativo dell'endpoint primario (amputazione) e tutte le covariate riportate in Tabella 1. In seguito, le sole covariate che dimostravano una correlazione significativa con l'endpoint primario sono state testate per le correlazioni con gli endpoint secondari "hard". Tutte le meta-regressioni sono state condotte utilizzando il software Comprehensive Meta-Analysis.

Risultati

Studi inclusi e riassunto delle caratteristiche dei pazienti

Le caratteristiche dei pazienti, ottenute mediante media ponderata, e divise in accorso al tipo di studio sono presentate in Tabella 1. Complessivamente, i pazienti degli studi randomizzati, non randomizzati e non controllati presentavano simili caratteristiche.

Qualità degli studi inclusi

Tra gli RCTs, solo 3 presentavano un basso rischio di bias in accordo ai criteri proposti dalla Cochrane Collaboration. Per gli altri RCTs, la principale fonte di bias era correlata alle modalità di

produzione e occultamento della sequenza di randomizzazione e al blinding del personale sanitario e dei partecipanti. In molti casi, il bias derivava dalla mancata descrizione di tali procedure (rischio non chiaro).

Eterogeneità

L'eterogeneità intrinseca tra gli studi era in genere elevata, poiché questi differivano per eziologia dell'arteriopatia, dose e via di somministrazione delle cellule e durata del follow-up. Nell'analisi primaria (soli RCTs), è stata riscontrata un'elevata eterogeneità per i seguenti outcomes: sopravvivenza libera da amputazioni, ABI, TcPO₂, dolore a riposo e distanza percorsa senza dolore. Nell'analisi secondaria (tutti gli studi controllati), si sono riscontrati risultati simili, inoltre l'eterogeneità era elevata anche per la guarigione delle ulcere. Nell'analisi terziaria, l'eterogeneità era elevata e significativa per tutti gli endpoints surrogati. Per tali ragioni abbiamo utilizzato sempre il modello a effetti casuali (random effect model) per condurre le meta-analisi.

Bias di pubblicazione

Nell'ambito della terapia cellulare, valutare i bias di pubblicazione è molto importante, poiché gli studi con risultati negativi potrebbero essere filtrati, manipolati o presentati in modo che diano risultati positivi, e i piccoli studi negativi potrebbero non essere considerati per la pubblicazione. Il test di Egger ha evidenziato una significativa asimmetria nella distribuzione degli RCTs nei funnel plots relativi all'amputazione e alla sopravvivenza libera da amputazione. Tale dato suggerisce un bias di pubblicazione determinato dalla mancata pubblicazione degli studi di piccole dimensioni con risultati negativi.

RCTs

L'analisi primaria è stata condotta su 19 RCTs, per un totale di 837 pazienti. In tali studi, sono stati utilizzati i seguenti tipi di cellule: cellule mononucleate di origine midollare (BM-MNCs, 8 studi) o loro concentrati (2 studi), cellule mesenchimali di origine midollare (BM-MSCs, 3 studi), cellule mononucleate mobilizzate nel sangue periferico (PB-MNCs, 5 studi). Due studi utilizzavano popolazioni cellulari espanse ex-vivo: uno, cellule mesenchimali e macrofagi di origine midollare,²⁶ l'altro, cellule pro-angiogeniche prelevate da sangue periferico.²⁷ Uno studio randomizzato confrontava direttamente BM-MNCs versus BM-MSCs.²⁸ Sono state utilizzate le seguenti vie di somministrazione: intra-muscolare con multiple iniezioni a livello dei muscoli del polpaccio (16 studi), intra-arteriosa (4 studi), entrambe (1 studio). I pazienti nel gruppo di controllo erano trattati con placebo (in genere soluzione salina, 10 studi), o sola terapia medica massimale (8 studi). In merito all'outcome primario, la terapia cellulare si associava ad una riduzione significativa del 37% del tasso di amputazioni (RR 0.63, 95% C.I. 0.49-0.82; p=0.0004; Figura 1) e ad un incremento significativo della sopravvivenza libera da amputazioni (RR 1.18; 95%.C.I. 1.04-1.35; p=0.01), sebbene la mortalità totale non fosse significativamente migliorata (RR 0.80; 95% C.I. 0.48-1.33; p=0.39). Inoltre, la terapia cellulare migliorava significativamente il tasso di completa guarigione delle ulcere del 59% (95% C.I. 19-113%). Tra gli endpoints surrogati, la terapia cellulare migliorava significativamente l'ABI di 0.11 (95% C.I. 0.07-0.15; p<10⁻⁵), la TcO₂ di 10.7 mmHg (95% C.I. 4.9-16.6; p=0.0003), e il dolore a riposo di 0.74 (95% C.I. 0.36-1.12) in una scala da 0 a 4. Non si sono osservate differenze significative per la distanza percorsa in assenza di dolore. Poiché l'utilizzo del modello di analisi ad effetti casuali (random effect) può sovrastimare gli studi di piccole dimensioni, come suggerito da Sterne et al.²⁹, abbiamo condotto l'analisi primaria utilizzando anche il modello ad effetti fissi (fixed effect), ottenendo risultati sovrapponibili (Tabella 2).

Analisi secondaria: tutti i trials controllati

Sono stati individuati 7 trials non randomizzati controllati. In questi, il gruppo di controllo riceveva placebo (1 studio) o la sola terapia medica massimale (6 studi) in modo non randomizzato. Sono

stati utilizzati i seguenti tipi di cellule: BM-MNC (3 studi), cellule midollari non frazionate (2 studi), PB-MNC o progenitori (3 studi). La meta-analisi di questi studi ha evidenziato che la terapia cellulare riduceva significativamente il tasso di amputazione dell'83% e incrementava la sopravvivenza libera da amputazioni del 112%, in assenza di riduzioni significative del tasso di mortalità. Inoltre, il gruppo trattato presentava un miglioramento significativo di ABI, TcO₂, RPS e PFWD di entità di poco superiore rispetto agli RCTs. La TSA per l'outcome primario (amputazioni) ha evidenziato che nell'analisi primaria (soli RCTs) non è stata raggiunta una numerosità sufficiente per escludere conclusioni falsamente positive. Per tale motivo, è stata condotta un'analisi secondaria su tutti i trials controllati (randomizzati e non randomizzati) per un totale di 1,175 pazienti inclusi. In questo caso, la terapia cellulare dimezzava il tasso di amputazioni (RR 0.48; 95% C.I. 0.35-0.66). Il tasso annuo di amputazioni calcolato su tutti i trials controllati era del 70.8% nel gruppo di controllo e del 27.2% nel gruppo in terapia cellulare (p=0.0002) con un NNT (numero di pazienti da trattare per evitare un evento) di 2.3. La terapia cellulare migliorava anche la sopravvivenza libera da amputazioni (RR 1.40; 95% C.I. 1.18-1.65), il tasso di completa guarigione delle ulcere (RR 1.67; 95% C.I. 1.24-2.25) e gli endpoints surrogati di perfusione (ABI, TcO₂) e ischemia (RPS, PFWD).

Analisi terziaria: tutti i trials con outcomes quantitativi

Sono stati individuati 41 trials non controllati, per un totale di 1,157 pazienti. Gli studi utilizzavano i seguenti tipi di cellule: BM-MNCs (n=28), PB-MNCs (n=10), popolazioni cellulari selezionate (CD34⁺, CD133⁺ o cellule progenitrici endoteliali; 4 studi), o BM-MSCs (n=1). Due studi hanno impiegato sia BM-MNCs che PB-MNCs. Il miglioramento degli indici surrogati di perfusione è stato valutato come variazione rispetto al valore basale. Complessivamente, questi studi hanno dimostrato che la terapia cellulare determina: un incremento dell'ABI di 0.15 (95% C.I. 0.11-0.18), un incremento della TcO₂ di 14.1 mm Hg (95% C.I. 11.1-17.0), una riduzione del dolore a riposo di 1.68 (95% C.I. 1.44-1.91) su una scala da 0 a 4, e un miglioramento della distanza percorsa in assenza di dolore di 259.1 m (95% C.I. 182.2-335.9). Il tasso annuo di amputazione nei trials non controllati è risultato pari a 21.8%, dato simile a quello osservato nel gruppo trattato con terapia cellulare nei trials controllati (p=0.39). Poiché questi studi hanno dimostrato un beneficio della terapia cellulare simile, ma quantitativamente superiore, a quello evidenziato nei trials controllati, è stata condotta un'analisi terziaria (n=2,334) in cui tutti gli studi (controllati e non controllati) sono stati considerati insieme per valutare le differenze rispetto basale indotte dalla terapia cellulare sugli endpoints surrogati di perfusione e ischemia. Questa analisi ha dimostrato un aumento significativo dell'ABI (0.14; 95% C.I. 0.12-0.17), della TcO₂ (14.1 mmHg; 95% C.I. 9.9-18.2), della distanza percorsa senza dolore (235 m, 95% C.I. 175-297), ed una riduzione significativa dello score di dolore a riposo (1.6/4).

Analisi per sottogruppi (soli RCTs)

Qualità dei trials. Nella sotto analisi dei soli trials controllati verso placebo (n=12), la terapia cellulare era associata a un miglioramento non significativo del tasso di amputazione (RR 0.77; 95% C.I. 0.56-1.07; p=0.12), della sopravvivenza libera da amputazione (RR 1.10; 95% C.I. 0.90-1.33; p=0.36) e della guarigione delle ulcere (RR 1.39; 95% C.I. 0.98-1.96; p=0.07), sebbene persistessero miglioramenti significativi di: ABI (0.11; 95% C.I. 0.06-0.16), TcO₂ (11.6 mmHg; 95% C.I. 2.1-21.1) e RPS (0.63; 95% C.I. 0.02-1.24). L'ulteriore restrizione dell'analisi ai soli tre RCTs con basso rischio di bias determinava la perdita di qualsiasi beneficio per tutti gli endpoints considerati (Tabella 2 e Figura 2).

Via di somministrazione. La via di somministrazione più comunemente utilizzata era quella intramuscolare (n=15), in 3 trials veniva utilizzata l'infusione intra-arteriosa e in un trial era utilizzata alternativamente quella intra-muscolare o quella intra-arteriosa.³⁰ Nella sotto-analisi per via di somministrazione, solo la via intra-muscolare, ma non l'intra-arteriosa, era associata a un

miglioramento significativo del tasso di amputazione, della sopravvivenza libera da amputazione, della completa guarigione delle ulcere, dell'ABI e della TcO₂. Il dolore a riposo migliorava significativamente utilizzando sia la via intra-muscolare che quella intra-arteriosa (Tabella 2). In un trial di confronto diretto, Klepanec et al. ha randomizzato 41 pazienti con arteriopatia in stadio Rutherford 4-6 non rivascolarizzabile alla somministrazione intra-muscolare o intra-arteriosa di BM-MNCs: non si sono evidenziate differenze tra i due gruppi in termini di salvataggio d'arto e guarigione delle ulcere (>70%), così come degli indici surrogati di perfusione, dolore e qualità di vita.³¹ In un altro trial comparativo, Van Tongeren et al. ha randomizzato 21 pazienti con PAD a ricevere per via intra-muscolare o per via intra-muscolare e intra-arteriosa cellule non frazionate di derivazione midollare: il tasso di amputazione non era significativamente inferiore nel gruppo trattato per via intra-muscolare e intra-arteriosa rispetto alla sola via intra-muscolare (25% vs 64%; p=0.17) e gli indici di perfusione miglioravano in modo simile nei due gruppi.³²

Tipo di cellule. Sono stati utilizzati i seguenti tipi di cellule: BM-MNCs, BM-MSCs, o PB-MNCs. Altri tipi di cellule selezionati erano eterogenei e non potevano essere aggregati in un singolo gruppo. Nell'analisi per sottogruppi, solo la terapia con PB-MNCs, ma non con altri tipi di cellule si associava a un miglioramento significativo del tasso di amputazioni e della sopravvivenza libera da amputazioni, sebbene solo le BM-MNCs migliorassero significativamente la guarigione delle ulcere (Tabella 2). Sia le BM-MNCs, che le PB-MNCs, miglioravano significativamente l'ABI, la TcO₂ e il dolore a riposo. Le BM-MSCs miglioravano soltanto l'ABI, la TcO₂ e il dolore a riposo, sebbene precedenti evidenze avessero dimostrato, in vivo e in vitro, che il potenziale neo-angiogenetico di queste cellule isolate dai pazienti con PAD fosse pari a quello dei controlli sani.³³ In un trial di confronto diretto, Huang et al. ha randomizzato 150 pazienti con PAD alla terapia con BM-MNC o PB-MNC. Anche se è stata riportata soltanto l'analisi per protocol, il tasso di amputazione era basso e non differiva significativamente tra i due gruppi (5.3% nel gruppo in terapia con PB-MNC vs 8.1% nel gruppo trattato con BM-MNC). I miglioramenti dell'ABI e del dolore a riposo erano significativamente superiori nel gruppo trattato con PB-MNC rispetto a quello trattato con BM-MNC.³⁴ Analogamente, Onodera et al. ri-analizzando i dati grezzi di due precedenti coorti,^{35 36} non ha riscontrato differenze nella sopravvivenza libera da amputazione dei pazienti trattati con BM-MNCs (20.0%) o PB-MNCs (25.6%).³⁷ Nel gruppo B dello studio di Tateishi-Yuyama, 22 pazienti con ischemia critica bilaterale sono stati randomizzati al trattamento con BM-MNCs in un arto e di PB-MNCs nell'altro arto. Il trattamento con BM-MNCs era superiore a quello con PB-MNCs nel migliorare l'ABI, la TcO₂, il dolore a riposo e la distanza percorsa in assenza di dolore.³⁸ In un altro trial di confronto diretto, Lu et al. ha randomizzato 41 pazienti diabetici con ischemia critica e ulcere a ricevere l'iniezione intra-muscolare di BM-MNCs o di BM-MSCs. La terapia con BM-MSCs risultava più efficace di quella con BM-MNCs nel migliorare la guarigione delle ulcere e gli indici di perfusione.²⁸ Questi dati indicano che i trials di confronto diretto non hanno dimostrato una chiara superiorità di un tipo di cellule rispetto a un altro.

Durata del follow-up. La durata del follow-up è stata categorizzata nel seguente modo: (i) fino a 3 mesi; (ii) tra 3 e 12 mesi; (iii) 12 mesi o più. Non si sono evidenziate differenze significative degli endpoints in funzione della durata del follow-up.

Analisi di meta-regressione

Le analisi di meta-regressione sono state condotte secondo l'ordine gerarchico descritto nella sezione dei metodi. E' stata osservata una correlazione inversa significativa tra la prevalenza di diabete e il logaritmo del rischio relativo di amputazione ($r=-0.0139\pm 0.0058$; $p=0.017$; Figura 3). Questo dato suggerisce che il beneficio indotto dalla terapia cellulare sul tasso di amputazione sia superiore nei trials con maggiore prevalenza di diabete. Proseguendo nella scala gerarchica, la prevalenza di diabete non era associata con altri endpoints solidi. Non è stata rilevata nessuna correlazione tra l'outcome primario e la durata del follow-up, suggerendo che l'effetto della terapia

cellulare sull'amputazione non si riduca con il passare del tempo. Non è emersa nessuna correlazione tra il numero di cellule totali o la percentuale di CD34⁺ e l'outcome primario. L'assenza di tale correlazione è riconducibile verosimilmente all'elevata eterogeneità riguardante il tipo e al dosaggio di cellule utilizzate e la modalità con cui tali dati sono riportati nei trials. Tuttavia, quando l'analisi era ristretta ai soli trials che utilizzavano BM-MNCs (n=11), emergeva una significativa correlazione inversa tra il numero di cellule mononucleate e il logaritmo del rischio relativo di amputazione ($r=-0.6\pm 0.2/10^3$; $p=0.0041$). Tale dato suggerisce che dosi più elevate di cellule siano più efficaci nel ridurre il rischio di amputazione. L'analisi di meta-regressione non è stata condotta con gli altri tipi di cellule dato il numero esiguo di studi disponibili. In un trial di confronto diretto pubblicato dal gruppo di Losordo et al., 28 pazienti con PAD sono stati randomizzati a ricevere per via intra-muscolare cellule PB-CD34⁺ a basso dosaggio (10^5), alto dosaggio (10^6) o placebo. Al termine dei 12 mesi follow-up, il tasso di amputazione non differiva significativamente tra i due gruppi (22% vs 43%, $p=0.59$) e non si registravano differenze significative relative agli altri endpoints.³⁹ Nello studio di Molavi et al., 22 pazienti con CLI sono stati randomizzati a ricevere o una singola iniezione di BM-MNCs o 4 iniezioni ripetute. Al termine del follow-up, l'ABI e il dolore a riposo miglioravano in modo simile nei due gruppi di trattamento, mentre la distanza percorsa in assenza di dolore migliorava significativamente nel gruppo trattato con quattro iniezioni ripetute.⁴⁰ Nel solo gruppo di trials che utilizzavano BM-MNCs, la meta-correlazione con la prevalenza di diabete era confermata, e si evidenziava anche una correlazione con l'anno di pubblicazione che suggeriva come il beneficio della terapia cellulare sul rischio di amputazione fosse minore nei trials più recenti rispetto a quelli più datati.

Sicurezza

Tra tutti gli studi controllati inclusi nell'analisi secondaria, 19 di questi riportavano dati relativi alla sicurezza, tuttavia in modo estremamente eterogeneo e talora inconsistente. Il tasso di eventi/paziente/anno, è stato calcolato considerando il numero di eventi riportati e la durata del follow-up di ciascun trial, raggruppandoli in accordo con la classificazione MedDRA (Medical Dictionary for Regulatory Activities) (Figura 4). L'analisi cumulativa di tali dati ha stimato che, in media, la maggior parte dei pazienti trattati con terapia cellulare sperimenta un evento avverso non severo (NSAE) nel corso del successivo anno di osservazione. Rispetto ai controlli, la terapia cellulare era associata a un significativo aumento del tasso di NSAEs e ad un incremento non significativo degli eventi avversi severi non fatali, non correlati al quadro di PAD (SAEs). La morte e gli eventi avversi correlati al quadro di PAD non sono stati considerati nell'analisi di sicurezza in quanto già considerati come endpoints di efficacia. L'incremento del tasso di NSAEs nel gruppo trattato con terapia cellulare era attribuibile prevalentemente a disturbi locali nel sito d'iniezione e a disordini muscolo-scheletrici, mentre altri eventi (a carico del sistema genito-urinario, del sistema nervoso centrale, del metabolismo e della nutrizione) erano piuttosto rari e meno frequenti nel gruppo in terapia cellulare rispetto a quello di controllo.

Trials di terapia cellulare nella popolazione diabetica

Un totale di 6 studi controllati (di cui uno non randomizzato) ha valutato gli effetti della terapia cellulare in popolazioni di soli pazienti diabetici con ischemia critica degli arti inferiori.

Nello studio di Huang et al., 28 pazienti sono stati randomizzati al trattamento con PB-MNC per via intra-muscolare o al gruppo di controllo in sola terapia medica massimale. Al termine dei 3 mesi di follow-up, il tasso di amputazioni maggiori, risultava pari allo 0% nel gruppo trattato con PB-MNC e al 20.8% nei controlli ($p=0.016$). Il gruppo trattato con terapia cellulare, rispetto a quello di controllo, presentava inoltre un aumento significativo del tasso di guarigione delle ulcere (77.8% vs 38.9%, $p<0.001$), e un miglioramento significativo dei seguenti indicatori surrogati di perfusione e ischemia: ABI, dolore a riposo e distanza percorsa in assenza di dolore. La terapia cellulare risultava ben tollerata in assenza di eventi avversi.⁴¹

Nello studio di Lu et al. pubblicato nel 2008, 50 pazienti sono stati randomizzati al trattamento con BM-MSC per via intra-muscolare o al gruppo di controllo in sola terapia medica massimale. Al termine dei 3 mesi di follow-up, il tasso di amputazioni maggiori, risultava pari allo 0% nel gruppo trattato con BM-MSC e al 13% nei controlli ($p=0.04$). Il gruppo trattato con terapia cellulare, rispetto a quello di controllo, presentava inoltre un aumento significativo del tasso di guarigione delle ulcere (83.3% vs 45%, $p=0.012$) e un miglioramento significativo dei seguenti indicatori surrogati di perfusione e ischemia: ABI, dolore a riposo e distanza percorsa in assenza di dolore. La terapia cellulare risultava ben tollerata in assenza di eventi avversi.⁴²

Nello studio di Lu et al. pubblicato nel 2011, gli arti di 41 pazienti diabetici con CLI sono stati randomizzati al trattamento con BM-MSC ($n=20$), BM-MNC ($n=21$) o soluzione salina ($n=41$) per via intra-muscolare. Al termine dei 6 mesi di follow-up, il tasso di amputazioni maggiori risultava pari allo 0% nei gruppi trattati con BM-MSC e BM-MNC e al 16.2% nel gruppo di controllo ($p=0.024$ per BM-MSC; $p=0.021$ per BM-MNC). Dopo 3 mesi di follow-up, il tasso di guarigione delle ulcere era del 100% nei gruppi trattati con terapia cellulare (raggiunto più precocemente nel gruppo BM-MSC) e del 61% nel gruppo di controllo. Il gruppo trattato con BM-MSC, rispetto a quello trattato con BM-MNC, presentava inoltre un significativo miglioramento dei seguenti indici surrogati di perfusione e ischemia: ABI, TcPO₂ e distanza percorsa senza dolore. La terapia cellulare risultava ben tollerata in assenza di eventi avversi severi.²⁸

Nello studio di Mohammadzadeh et al., 21 pazienti sono stati randomizzati a ricevere un'iniezione per via intra-muscolare di PB-MNC o placebo. Al termine dei 3 mesi di follow-up, il tasso di amputazioni maggiori, risultava pari allo 0% nel gruppo trattato con PB-MNC e al 50% nei controlli ($p=0.047$). Il gruppo trattato con terapia cellulare, rispetto a quello di controllo, presentava inoltre un significativo miglioramento delle dimensioni dell'ulcera e dell'ABI. La terapia cellulare risultava ben tollerata in assenza di eventi avversi.⁴³

Nello studio di Ozturk et al., 40 pazienti sono stati randomizzati al trattamento con PB-MNC per via intra-muscolare o al gruppo di controllo in sola terapia medica massimale. Al termine dei 3 mesi di follow-up, il tasso di amputazioni maggiori, risultava pari al 15% nel gruppo trattato con PB-MNC e al 25% nei controlli ($p=0.429$). Il gruppo trattato con terapia cellulare presentava inoltre una riduzione significativa della percentuale di pazienti affetti da ulcere (dal 45% al 15%, $p=0.031$) a differenza del gruppo di controllo (dal 40% al 40%, $p=1.0$). Infine la terapia cellulare, rispetto ai controlli, era associata ad un significativo miglioramento dell'ABI, TcPO₂ e dolore a riposo. La terapia cellulare risultava ben tollerata in assenza di eventi avversi.⁴⁴

Infine, nello studio non randomizzato di Dubsy et al., 50 pazienti sono stati allocati al trattamento con BM-MNC ($n=17$), PB-MNC ($n=11$) o alla terapia medica standard ($n=22$). Al termine dei 6 mesi di follow-up, il tasso di amputazioni maggiori, risultava pari all' 11.1% nei pazienti trattati con terapia cellulare e al 50% nei controlli ($p=0.0032$), in assenza di differenze significative tra i due tipi di cellule. Il gruppo trattato con terapia cellulare, rispetto a quello di controllo, presentava inoltre un tasso più elevato di completa guarigione delle ulcere (56% vs 16%, $p=0.0093$) e un miglioramento significativo dei valori di TcPO₂. L'incidenza di effetti collaterali non severi e transitori (edema all'arto) risultava simile tra i due tipi di cellule utilizzate. Sono stati registrati due decessi nel gruppo di controllo e uno nel gruppo trattato con BM-MNC, attribuibili a cause cardiovascolari.⁴⁵

Riassunto dei risultati principali

I risultati della presente meta-analisi dimostrano che, in pazienti con ischemia critica degli arti inferiori non rivascolarizzabile, la terapia con cellule autologhe si associa a una riduzione significativa del rischio di amputazioni maggiori (-36% nell'analisi primaria) e a un significativo miglioramento della probabilità di guarigione delle ulcere (+59%). Sebbene la mortalità per tutte le cause non fosse ridotta, la terapia cellulare incrementava significativamente la sopravvivenza libera da amputazione (del 18% nell'analisi primaria). Inoltre, la terapia cellulare migliorava significativamente gli indici surrogati di perfusione, il dolore e la capacità funzionale rispetto al

gruppo di controllo. I risultati dell'analisi primaria, sui soli RCTs, sono stati confermati e rafforzati nell'analisi secondaria su tutti i trials controllati, dimostrando che la terapia cellulare era in grado di dimezzare il rischio di amputazione e di incrementare la sopravvivenza libera da amputazione del 33% e la guarigione delle ulcere del 67%. I benefici sugli endpoints surrogati sono stati ulteriormente confermati nell'analisi terziaria, dove sono stati inclusi anche i trials non controllati per un totale di 2,332 pazienti. E' possibile che qualche trial non controllato sia sfuggito alla strategia di ricerca, ma la numerosità raggiunta sembra sufficiente per raggiungere conclusioni statisticamente valide. A nostra conoscenza, questa è la meta-analisi più aggiornata e completa sugli effetti della terapia cellulare sull'ischemia critica. La nostra decisione di analizzare studi randomizzati, non randomizzati controllati e non controllati si basa sul concetto che gli studi di bassa qualità devono essere interpretati alla luce di quelli di alta qualità e vice-versa. Ad esempio, l'analisi dei tassi annui di amputazione, evidenzia che i trials non controllati forniscono già una buona stima dell'effetto della terapia cellulare negli RCTs. I risultati presentati suggeriscono che la terapia cellulare possa modificare la storia naturale dell'ischemia critica degli arti inferiori. E' interessante notare come Giles et al., in una coorte di pazienti trattati con cellule di derivazione midollare, abbia riportato un incremento della sopravvivenza libera da amputazione simile rispetto a quella di una coorte di pazienti trattati con by-pass sotto inguinale.⁴⁶ Questo suggerisce che la terapia cellulare potrebbe rappresentare un'iniziale alternativa nei pazienti ad alto rischio per by-pass sotto inguinale. La terapia cellulare si è dimostrata sicura, associandosi a eventi avversi transitori di entità lieve, principalmente correlati a complicanze locali nella sede di iniezione/infusione. Alla luce di questi risultati, e considerando che fino al 50% dei pazienti con CLI non sono candidabili alla rivascolarizzazione chirurgica o percutanea, la terapia cellulare potrebbe essere considerata come un nuovo standard di cura.

Limiti di questa analisi

L'entusiasmo di tale affermazione deve essere tuttavia ridimensionato alla luce dei limiti di questa meta-analisi, determinati principalmente dalla ridotta qualità degli studi, dall'elevata eterogeneità, dai bias di pubblicazione e dalla possibile mancanza di un'adeguata potenza statistica. L'analisi per sottogruppi in funzione della qualità degli studi ha prodotto risultati piuttosto clamorosi. Infatti, per tutti gli outcomes considerati, il beneficio della terapia cellulare rispetto ai controlli scompariva progressivamente restringendo l'analisi dagli studi non randomizzati controllati a quelli randomizzati controllati verso terapia standard, a quelli randomizzati controllati versus placebo, fino a perdersi completamente per i trials con basso rischio di bias. E' stata inoltre osservata una correlazione tra il grado di qualità dei trials randomizzati (espresso in una scala da 0-6 in accordo con i criteri Cochrane) e il logaritmo del rischio relativo di amputazione ($p=0.03$), che suggerisce una minore efficacia della terapia cellulare negli studi di maggiore qualità. Tale osservazione, già riportata in passato in letteratura,^{11, 14} indica che i trials più carenti in termini di occultamento della sequenza di randomizzazione e di blinding potrebbero essere fortemente e sistematicamente influenzati a favore della terapia cellulare. Se letto in maniera acritica, questo risultato implicherebbe che la forza e la qualità dell'evidenza siano troppo basse per sostenere l'uso della terapia cellulare nell'ischemia critica, ritenendo necessari ulteriori studi clinici di alta qualità. Queste sono le conclusioni raggiunte dalle precedenti meta-analisi su tale argomento, ma un simile ragionamento presenta almeno due punti deboli. In primo luogo, correlare la qualità dei trials con l'effetto può essere fuorviante se, come accade qui, il fattore determinante la bassa qualità degli studi è rappresentato dalla mancata descrizione dei metodi utilizzati per generare e occultare la sequenza di randomizzazione, specie negli studi meno recenti e di piccole dimensioni. Nel 2014, un'analisi di meta-regressione dimostrò che il numero di errori riportati nei trials di terapia cellulare per la cardiopatia ischemica, era inversamente correlato all'effetto della terapia sulla frazione di eiezione.¹⁹ Tale associazione ecologica, che tentava di stabilire una relazione causale tra errori riportati ed effetto della terapia, è stata estesamente criticata ed è attualmente considerata fallace.²⁰ Ci sono spiegazioni alternative, di tipo non causale, per comprendere l'assenza di efficacia negli

studi con minor rischio di bias. Ad esempio, la meta-regressione dimostra che i primi studi che utilizzavano BM-MNCs riportavano effetti più consistenti rispetto agli studi più recenti. Questo fenomeno può essere correlato alle modifiche che la pratica clinica ha subito nel corso del tempo o ai miglioramenti delle procedure di rivascularizzazione, così come al fatto che un sostanziale beneficio può essere osservato solo nei pazienti a più alto rischio, inclusi preferenzialmente in studi iniziali e di piccole dimensioni.⁴⁷ Dall'altra parte, la terapia potrebbe essere stata diversamente implementata negli studi più recenti e di maggiori dimensioni, risultando in stime più piccole dell'effetto.⁴⁸ In secondo luogo, è importante notare che non esiste un'alternativa all'amputazione nei pazienti con ischemia critica non rivascularizzabile, ma la terapia cellulare ha il potenziale di modificare la storia naturale di questa patologia potenzialmente fatale. Tale affermazione, ha un razionale biologico sostenuto da due decenni di ricerca nel campo della medicina rigenerativa cardiovascolare.⁴⁹ Pertanto, in base ai risultati della nostra analisi, anche se con evidenze di bassa qualità, si potrebbe sostenere che non sia etico progettare ulteriori RCTs, dal momento che questi pazienti dovrebbero essere trattati, tutti, con terapia cellulare, almeno nei Centri ove questa è routinariamente disponibile. In questo caso, le informazioni sull'efficacia e sulla sicurezza, insieme con la valutazione comparativa della migliore tipologia, dose e via di somministrazione delle cellule, dovrebbero essere continuamente raccolte nell'ambito di registri osservazionali multicentrici. L'analisi sequenziale dei trials ha suggerito che l'effetto negli RCTs potrebbe essere stato un falso positivo dato il mancato raggiungimento della numerosità campionaria richiesta. Per tale motivo, abbiamo eseguito una seconda TSA su tutti i trials controllati che ha fornito conclusioni più robuste. Riconosciamo come tale approccio, che combina insieme studi con disegni diversi, non sia convenzionale, sebbene il gruppo GRADE accetti la possibilità di elevare i trials non randomizzati a un livello moderato di qualità di evidenza.^{21, 47} In ogni caso, questi risultati dovrebbero essere considerati con prudenza.

Meta-regressione e sotto-analisi

Precedenti studi hanno suggerito una differente efficacia della terapia cellulare nei pazienti affetti da aterosclerosi rispetto a quelli con TAO.¹⁷ Non è stato possibile attuare una sotto-analisi a riguardo, data la mancanza di dati sull'etiologia dell'ischemia critica in moltissimi studi. Le analisi di meta-regressione hanno evidenziato che il beneficio della terapia cellulare nel ridurre il tasso di amputazione era significativamente maggiore negli studi con più alta prevalenza di diabete. È importante notare che ogni tentativo di identificare i predittori di risposta alla terapia è influenzato dalla natura ecologica della meta-regressione,²⁰ e che risultati opposti sono stati raggiunti in uno studio volto ad individuare i fattori prognostici dopo terapia con PB-MNC.⁵⁰ Tuttavia, il nostro risultato è plausibile in quanto il diabete compromette la mobilizzazione delle cellule staminali dal midollo in risposta al danno tissutale e riduce la migrazione di tali cellule verso i tessuti danneggiati,^{49, 50} fornendo così il razionale per la maggiore efficacia dell'iniezione intra-muscolare di cellule midollari in pazienti diabetici. Quindi, malgrado la disfunzione delle cellule di derivazione midollare sia stata ampiamente documentata nel diabete,⁵¹ i risultati dei trials con cellule autologhe suggeriscono che aggirare il difetto di mobilizzazione e di migrazione verso i tessuti danneggiati potrebbe essere più importante che correggere la disfunzione intrinseca a livello cellulare.

La letteratura identifica la dialisi tra i principali predittori negativi di risposta alla terapia cellulare.^{36, 37} Una meta-regressione per la prevalenza di insufficienza renale cronica o dialisi non è stata effettuata dato che solo un esiguo numero di studi riportava informazioni a riguardo. Nessun'altra analisi di meta-regressione ha soddisfatto l'ordine gerarchico prestabilito, verosimilmente a causa dell'elevata eterogeneità dei trials. Ad esempio, l'impatto dello stadio della malattia sulla risposta alla terapia cellulare potrebbe essere stato mascherato dall'impossibilità di uniformare le differenti modalità con cui questo veniva riportato dai diversi trials.⁵² Analogamente, l'impatto della dose di cellule era evidente solo tra i trials che utilizzavano BM-MNCs, poiché non

è possibile confrontare le dosi di BM-MNC con quelle di PB-MNCs e di altri tipi di cellule più selezionati.

Le sotto-analisi eseguite suggeriscono che la via intra-muscolare sia preferibile all'infusione intra-arteriosa e che le cellule PB-MNCs possano essere più efficaci delle BM-MNCs e delle BM-MSCs. L'inefficacia della terapia cellulare per via intra-arteriosa potrebbe dipendere dall'impossibilità delle cellule di raggiungere i vasi distali di gamba a causa della scarsa perfusione determinata dalla presenza di stenosi arteriose sequenziali. L'eventuale superiorità della terapia con PB-MNC, rispetto a quella con BM-MNC, deve considerare che i pazienti impiantati con cellule mobilizzate hanno ricevuto anche G(M)-CSF, il quale, di per sé, potrebbe influenzare positivamente l'outcome.¹⁷ Tuttavia, un numero limitato di trials di confronto diretto non ha evidenziato differenze significative di efficacia in funzione della via di somministrazione o del tipo di cellule. Inoltre, l'utilizzo di popolazioni specifiche di cellule staminali/progenitrici, quali le CD34⁺ o le CD133⁺, non sembra conferire un chiaro vantaggio.

Ulteriori studi e “note added in proof”

I risultati principali di questa meta-analisi sono stati pubblicati in: *Rigato et al. Circ Res 2017*. Durante la fase di pre-print del manoscritto si sono resi disponibili i risultati di due trials randomizzati controllati in doppio cieco, che non era stato possibile includere nella meta-analisi e che sono qui brevemente riportati per completezza.

- ✓ Studio PACE (Patients With Intermittent Claudication Injected With ALDH Bright Cells; NCT01774097; pubblicato su Perin et al. *Circulation* 2017): 82 pazienti con claudicatio intermittens sono stati randomizzati in doppio cieco a ricevere un impianto intramuscolare di cellule staminali ALDH (aldeide deidrogenasi)-positive o placebo. L'endpoint primario era la variazione della capacità deambulatoria (peak walking time, PWT) a 6 mesi. L'impianto di cellule staminali non è risultato superiore al placebo nell'aumentare il PWT (endpoint primario non raggiunto), ma si è osservato un miglioramento significativo dei vasi collaterali nei pazienti con occlusione femorale completa.
- ✓ Studio MOBILE (MarrowStim PAD Kit for the Treatment of Critical Limb Ischemia in Subjects With Severe Peripheral Arterial Disease; NCT01049919 presentato ad AHA 2016). 152 pazienti con vasculopatia periferica severa sono stati randomizzati in doppio cieco ad un impianto di concentrato midollare autologo o intervento sham. L'endpoint primario era la sopravvivenza libera da amputazione ad 1 anno. La terapia cellulare ha determinato una riduzione non significativa dell'endpoint primario (HR 0.64; 95% C.I. 0.31–1.31; p=0.22) in tutta la popolazione, ma è stato osservato un beneficio significativo dopo aver escluso i pazienti in stadio Rutherford 5 ed i diabetici (HR 0.37; 95% C.I. 0.16-0.85; p=0.018). Pertanto, contrariamente ai risultati della presente meta-analisi, i risultati dello studio MOBILE sembrerebbero indicare un impatto negativo del diabete sull'effetto positivo della terapia cellulare per l'ischemia periferica.

I risultati di questi ulteriori studi in relazione alla meta-analisi qui presentata sono stati discussi nell'Editoriale Wang SK, Murphy MP. *Getting A Leg Up on Cell Therapy for Critical Limb Ischemia. Circ Res. 2017;120:1227-1228.*

Implicazioni regolatorie

I risultati della presente meta-analisi hanno evidenziato che l'iniezione intra-muscolare di BM-MNCs o PB-MNCs appare la forma preferenziale di terapia cellulare per il trattamento dell'ischemia critica senza opzioni di rivascolarizzazione.

Esistono tuttavia problematiche produttive e regolatorie che risultano ancora irrisolte. Da una parte la tutela della salute pubblica necessita di poter contare su dati di efficacia e sicurezza solidi per l'approvazione e la diffusione su larga scala di questa tipologia di prodotti, imponendo cautela nonchè lunghe e costose tempistiche di sviluppo ed approvazione. Dall'altra parte, gli economici sistemi automatici di processazione cellulare ad oggi disponibili, utilizzabili al letto del paziente^{54,55}

potrebbero rendere adatti all'uso clinico i prodotti cellulari in tempi brevissimi riducendo le tempistiche ed i costi elevati richiesti per lo sviluppo di medicinali complessi.

L'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), in accordo con quanto espresso dal Comitato delle Terapie Avanzate dell'EMA (CAT), considera le BM-MNCs o PB-MNCs per il trattamento dell'ischemia critica degli arti come un medicinale di terapia avanzata (Advanced Therapy Medicinal Product - ATMP). Infatti, in accordo al "*Reflection paper on classification of advanced therapy medicinal products*" (EMA/CAT/600280/2010 rev.1), nel caso in cui non vi sia manipolazione sostanziale delle cellule e/o tessuto, la classificazione del prodotto come ATMP o meno si basa sulla funzione essenziale di tali cellule e/o tessuto. Se le cellule non manipolate vengono utilizzate per la stessa funzione essenziale nel donatore e nel ricevente (anche nel caso in cui questi ultimi siano la stessa persona - uso autologo), e nello stesso distretto anatomico, il prodotto non viene considerato un ATMP. Un esempio di questa categoria di prodotti è costituito da BM-MNC utilizzati per la ricostituzione del sistema immunitario. Altri usi clinici di BM-MNC sono classificati come ATMP, a meno che la stessa funzione essenziale e lo stesso distretto anatomico delle cellule e/o tessuto non vengano appropriatamente dimostrati nel donatore e nel ricevente. Infatti, l'uso di BM-MNC manipolate in modo non sostanziale, ad esempio per il ripristino del flusso ematico in un distretto vascolare ischemico viene interpretato dalle agenzie regolatorie come "non omologo". Questa posizione si basa sulla nozione più consolidata che le BM-MNC partecipano principalmente ai processi ematopoietici, considerando al momento insufficienti le evidenze che cellule di origine midollare siano fisiologicamente coinvolte anche nell'omeostasi vascolare.

La classificazione di un prodotto come ATMP da parte delle Autorità Regolatorie implica che il prodotto di terapia cellulare, anche nel caso in cui le cellule non vengano sottoposte ad una rilevante manipolazione, debba essere prodotto in accordo alle GMP (*Good Manufacturing Practice*) ed utilizzato secondo la normativa vigente dei medicinali in termini di sperimentazione clinica (D.Lgs. 211/2003) oppure di autorizzazione all'immissione al commercio (Reg. 1394/2007CE). Lo sviluppo di un medicinale di terapia cellulare ha un forte impatto sui costi, sostenibile solo da poche entità o istituzioni. Tuttavia, la classificazione di questi prodotti come medicinali permette di controllare e valutare la qualità del medicinale, la sua efficacia e sicurezza (incluso la mancanza di efficacia) garantendo elevati standard qualitativi. Nell'ultimo decennio infatti, si è assistito ad un aumento esponenziale, di terapie sperimentali comunemente identificate come terapie di "medicina rigenerativa". Tuttavia, i risultati della somministrazione di questi prodotti varia tra essere indubbi nella loro efficacia nel risolvere malattie incurabili, fino ad essere, per la maggior parte dei casi, di efficacia nulla, modesta o poco interpretabile. La variabilità dei risultati clinici ottenuti è in parte imputabile agli usi "compassionevoli" di terapie avanzate su singoli pazienti, a protocolli clinici con *bias* insufficientemente controllati o inadeguati dal punto di vista metodologico. Questo aspetto critico emerge anche dalla presente rassegna sulla terapia cellulare per il trattamento dell'ischemia critica degli arti inferiori.

Data la peculiare e complessa natura degli ATMP, le autorità competenti hanno istituito una serie di strumenti regolatori ed iniziative atti a facilitare e ad introdurre flessibilità dei dati da presentare alle autorità a dimostrazione di sicurezza ed efficacia ed al fine dello sviluppo delle terapie avanzate per cercare di contenere ed eliminare inutili costi legati alla produzione, al controllo di qualità ed allo sviluppo non-clinico e clinico di questi prodotti. Uno di questi strumenti è certamente il *risk-based approach* (EMA/CAT/CPWP/686637/2011) che può essere applicato al fine di determinare la quantità dei dati che devono essere presentati alle Autorità Competenti, sia per ottenere l'autorizzazione alla sperimentazione clinica che un'eventuale autorizzazione al commercio. In linea generale, il *risk-based approach* prevede di poter omettere studi e dati di qualità, non clinica e clinica, così come richiesto dalle applicabili linee guida in funzione di una analisi basata sul rischio del prodotto.

La produzione di prodotti di terapia cellulare costituiti da cellule manipolate in modo non sostanziale può essere relativamente semplice e rapida e di conseguenza lo sviluppo di questi prodotti dovrà seguire un approccio *case-by-case* ed adattata al basso rischio derivante dalla

produzione del medicinale rispetto a ATMP che prevedono invece un processo di manifattura molto più complesso ed un conseguente rischio molto più alto. Per questo motivo il CAT, durante la riunione di febbraio 2017 (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Agenda/2017/02/WC500222057.pdf), ha discusso un documento di domande/risposte sull'applicazione del *risk-based approach* degli ATMP manipolati in modo minimo. Il documento, in base a quanto riportato dalle minute della riunione, descriverà con un esempio pratico come utilizzare il *risk-based approach*, al fine di identificare e giustificare potenziali deviazioni dai requisiti standard di produzione e controllo qualità, non clinica e clinica dei prodotti di terapia cellulare manipolati in modo non sostanziale.

Un altro importante strumento regolatorio è rappresentato dalla procedura di certificazione rilasciata dall'EMA. La procedura comporta la valutazione scientifica di dati di qualità e, se disponibili, dati non clinici che sono stati generati in qualsiasi fase del processo di sviluppo di un ATMP. Questa valutazione si prefigge di individuare preventivamente i possibili problemi di sviluppo, affinché questi possano essere affrontati prima della presentazione di un'applicazione di autorizzazione per la commercializzazione e quindi anche di fornire una guida precoce sullo sviluppo del medicinale.

Un'altra iniziativa fondamentale è stata presa dalla Direzione Generale per la Salute e la Sicurezza Alimentare della Commissione Europea, in accordo a quanto prescritto dall'articolo 5 del regolamento (CE) n. 1394/2007 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo ai medicinali per terapie avanzate, il quale impone alla Commissione di elaborare orientamenti sulle buone prassi di fabbricazione (GMP) specifiche dei medicinali per terapie avanzate.

Questa iniziativa deriva da una analisi condotta nel 2014 dalla Commissione Europea stessa sull'impatto del Regolamento 1394/2007CE delle terapie avanzate sul territorio Europeo.

La Commissione (https://ec.europa.eu/health/human-use/advanced-therapies/developments_en) prendeva atto dell'esistenza di due diversi tipi di prodotti per uso autologo. Da un lato cellule/tessuti che venivano trasportati verso una officina farmaceutica per la produzione di prodotti per uso autologo, che venivano poi trasportati nuovamente agli ospedali per la somministrazione al paziente. Dall'altro lato, prodotti costituiti da cellule/tessuti che venivano manipolati all'interno degli ospedali, utilizzando dispositivi medici utili a concentrazione/separazione cellulare, prima della somministrazione agli stessi pazienti, con sensibili abbattimenti dei costi di produzione. Tuttavia, dal punto di vista della Commissione, gli aspetti economici non possono essere presi in considerazione all'interno della valutazione di una adeguata salvaguardia della salute pubblica relativa ad un qualunque prodotto. La Commissione riconosceva però di fondamentale importanza che i requisiti applicabili ai prodotti per uso autologo fossero proporzionati ed adattati alle specifiche caratteristiche dei prodotti stessi.

In seguito a questa analisi, sono state lanciate diverse consultazioni pubbliche, la prima a luglio del 2015, al fine di raccogliere il punto di vista delle parti interessate in merito ai requisiti GMP per la produzione di ATMP. In particolare, la bozza di revisione delle GMP prevedeva un intero capitolo sulla produzione di prodotti costituiti da cellule non manipolate in modo sostanziale (https://ec.europa.eu/health/human-use/advanced-therapies/developments_en) fornendo una guida per l'applicazione del *risk-based approach* per questa specifica tipologia di prodotti. I commenti ricevuti dalle parti interessate ad ogni *step* di sviluppo della linea guida, sono stati presi poi in considerazione dalla Commissione nel tentativo di evitare eventuali ostacoli burocratici nell'applicazione delle GMP per la produzione di ATMP composti da cellule non sottoposte a una rilevante manipolazione.

In conclusione, la produzione di prodotti contenenti cellule manipolate in modo non sostanziale, dal punto di vista produttivo, presentano un rischio basso, ma non assente. Inoltre, cellule utilizzate in un distretto anatomico diverso o per funzioni essenziali diverse nel donatore e nel ricevente ed utilizzate al fine di trattare una patologia, necessitano di alti standard di sviluppo, al fine di garantire un appropriato follow-up dei parametri critici di qualità del medicinale legati alla sua efficacia e sicurezza. Armonizzare questi standard di sviluppo da parte dei produttori, e di valutazione da parte delle Autorità Competenti, su un principio *case-by case* e sul *risk-based approach* centrato sulle

caratteristiche clinico/biologiche uniche dei singoli prodotti al fine di rendere quanto più efficiente possibile lo sviluppo ed interpretabile la sperimentazione clinica di questi prodotti, salvaguardando così anche la salute pubblica, rappresenta una attualissima sfida che siamo tutti chiamati ad affrontare.

Conclusioni

L'analisi primaria degli RCTs sembra fornire una chiara evidenza dell'efficacia della terapia cellulare sugli *endpoints hard* e sugli indicatori surrogati di perfusione e ischemia nei pazienti affetti da ischemia critica degli arti inferiori senza indicazioni alla rivascolarizzazione. Le sotto-analisi per disegno e qualità degli studi mettono tuttavia in discussione la validità di tali risultati, suggerendo che gli studi con bassa qualità possano essere sbilanciati a favore della terapia cellulare. Pertanto, utilizzando un approccio meta-analitico tradizionale, dovremmo concludere che sono necessari più studi RCTs di alta qualità, al fine di confermare o meno la capacità della terapia cellulare di migliorare la prognosi dei pazienti con CLI. Tuttavia, come discusso sopra, ci sono molteplici spiegazioni di tipo non causale per interpretare l'inaspettata inefficacia della terapia cellulare negli studi di qualità maggiore. Pertanto, riteniamo che la comunità scientifica dovrebbe chiedersi se sono necessarie ulteriori evidenze a favore della terapia cellulare o se si possa riconoscere il suo potenziale ruolo nel modificare la storia naturale dell'ischemia critica. In quest'ultimo caso, l'equità di trattamento non potrà essere garantita nei futuri RCTs.

La legislazione Europea appare muoversi nella direzione di una semplificazione dei requisiti, basati sul rischio, per la produzione di prodotti per la terapia cellulare contenenti cellule manipolate in modo non sostanziale per facilitarne la produzione ed evitare inutili e sproporzionati ostacoli burocratici. Tuttavia questo non implica che tali prodotti debbano o possano essere utilizzati indiscriminatamente nella pratica clinica.

Bibliografia

1. Nehler MR, Duval S, Diao L, Annex BH, Hiatt WR, Rogers K, Zakharyan A and Hirsch AT. Epidemiology of peripheral arterial disease and critical limb ischemia in an insured national population. *J Vasc Surg.* 2014;60:686-95 e2.
2. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA and Fowkes FG. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007;45 Suppl S:S5-67.
3. Vartanian SM and Conte MS. Surgical intervention for peripheral arterial disease. *Circ Res.* 2015;116:1614-28.
4. Thukkani AK and Kinlay S. Endovascular intervention for peripheral artery disease. *Circ Res.* 2015;116:1599-613.
5. Egorova NN, Guillerme S, Gelijns A, Morrissey N, Dayal R, McKinsey JF and Nowygrod R. An analysis of the outcomes of a decade of experience with lower extremity revascularization including limb salvage, lengths of stay, and safety. *J Vasc Surg.* 2010;51:878-85, 885 e1.
6. Reinecke H, Unrath M, Freisinger E, Bunzemeier H, Meyborg M, Luders F, Gebauer K, Roeder N, Berger K and Malyar NM. Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence. *Eur Heart J.* 2015;36:932-8.
7. Siegel RL, Miller KD and Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:5-29.
8. Lambert MA and Belch JJ. Medical management of critical limb ischaemia: where do we stand today? *J Intern Med.* 2013;274:295-307.
9. Cooke JP and Chen Z. A compendium on peripheral arterial disease. *Circ Res.* 2015;116:1505-8.
10. Raval Z and Losordo DW. Cell therapy of peripheral arterial disease: from experimental findings to clinical trials. *Circ Res.* 2013;112:1288-302.
11. Peeters Weem SM, Teraa M, de Borst GJ, Verhaar MC and Moll FL. Bone Marrow derived Cell Therapy in Critical Limb Ischemia: A Meta-analysis of Randomized Placebo Controlled Trials. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2015;50:775-83.
12. Liew A, Bhattacharya V, Shaw J and Stansby G. Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Angiology.* 2016;67:444-55.
13. Wang ZX, Li D, Cao JX, Liu YS, Wang M, Zhang XY, Li JL, Wang HB, Liu JL and Xu BL. Efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy in patients with peripheral arterial disease. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21:1183-96.
14. Teraa M, Sprengers RW, van der Graaf Y, Peters CE, Moll FL and Verhaar MC. Autologous bone marrow-derived cell therapy in patients with critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Ann Surg.* 2013;258:922-9.
15. Benoit E, O'Donnell TF and Patel AN. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant.* 2013;22:545-62.
16. Wen Y, Meng L and Gao Q. Autologous bone marrow cell therapy for patients with peripheral arterial disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Expert Opin Biol Ther.* 2011;11:1581-9.
17. Fadini GP, Agostini C and Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis.* 2010;209:10-7.
18. Gyongyosi M, Wojakowski W, Navarese EP and Moya LA. Meta-Analyses of Human Cell-Based Cardiac Regeneration Therapies: Controversies in Meta-Analyses Results on Cardiac Cell-Based Regenerative Studies. *Circ Res.* 2016;118:1254-63.
19. Nowbar AN, Mielewicz M, Karavassilis M, Dehbi HM, Shun-Shin MJ, Jones S, Howard JP, Cole GD and Francis DP. Discrepancies in autologous bone marrow stem cell trials and enhancement of ejection fraction (DAMASCENE): weighted regression and meta-analysis. *BMJ.* 2014;348:g2688.

20. Moyer L. DAMASCENE and Meta-Ecological Research: A Bridge Too Far. *Circ Res.* 2014;115:484-7.
21. Martin-Rendon E. Meta-Analyses of Human Cell-Based Cardiac Regeneration Therapies: What Can Systematic Reviews Tell Us About Cell Therapies for Ischemic Heart Disease? *Circ Res.* 2016;118:1264-72.
22. Gyongyosi M, Wojakowski W, Lemarchand P, Lunde K, Tendera M, Bartunek J, Marban E, Assmus B, Henry TD, Traverse JH, Moyer LA, Surder D, Corti R, Huikuri H, Miettinen J, Wohrle J, Obradovic S, Roncalli J, Malliaras K, Pokushalov E, Romanov A, Kastrup J, Bergmann MW, Atsma DE, Diederichsen A, Edes I, Benedek I, Benedek T, Pejkov H, Nyolczas N, Pavo N, Bergler-Klein J, Pavo IJ, Sylven C, Berti S, Navarese EP and Maurer G. Meta-Analysis of Cell-based CaRdiac stUdiEs (ACCRUE) in patients with acute myocardial infarction based on individual patient data. *Circ Res.* 2015;116:1346-60.
23. Fisher SA, Doree C, Mathur A and Martin-Rendon E. Meta-analysis of cell therapy trials for patients with heart failure. *Circ Res.* 2015;116:1361-77.
24. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotzsche PC, Ioannidis JP, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J and Moher D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *PLoS Med.* 2009;6:e1000100.
25. Begg CB and Mazumdar M. Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics.* 1994;50:1088-101.
26. Powell RJ, Marston WA, Berceli SA, Guzman R, Henry TD, Longcore AT, Stern TP, Watling S and Bartel RL. Cellular therapy with Ixmyelocel-T to treat critical limb ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled RESTORE-CLI trial. *Mol Ther.* 2012;20:1280-6.
27. Szabo GV, Kovesd Z, Cserepes J, Daroczy J, Belkin M and Acsady G. Peripheral blood-derived autologous stem cell therapy for the treatment of patients with late-stage peripheral artery disease-results of the short- and long-term follow-up. *Cytotherapy.* 2013;15:1245-52.
28. Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, Xu J, Wu Q, Zhang Z, Xie B and Chen S. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;92:26-36.
29. Sterne JA, Sutton AJ, Ioannidis JP, Terrin N, Jones DR, Lau J, Carpenter J, Rucker G, Harbord RM, Schmid CH, Tetzlaff J, Deeks JJ, Peters J, Macaskill P, Schwarzer G, Duval S, Altman DG, Moher D and Higgins JP. Recommendations for examining and interpreting funnel plot asymmetry in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ.* 2011;343:d4002.
30. Barc P, Skora J, Pupka A, Turkiewicz D, Dorobisz A, J. G, Tomasiewicz B and Szyber P. Bone-marrow cells in therapy of critical limb ischaemia of lower extremities — own experience. *Acta Angiol.* 2006;12:155-166.
31. Klepanec A, Mistrik M, Altaner C, Valachovicova M, Olejarova I, Slysco R, Balazs T, Urandova T, Hladikova D, Liska B, Tomka J, Vulev I and Madaric J. No difference in intra-arterial and intramuscular delivery of autologous bone marrow cells in patients with advanced critical limb ischemia. *Cell Transplant.* 2012;21:1909-18.
32. Van Tongeren RB, Hamming JF, Fibbe WE, Van Weel V, Frerichs SJ, Stiggelbout AM, Van Bockel JH and Lindeman JH. Intramuscular or combined intramuscular/intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells: a clinical trial in patients with advanced limb ischemia. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2008;49:51-8.
33. Gremmels H, Teraa M, Quax PH, den Ouden K, Fledderus JO and Verhaar MC. Neovascularization capacity of mesenchymal stromal cells from critical limb ischemia patients is equivalent to healthy controls. *Mol Ther.* 2014;22:1960-70.
34. Huang PP, Yang XF, Li SZ, Wen JC, Zhang Y and Han ZC. Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for

- the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb Haemost.* 2007;98:1335-42.
35. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, Saito Y, Uemura S, Suzuki H, Fukumoto S, Yamamoto Y, Onodera R, Teramukai S, Fukushima M and Matsubara H. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J.* 2008;156:1010-8.
 36. Horie T, Onodera R, Akamastu M, Ichikawa Y, Hoshino J, Kaneko E, Iwashita C, Ishida A, Tsukamoto T, Teramukai S, Fukushima M and Kawamura A. Long-term clinical outcomes for patients with lower limb ischemia implanted with G-CSF-mobilized autologous peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis.* 2010;208:461-6.
 37. Onodera R, Teramukai S, Tanaka S, Kojima S, Horie T, Matoba S, Murohara T, Matsubara H and Fukushima M. Bone marrow mononuclear cells versus G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells for treatment of lower limb ASO: pooled analysis for long-term prognosis. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46:278-84.
 38. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T and Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002;360:427-35.
 39. Losordo DW, Kibbe MR, Mendelsohn F, Marston W, Driver VR, Sharafuddin M, Teodorescu V, Wiechmann BN, Thompson C, Kraiss L, Carman T, Dohad S, Huang P, Junge CE, Story K, Weistroffer T, Thorne TM, Millay M, Runyon JP and Schainfeld R. A randomized, controlled pilot study of autologous CD34+ cell therapy for critical limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv.* 2012;5:821-30.
 40. Molavi B, Zafarghandi MR, Aminizadeh E, Hosseini SE, Mirzayi H, Arab L, Baharvand H and Aghdami N. Safety and Efficacy of Repeated Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy in Patients with Critical Limb Ischemia in a Pilot Randomized Controlled Trial. *Arch Iran Med.* 2016;19:388-96.
 41. Huang P, Li S, Han M, Xiao Z, Yang R and Han ZC. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care.* 2005;28:2155-60.
 42. Lu D JY, Liang Z, Li X, Zhang Z and Chen B. Autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on diabetic patients with lower limb ischemia. *Journal of Medical Colleges of PLA.* 2008;23:106-115.
 43. Mohammadzadeh L, Samedanifard SH, Keshavarzi A, Alimoghaddam K, Larijani B, Ghavamzadeh A, Ahmadi AS, Shojaeifard A, Ostadali MR, Sharifi AM, Amini MR, Mahmoudian A, Fakhraei H, Aalaa M and Mohajeri-Tehrani MR. Therapeutic outcomes of transplanting autologous granulocyte colony-stimulating factor-mobilised peripheral mononuclear cells in diabetic patients with critical limb ischaemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013;121:48-53.
 44. Ozturk A, Kucukardali Y, Tangi F, Erikci A, Uzun G, Bashekim C, Sen H, Terekeci H, Narin Y, Ozyurt M, Ozkan S, Sayan O, Rodop O, Nalbant S, Sildiroglu O, Yalniz FF, Senkal IV, Sabuncu H and Oktenli C. Therapeutical potential of autologous peripheral blood mononuclear cell transplantation in patients with type 2 diabetic critical limb ischemia. *J Diabetes Complications.* 2012;26:29-33.
 45. Dubsy M, Jirkovska A, Bem R, Fejfarova V, Pagacova L, Sixta B, Varga M, Langkramer S, Sykova E and Jude EB. Both autologous bone marrow mononuclear cell and peripheral blood progenitor cell therapies similarly improve ischaemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment. *Diabetes Metab Res Rev.* 2013;29:369-76.

46. Giles KA, Rzucidlo EM, Goodney PP, Walsh DB and Powell RJ. Bone marrow aspirate injection for treatment of critical limb ischemia with comparison to patients undergoing high-risk bypass grafts. *J Vasc Surg.* 2015;61:134-7.
47. Smith GD and Egger M. Who benefits from medical interventions? Treating low risk patients can be a high risk strategy. *BMJ.* 1994;308:72-4.
48. Stuck AE, Siu AL, Wieland GD, Adams J and Rubenstein LZ. Comprehensive geriatric assessment: a meta-analysis of controlled trials. *Lancet.* 1993;342:1032-6.
49. Cooke JP and Losordo DW. Modulating the vascular response to limb ischemia: angiogenic and cell therapies. *Circ Res.* 2015;116:1561-78.
50. Sun L, Wu L, Qiao Z, Yu J, Li L, Li S, Liu Q, Hu Y, Xu N and Huang P. Analysis of possible factors relating to prognosis in autologous peripheral blood mononuclear cell transplantation for critical limb ischemia. *Cytotherapy.* 2014;16:1110-6.
51. Fadini GP, Ciciliot S and Albiero M. Concise Review: Perspectives and Clinical Implications of Bone Marrow and Circulating Stem Cell Defects in Diabetes. *Stem Cells.* 2016.
52. Benoit E, O'Donnell TF, Jr., Iafrati MD, Asher E, Bandyk DF, Hallett JW, Lumsden AB, Pearl GJ, Roddy SP, Vijayaraghavan K and Patel AN. The role of amputation as an outcome measure in cellular therapy for critical limb ischemia: implications for clinical trial design. *J Transl Med.* 2011;9:165.
53. Hernandez P, Cortina L, Artaza H, Pol N, Lam RM, Dorticos E, Macias C, Hernandez C, del Valle L, Blanco A, Martinez A and Diaz F. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: a comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. *Atherosclerosis.* 2007;194:e52-6.
54. Celis P, Ferry N, Hystad M, Schussler-Lenz M, Doevendans PA, Flory E, Beuneu C, Reischl I and Salmikangas P. Advanced Therapy Medicinal Products: How to Bring Cell-Based Medicinal Products Successfully to the Market - Report from the CAT-DGTI-GSCN Workshop at the DGTI Annual Meeting 2014. *Transfus Med Hemother.* 2015;42:194-9.

Tabella 1. Sintesi delle caratteristiche cliniche dei pazienti inclusi nella meta-analisi, suddivisi in accordo al tipo di studio di appartenenza.

Caratteristica	Tutti gli studi (n=67)	Trials randomizzati controllati (n=19)	Trials controllati non randomizzati (N=7)	Studi non controllati (N=41)
Numero	2332	837	338	1157
ASO / TAO / ignoto, %	59 / 14 / 27	67 / 3 / 30	62 / 8 / 30	55 / 22 / 23
Età, anni	62.6	65.2	63.4	59.9
Sesso maschile, %	71.9	70.7	72.2	72.9
Ipertensione, %	66.1	77.0	63.0	59.9
Diabete, %	58.3	61.0	60.2	55.6
Dislipidemia, %	54.6	76.5	38.6	45.1
Fumo, %	66.6	64.9	66.9	68.0
Malattia renale cronica, %	20.5	26.4	25.5	9.7
CHD, %	38.9	40.5	38.6	37.5
Precedente rivascolarizzazione, %	50.5	51.2	48.1	50.8
Valori al basale				
ABI	0.49	0.54	0.57	0.47
TcO ₂ , mmHg	26.2	36.1	19.5	23.4
Follow-up, mesi	8.1	6.0	6.8	10.2
Terapie				
Anti-aggreganti, %	66.8	76.2	83.5	50.5
Statine, %	52.9	81.2	25.7	28.9

Tabella 2. Analisi di sensibilità per sottogruppi.

		Amputazione (RR)	Sopravvivenza libera da amputazione (RR)	Morte (RR)	Guarigione completa ulcera (RR)	ABI	TcO₂ (mm Hg)	Scala dolore (0-4)	Pain-free walking distance (m)
Disegno e qualità dello studio	Non randomizzati	0.17 (0.08-0.34)	2.12 (1.48-3.03)	0.77 (0.36-1.64)	3.36 (1.13-9.99)	0.15 (0.08-0.21)	20.8 (16.4-25.2)	-2.12 (-3.64- 0.60)	418.7 (194.3-643.1)
	Randomizzati controllati versus standard di cura	0.47 (0.31-0.71)	1.31 (1.04-1.64)	0.69 (0.26-1.83)	2.05 (1.40-3.02)	0.12 (0.06-0.19)	8.22 (4.27-12.2)	-0.83 (-1.36- 0.30)	178.2 (128.2-228.3)
	Randomizzati controllati versus placebo	0.76 (0.55-1.05)	1.10 (0.95-1.35)	0.85 (0.47-1.54)	1.39 (0.98-1.096)	0.11 (0.06-0.16)	11.6 (2.11-21.1)	-0.63 (-1.24- 0.02)	-71.5 (-183.6-40.6)
	Basso rischio di bias	1.00 (0.64-1.56)	0.99 (0.81-1.21)	0.86 (0.40-1.84)	1.05 (0.61-1.78)	0.09 (-0.05-0.22)	3.7 (-3.0-10.4)	1.00 (-0.09-2.09)	N/A
Via di somministrazione (RCTs)	Intra-muscolare	0.54 (0.39-0.76)	1.22 (1.05-.42)	0.76 (0.32-1.79)	1.59 (1.19-2.13)	0.12 (0.08-0.16)	13.5 (7.2-19.8)	-0.74 (-1.14- 0.33)	N/A
	Intra-arteriosa	0.86 (0.40-1.88)	1.08 (0.75-1.56)	0.85 (0.45-1.60)	1.30 (0.76-2.21)	0.04 (-0.03-0.10)	3.1 (-2.90-9.00)	-0.8 (-1.55- 1.55)	N/A
Tipo di cellule (RCTs)	BM-MNCs	0.68 (0.46-1.01)	1.11 (0.93-1.32)	0.83 (0.46-1.49)	1.66 (1.20-2.29)	0.09 (0.04-0.15)	7.57 (0.68-14.5)	-0.75 (-1.40- 0.09)	N/A
	BM-MSCs	0.43 (0.11-1.72)	1.00 (0.63-1.57)	5.00 (0.27-92.6)	1.42 (0.82-2.46)	0.14 (0.08-0.20)	21.8 (16.2-27.4)	-0.59 (-1.43- 0.24)	173.5 (121.1-225.9)
	PB-MNCs	0.42 (0.23-	1.62 (1.11-	0.91 (0.12-	3.22 (0.57-	0.11 (0.02-	12.0 (4.2-19.8)	-0.85 (-1.50- -	N/A

		0.78)	2.34)	6.74)	18.2)	0.21)		0.36)	
Follow-up	≤3 mesi	0.49 (0.30- 0.79)	1.15 (0.96- 1.38)	3.30 (0.14- 76.5)	1.91 (1.30- 2.81)	0.09 (0.05- 0.14)	7.14 (2.12- 12.16)	-0.95 (-1.48- - 0.41)	178.24 (128.19- 228.29)
	6-9 mesi	0.82 (0.55- 1.20)	1.13 (0.94- 1.36)	0.85 (0.48- 1.53)	1.47 (0.99- 2.19)	0.11 (0.06- 0.17)	14.24 (4.05- 24.44)	-0.57 (-1.38- 0,23)	-71.50 (-183.64- 40.63)
	≥12 mesi	0.56 (0.34- 0.91)	2.31 (1.05- 5.05)	0.53 (0.18- 1.61)	1.75 (0.20- 15.4)	0.15 (-0.07- 0.37)	10.10 (0.39- 19.81)	-0.35 (- 1.43, 0.73)	93.73 (-30.05- 217.51)
Analisi	Random (RCTs)	0.63 (0.49- 0.82)	1.18 (1.04- 1.35)	0.80 (0.48- 1.33)	1.59 (1.19- 2.13)	0.11 (0.07- 0.15)	10.7 (4.9- 16.6)	-0.74 (- 1.12- - 0.36)	97.3 (- 30.1- 217.5)
	Fixed (RCTs)	0.58 (0.45- 0.75)	1.21 (1.10- 1.33)	0.81 (0.50- 1.32)	1.73 (1.39- 2.16)	0.10 (0.08- 0.12)	11.7 (9.12- 14.2)	-0.76 (- 0.9- - 0.62)	123.7 (79.4- 168.0)

Figura 1. Risultati dell'analisi primaria (RCTs) sull'endpoint primario I rischi relativi e gli intervalli di confidenza al 95% sono riportati in ascissa.

Analisi primaria: amputazione

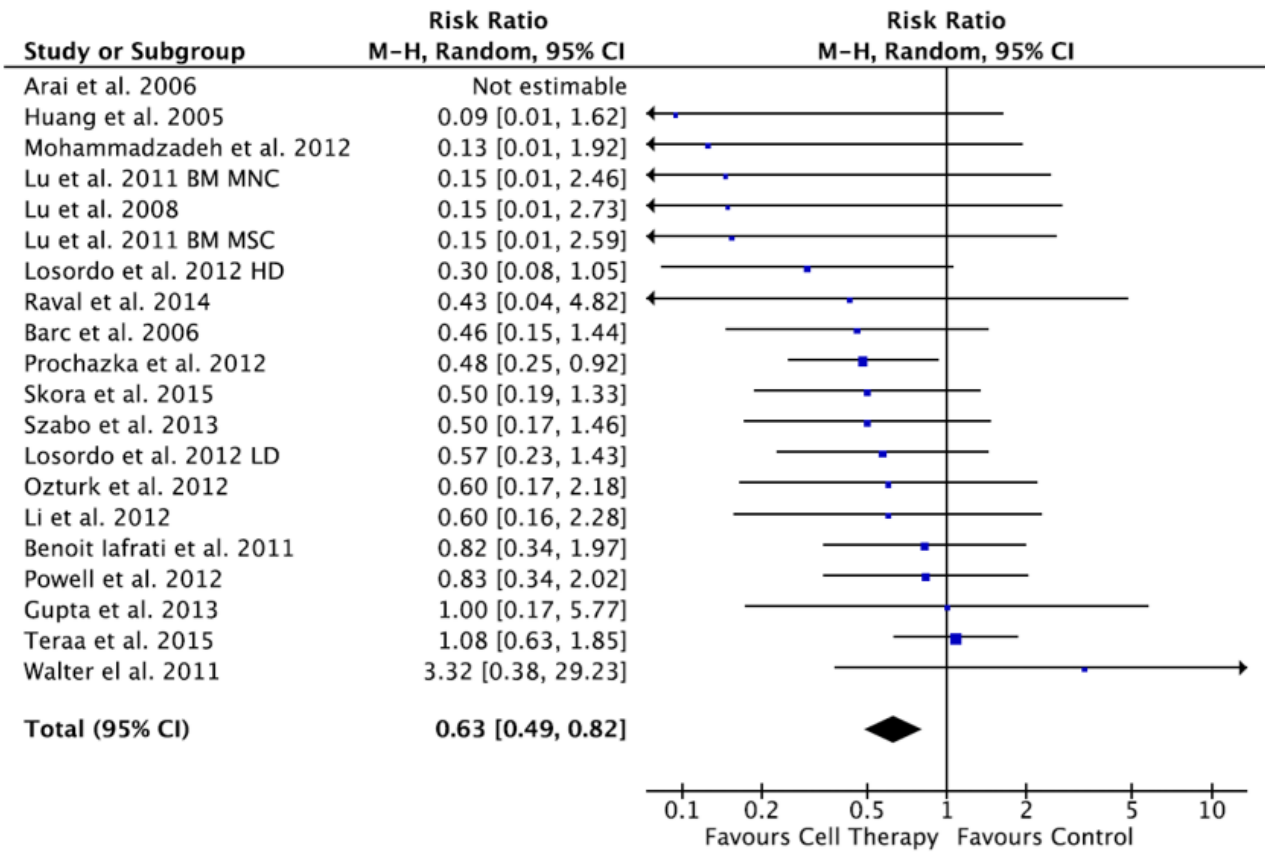


Figure 2. Sotto-analisi per disegno e qualità degli studi. È riportato il grafico dei rischi relativi (RR, 95% C.I.) per amputazione.

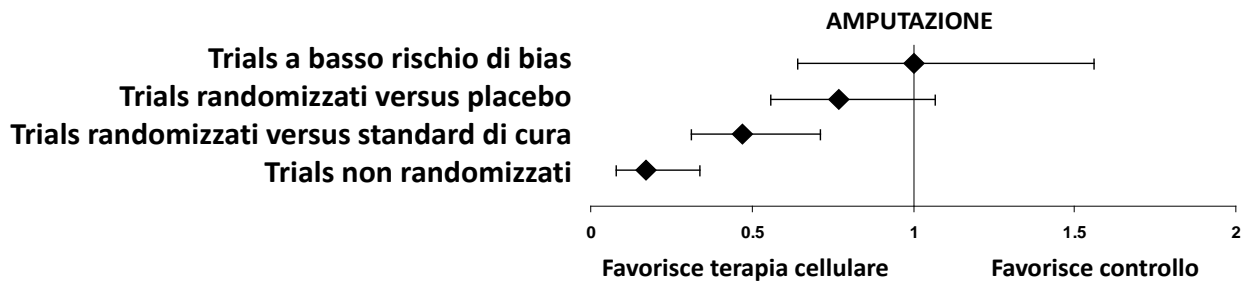


Figura 3. Analisi di meta-regressione endpoint primario (amputazioni) versus prevalenza del diabete in ciascun trial.

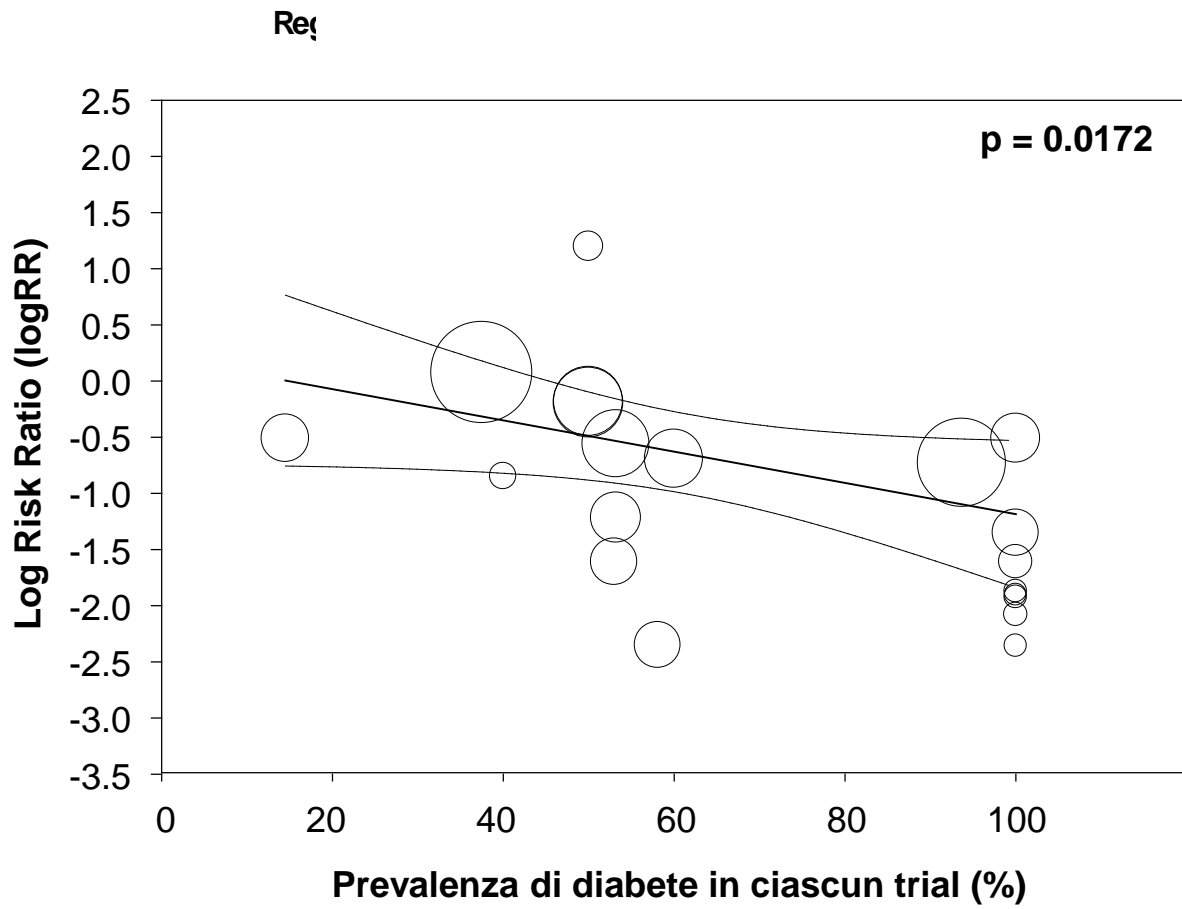


Figura 4. Eventi avversi nei trials di terapia cellulare riportati in accordo con la classificazione MedDRA. NSAE, eventi avversi non severi. SAE, eventi avversi severi. PAD, arteriopatia periferica.

