

TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE DEL SANGUE PLACENTARE

LA REALTÀ DELL'OGGI, LE PROSPETTIVE DEL FUTURO

di Franco Locatelli*

La riflessione sull'utilizzo terapeutico delle cellule staminali si svolge troppo spesso solo tra opinion leader schierati più o meno ideologicamente. E anche chi riesce a tagliare nuovi traguardi, in questo caso l'amplificazione e il trapianto di cellule staminali emopoietiche del sangue placentare per curare la talassemia, si trova al centro di un dibattito in cui gli aspetti scientifici del problema sono sopraffatti da schemi precostituiti. In questo contributo, i risultati ottenuti e la lunga esperienza a contatto con la sofferenza di bambini e genitori sono il punto di partenza per illustrare lo stato attuale e le prospettive della ricerca sulle staminali cordonali: per essere più consapevoli delle tematiche presenti alla frontiera della scienza.

Per anni considerata materiale di scarto (dopo aver ottemperato al ruolo fondamentale di struttura di nutrimento indispensabile per un corretto e completo sviluppo embrionale e fetale), o al più impiegabile per preparazioni cosmetiche di dubbia efficacia, la placenta, e in particolare il sangue contenuto nel cordone ombelicale, hanno recentemente trovato straordinaria valorizzazione come sorgente di *cellule staminali emopoietiche* (CSE) da impiegarsi per scopi trapiantologici. Il sangue placentare, infatti, contiene un elevato numero di cellule emopoietiche e, in particolare, una quota di progenitori emopoietici immaturi più elevata rispetto al midollo osseo. Numerosi studi hanno anche documentato come la capacità «staminale» delle CSE cordonali possa essere superiore a quella delle corrispondenti cellule midollari testimoniata anche dal fatto che trapiantando in modelli murini (topi NOD-SCID)¹ uguali quantità di CSE ottenute da sangue cordonale o da midollo osseo, si osserva un attecchimento preferenziale o, addirittura, esclusivo delle prime. Storicamente, per circa vent'anni dalla prima realizzazione di una procedura trapiantologica coronata da successo, il midollo osseo ha

*Oncoematologia Pediatrica,
IRCCS Policlinico San
Matteo, Pavia.

¹ *Non Obese Diabetic – Severe Combined Immuno Deficiency*; si tratta di topi diabetici non obesi, affetti da una grave forma di immunodeficienza.

rappresentato l'unica sorgente di CSE da impiegarsi, sia in soggetti adulti, sia in soggetti pediatrici, per il trattamento di numerose malattie ematologiche maligne e non neoplastiche. Nella ricerca di fonti alternative di CSE utilizzabili per il trapianto allogenico², il 1988 rappresenta una tappa fondamentale nella storia della trapiantologia, in quanto, nell'ottobre di quell'anno, Eliane Gluckman, a Parigi, trapiantò con successo un bambino affetto da anemia di Fanconi, patologia ereditaria autosomica recessiva pressoché invariabilmente fatale entro la seconda decade di vita, utilizzando il sangue prelevato alla nascita dai vasi del cordone ombelicale di un fratello germano sano, oltre che HLA-identico (*Human Leukocyte Antigen* - HLA), con il paziente.



La guarigione di quel paziente e i favorevoli risultati clinici dei primi trapianti effettuati con il sangue placentare ottenuto da un donatore familiare hanno, in seguito, portato alla realizzazione di trapianti di sangue placentare da donatore non consanguineo e stimolato la nascita e un largo sviluppo di numerosi centri di raccolta, manipolazione e criopreservazione (banche) del sangue placentare per il trapianto tra soggetti non consanguinei, con ciò promovendosi e venendosi a configurare una condizione che risponde, eticamente, ai più nobili programmi di biosolidarietà umana. La raccolta di sangue cordonale alla nascita non comporta alcun rischio o detrimento per il neonato, né, tantomeno, per la madre e, tra i vantaggi offerti da questi programmi di raccolta e criopreservazione del sangue placentare, vi sono l'immediata disponibilità delle CSE e la possibilità di raccogliere il sangue placentare presso gruppi etnici poco rappresentati nei registri dei donatori di midollo.

Attualmente sono attivi, a livello internazionale, più di 30 programmi di raccolta e criopreservazione del sangue placentare basati su rigorosi criteri che garantiscono la qualità del prodotto per uso clinico ed è stimabile che più di 200.000 unità di sangue placentare, criopreservate con completa caratterizzazione immunogenetica (cioè riferita alla tipizzazione del maggior sistema immunogenetico umano, il sistema HLA, *Human Leukocyte Antigen*) e del contenuto cellulare siano disponibili per trapianti da donatore non consanguineo. Si può, quindi, senza dubbio, affermare che trapianti di sangue cordonale, sia da donatore familiare, ma ancor più numericamente da donatore non consanguineo, sono entrati nella pratica clinica corrente per il trattamento di pazienti pediatrici affetti da malattie ematologiche maligne o non neoplastiche, immunodeficienze congenite e, più raramente, da tumori solidi.

² ossia da donatore compatibile, in genere un familiare.

Le prerogative immunobiologiche

Indubbi vantaggi, ottenibili attraverso il *trapianto di sangue di cordone ombelicale* (TSCO), ineriscono fra gli altri, oltre che alla già ricordata immediata disponibilità dei progenitori emopoietici, a un basso rischio di contaminazione virale del materiale trapiantato (per esempio *Cytomegalovirus*, virus di Epstein Barr, eccetera) e, soprattutto, a una ridotta incidenza e severità della malattia del trapianto contro l'ospite (*Graft-Versus-Host Disease*, GVHD).

Vantaggi associati al trapianto di sangue placentare rispetto al trapianto di midollo osseo

Per il ricevente

Pronta disponibilità
Assenza di rischio di rifiuto alla donazione
Riduzione nell'incidenza e severità dalla malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD)
Possibilità d'impiegare donatori con 1-2 disparità per antigeni del sistema HLA
Basso rischio di trasmettere infezioni virali (EBV, HCMV) con l'infusione delle cellule cordonali criopreservate.

Per il donatore

Sicurezza nella raccolta di cellule staminali emopoietiche, senza i rischi (inverso minimi) correlati alla procedura anestesiológica richiesta per l'espianto di midollo osseo.
Minor rischio di problemi psicologici correlati alla figura del donatore minore nell'eventualità in cui il trapianto non abbia successo.

Teorici svantaggi associati al trapianto di sangue placentare rispetto al trapianto di midollo osseo

Per il ricevente

Aumentato rischio di mancato attecchimento
Impiego *routine* solo nei pazienti con un peso corporeo di 40-50 Kg
Ritardo nella cinetica di ricostituzione granulocitaria e piastrinica
Mancato trasferimento di B- e T-linfociti dotati di memoria immunologica
Rischio teorico di trasmettere malattie ereditarie trasferibili con il trapianto di cellule emopoietiche

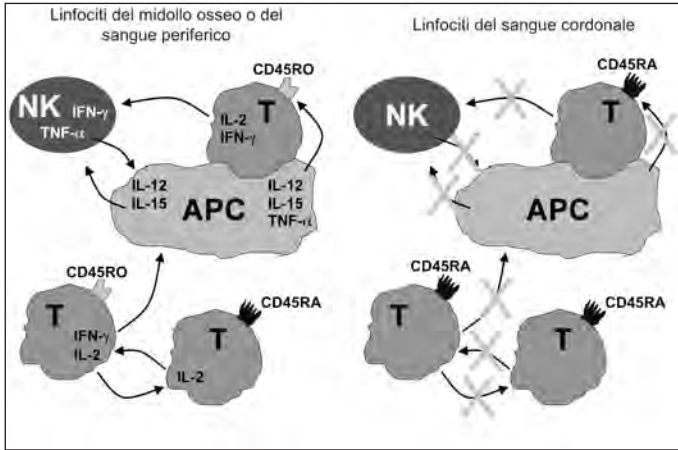
Per il donatore

Problemi etici legati alla donazione (i.e., bambini concepiti solo per donare cellule staminali cordonali, più facilmente ottenibili e più rapidamente impiegabili rispetto a cellule staminali midollari).

Questa complicazione si verifica quando le cellule immunocompetenti (i linfociti) del donatore aggrediscono l'organismo del ricevente ed è associata a una rilevante morbilità, così come a un aumento del rischio di mortalità peri-trapiantologica per il paziente.

La ridotta incidenza e severità della GVHD dopo TSCO è motivata da caratteristiche immunologiche d'immaturità riferibile alla scarsa o assente pregressa esperienza antigenica dei linfociti del sangue cordonale, così come dalle interazioni materno-fetali tollerogeniche intercorse durante la gravidanza.

In particolare, i linfociti T di sangue placentare sono fenotipicamen-



te e funzionalmente immaturi avendo avuto un'esposizione ridotta o assente ad antigeni durante la vita intrauterina e la loro capacità citotossica in risposta alla stimolazione con antigeni è minore rispetto a quella mediata dai linfociti T di sangue adulto. Anche le stesse cellule presentanti l'antigene (*antigen presenting cell* - APC), nella loro espressione più efficace d'induzione di una risposta immunitaria cioè le cellule dendritiche (*dendritic cell* - DC), presentano caratteristiche

Patogenesi della GVHD

Tutte le cellule implicate nello sviluppo di GVHD offrono vantaggi in termini di riduzione del rischio di questa complicanza se derivate dal sangue cordonale. Le cellule dendritiche (APC, *antigen presenting cells*) presentano caratteristiche di immaturità e secernono ridotte quantità di citochine pro-infiammatorie, interleuchina 12 (IL-12), interleuchina 15 (IL-15).

Le cellule T-linfocitarie hanno un fenotipo tipico degli elementi immaturi (come testimoniato dall'espressione preferenziale dell'isoforma RA della molecola CD45) e producono ridotte quantità di interleuchina 2 (IL-2) e interferon gamma (IFN- γ).

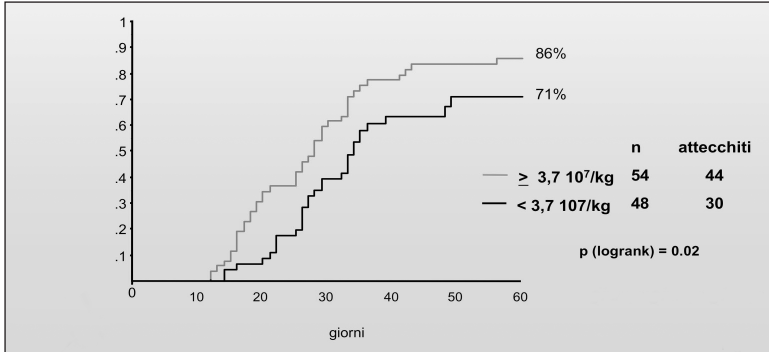
Anche l'attivazione delle cellule NK è meno efficiente nel sangue placentare.

più favorevoli in termini di riduzione del rischio di sviluppare GVHD, essendo meno efficienti nella produzione di citochine che polarizzano la risposta in senso infiammatorio e mostrando caratteristiche fenotipiche d'immaturità.

La ridotta reattività immunologica dei linfociti del sangue placentare, oltre ad associarsi, come già ricordato, a una riduzione del rischio di GVHD nelle sue forme acuta e cronica, incontrovertibilmente documentata da rigorosi studi comparativi con pazienti con analoghe caratteristiche cliniche sottoposti a trapianto di progenitori emopoietici midollari, offre, altresì, la possibilità di effettuare il TSCO anche in assenza di completa identità per il sistema HLA fra donatore e ricevente. Larga parte dei TSCO a oggi realizzati si sono fondati sull'impiego di donatori che differivano per uno o anche per due antigeni del sistema HLA, ciò incrementando rilevantemente la possibilità di avviare al trapianto di CSE soggetti (come quelli già precedentemente citati appartenenti a gruppi etnici poco rappresentati nei registri dei donatori di midollo) per i quali, a causa di una costituzione immunogenetica rara, risulta difficile identificare un donatore compatibile.

Il limite applicativo nel trapianto di sangue placentare e i risultati clinici a oggi ottenuti

Si è d'innanzi accennato a un largo uso di progenitori emopoietici del sangue placentare in pazienti pediatriche o, comunque, con peso corporeo non superiore ai 40-50 kg. Quest'impiego preferenziale del TSCO in età pediatrica non stupisce, essendo, a oggi, il limite applicativo del trapianto di CSE del sangue placentare costituito dal numero finito (mediamente compreso tra 8×10^8 e $1,5 \times 10^9$) di cellule,



Trapianto di sangue cordonale in pazienti con leucemia acuta

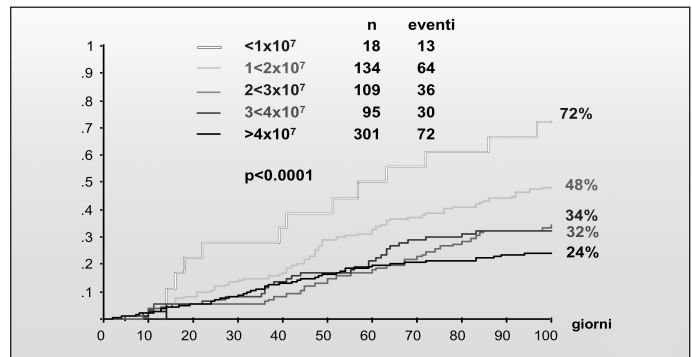
Probabilità cumulativa recupero granulocitario post-trapianto in funzione del numero di cellule cordonali trapiantate. Pazienti che hanno ricevuto un numero più elevato di cellule cordonali beneficiano di una miglior probabilità di attecchimento e di un più veloce recupero di conte granulocitarie protettive rispetto a rischi infettivi (dati provenienti dal registro Eurocord).

progenitori emopoietici e cellule facilitanti l'attecchimento, disponibili in un'unità di sangue cordonale. Questa quantità finita di progenitori del sangue placentare condiziona, in particolare per soggetti di peso corporeo superiore ai 40-50 kg, sia una riduzione della probabilità di attecchimento delle CSE del donatore, sia un allungamento dei tempi di recupero granulocitario e piastrinico post-trapianto. Vi è chiara evidenza che la velocità di recupero emopoietico e la probabilità di attecchimento dell'emopoiesi del donatore correlano direttamente con il numero di cellule infuse.

È stato, inoltre, inequivocabilmente documentato che il successo del trapianto di sangue placentare è strettamente dipendente dal numero di cellule infuse per chilogrammo di peso corporeo del paziente, tanto migliori essendo i

risultati quanto più elevato è il numero delle cellule cordonali infuse. Esplicitata questa limitazione a un più diffuso impiego del sangue cordonale anche in soggetti adulti, non sorprende che differenti strategie di ricerca clinica traslazionale siano state ipotizzate per superare questi vincoli applicativi del trapianto di sangue placentare. Fra esse vi sono: l'espansione *in vitro* delle CSE, identificate attraverso l'espressione della molecola CD34+ sulla superficie delle cellule presenti nel sangue placentare; l'infusione di due differenti unità di sangue cordonale in uno stesso paziente.

Dati preliminari, recentemente pubblicati, hanno suggerito che il trapianto di due differenti unità di sangue placentare in pazienti adulti è in grado di migliorare significativamente l'esito del trapianto, riducendo il rischio di mortalità trapianto-correlata. La strategia di trapiantare due differenti unità poggia, tuttavia, la sua potenzialità



Incidenza cumulativa di mortalità trapianto-correlata in funzione del numero di cellule infuse per kg di peso corporeo del paziente

Dal grafico si evince come il rischio di morte nei primi 100 giorni del trapianto sia inversamente proporzionale al numero di cellule infuse (dati provenienti dal registro Eurocord).

realizzativa sulla necessità di identificare, per ogni singolo paziente, due donatori di sangue placentare utilmente impiegabili in termini di compatibilità immunogenetica fra loro e con il ricevente.

Concettualmente più intrigante, e di più larga applicabilità in linea di principio, è la strategia di procedere all'espansione *in vitro* dei progenitori emopoietici del sangue placentare. Numerosi gruppi di ricerca si sono dedicati all'identificazione delle migliori condizioni sperimentali per ottenere un'ottimale espansione delle CSE CD34+.

Recentemente, il nostro gruppo di ricerca ha realizzato un trapianto di cellule del sangue placentare espanso *in vitro*, infuse in un ricevente familiare HLA-identico, ottenendo, per la prima volta, la dimostrazione che, non solo è possibile moltiplicare il numero delle CSE in laboratorio, ma che i progenitori espansi sono funzionalmente attivi e in grado di contribuire al ripopolamento emopoietico, riducendo significativamente i tempi di recupero granulocitario e piastrinico post-trapianto. Questa esperienza, con la prova di principio che si è ottenuta, apre, dunque, rilevanti spiragli applicativi per estendere «routinariamente» l'uso del trapianto di CSE del sangue placentare a soggetti adulti o ad adolescenti con peso corporeo superiore ai 40-50 kg.

Numerosi studi hanno chiaramente dimostrato che, in pazienti pediatriche, il TSCO è in grado di fornire risultati equivalenti a quelli ottenibili con il trapianto di CSE midollari, sia nell'ambito dei trapianti da donatore familiare, sia nel contesto dei trapianti da donatore non consanguineo. In alcune situazioni particolari, quali quelle che ineriscono ai pazienti con emoglobinopatia (talassemia o anemia a cellule falciformi), il trapianto di CSE cordonali da donatore familiare HLA-compatibile si è dimostrato addirittura essere gravato da minori rischi di mortalità trapianto-correlata, soprattutto grazie alla riduzione della morbilità connessa allo sviluppo di quadri di GVHD acuta o cronica.

Per i pazienti pediatriche, quindi, il TSCO da donatore non consanguineo rappresenta una valida opzione terapeutica in assenza di un donatore familiare HLA-compatibile, il cui impiego affianca e completa la possibilità di realizzare trapianti attraverso donatori non consanguinei di sangue midollare o di cellule staminali emopoietiche raccolte nel sangue periferico dopo opportune procedure di mobilizzazione.

Sebbene il numero di pazienti adulti trapiantati con CSE cordonali sia pari a circa un terzo di quello relativo a pazienti pediatriche, indiscutibilmente, negli ultimi anni, si è fatto più largo uso del TSCO anche in pazienti adulti, privilegiando, ovviamente, l'impiego di unità a più ricco contenuto cellulare.



Perché alla tecnica si affianchi sempre l'attenzione all'uomo

Gli straordinari risultati ottenuti con il TSCO in molte malattie genetiche costituiscono attrattiva di indubbio fascino per coppie con figli affetti da patologie curabili con il trapianto di CSE, potendoli indurre a considerare l'opportunità di avere un nuovo figlio nella prospettiva che egli possa rappresentare un donatore utilmente impiegabile per la guarigione del germano malato. È, allora, immediata la riflessione bioetica che ne inerisce, vale a dire che su un piano affettivo tutt'altro che trascurabile è la considerazione che i genitori non dovranno desiderare il nuovo bambino solo in quanto «donatore» e, perciò, potenzialmente, salvavita di un precedente-nato, ma dovranno saperlo accettare, a tutti gli effetti, come un figlio comunque voluto e, perciò, altrettanto amato, pena lo svilimento della dignità individuale della singola persona. Quest'aspetto etico-bioetico è d'importanza predominante sullo scenario familiare della programmazione della nascita di un «nuovo» bambino «anche» come donatore (con un 25% di potenzialità realizzativa): si vuol dire che esso non dovrà mai essere considerato in famiglia soltanto, né prevalentemente, in questa sua configurazione, la quale, se mai, potrebbe fargli attribuire, nel contesto degli affetti, una sorta di «valore aggiunto». Siamo di fronte a un'esigenza etica preliminare e permissiva a qualsiasi progetto di concepimento di un nuovo figlio anche come donatore. Mettere al mondo naturalmente un bambino perché sia, prima di tutto, amato e rispettato e poi anche, magari, particolarmente benvenuto, quale portatore di un valore aggiunto: quello (ed è forse poco?) di «salva-vita» di un fratellino a serio rischio di vivere male o di morire significa, crediamo, operare secondo solidarietà etica per la vita.

Ma, rispetto alla programmazione di un nascituro donatore basata sulla speranza, la prospettiva d'impiego negli ultimi anni si è arricchita di un elemento nuovo che - se preso in programmazione applicativa - porta dal 25% delle possibilità di ottenere un donatore di CSE da una gravidanza fondata su questa speranza, al 100% di ottenerlo. La tecnica della fecondazione *in vitro* con selezione genetica di un embrione da impiantare che sia, nel caso di malattia genetica, oltre che sano (o non malato) anche HLA-compatibile con il candidato-ricevente, ottempera allo scopo e già alcune prime applicazioni cliniche sono state riportate. L'innovazione è certamente rilevante, ma la selezione dell'embrione HLA-compatibile e non malato comporta lo scarto d'altri embrioni (altrettanto non-malati), solo perché non HLA-compatibili con il candidato ricevente. Non vi è chi non veda profilarsi una problematica bioetica conflittuale e drammatica in connessione diretta con convinzioni, certo anche morali, religiose

e filosofiche oltre che scientifiche, sul momento in cui l'essere umano prende vita come un individuo. Ridotta alla sua problematicità etica-bioetica essenziale, «la diagnosi genetica preimpianto di compatibilità per il sistema HLA» con la selezione su questa base di un embrione programmato come donatore di CSE pone a confronto, sui piatti della bilancia, l'auspicato salvamento di una vita (al massimo delle sue possibilità di riuscita) rispetto allo scarto di alcuni altri embrioni (non «utilizzabili» ai fini del trapianto) e suscita perciò un'ottica di giudizio critica, anche, ma non solo, alla luce della legalizzata non-praticabilità di essa nel nostro Paese.

Una volta di più, la medicina offre nella sua dinamica evolutiva elementi meritevoli di attenta riflessione perché, a un tecnicismo sempre più sofisticato, si accoppi un'attenzione bioetica che veda l'interesse dell'uomo sempre al centro della scena.

Accostarsi, comunque, con sensibilità e rispetto a chi vede soffrire o, addirittura, morire un proprio figlio e, in questa prospettiva, ipotizza soluzioni estreme, quali quelle che indubbiamente ineriscono alla selezione genetica pre-impianto per compatibilità HLA, certamente contribuirà a rasserenare la riflessione e il confronto su tematiche così impegnative.



Uno sguardo al futuro

Alla luce di quanto sopra riportato, non vi sono dubbi che una nuova stagione ricca di promesse cliniche inerenti l'impiego trapiantologico del sangue cordonale sia nata.

Gli anni a venire potranno, addirittura, vedere il sangue cordonale come sorgente di cellule staminali particolarmente immature e, dunque, dotate di pluripotenzialità differenziativa, da impiegarsi in approcci di terapia cellulare riparativa o rigenerativa per patologie non solo di interesse ematologico. v