

LA CELLULA STAMINALE

*Lezioni di Immunoematologia
per Biotecnologie Mediche*

a cura di
Francesco Zinno

Prefazione di Giancarlo Isacchi



Copyright © MMIX
ARACNE editrice S.r.l.

www.aracneeditrice.it
info@aracneeditrice.it

via Raffaele Garofalo, 133 A/B
00173 Roma
(06) 93781065

ISBN 978-88-548-2275-7

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,
di riproduzione e di adattamento anche parziale,
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: gennaio 2009

<i>Prefazione</i>	11
Capitolo 1. La cellula staminale	15
Introduzione	15
La biologia della cellula staminale.....	18
Cellule staminali embrionale.....	18
Cellule staminali adulte	19
Fonti delle cellule staminali	20
Midollo osseo	20
Sangue periferico.....	30
Sangue placentare.....	32
Capitolo 2. La raccolta delle cellule staminali emopoietiche ..	35
Introduzione	35
Cellule staminali emopoietiche da midollo osseo.....	36
Espianto di midollo osseo.....	36
Rischi della procedura	38
Cellule staminali emopoietiche da sangue periferico	38
Mobilizzazione delle cellule staminali	41
Raccolta di CSE mediante aferesi	44
Target di raccolta	48
Rischi della procedura	50
Raccolta di cellule staminali emopoietiche da sangue placentare	51
Aspetti medico–legali della raccolta di cellule staminali.....	52
Donazione di cellule da midollo osseo e da sangue periferico	52
Donazione di sangue di cordone ombelicale	52

Capitolo 3. La manipolazione cellulare	57
Introduzione	57
Il laboratorio di manipolazione cellulare.....	58
Dotazioni minime.....	59
Dotazioni raccomandate.....	60
Dotazioni ottimali	60
Personale	60
Indicatori di qualità	62
Accreditamenti e certificazioni	63
Certificazione ISO	63
Accreditamento GMP	63
Accreditamento AABB.....	64
Accreditamento FACT	64
Caratterizzazione delle unità di cellule staminali	64
Manipolazione cellulare	69
Filtrazione	71
Eritrodeplezione	73
Deplasmazione	77
Selezione cellulare	78
Criopreservazione	85
Scongelamento	88
Aspetti normativi	91
 Capitolo 4. Il trapianto di cellule staminali emopoietiche	 93
Introduzione	93
Indicazioni al trapianto	94
Selezione del donatore	94
Regime di condizionamento pre-trapianto.....	95
Infusione cellule staminali.....	97
Decorso e trattamento post-trapianto	97
Complicanze acute	97
Mucosite	97
Cistite emorragica.....	98
GvHD	100

GvHD acuta.....	100
Rigetto del trapianto di cellule staminali.....	104
Basi cellulari del rigetto	105
Fattori di rischio per il rigetto	106
Alloimmunizzazione trasfusionale.....	107
Condizionamenti ad intensità ridotta	107
Numero di cellule T nell'inoculo	108
Numero di cellule staminali nell'inoculo.....	108
Infezioni.....	109
La polmonite	111
Complicanze tardive nel post-trapianto	114
GvHD cronica	114
Clinica e stadiazione della GvHD cronica	115
Tumori secondari	117
Disfunzioni endocrinologiche	119
Problemi e prospettive del trapianto di cellule staminali.....	121
Capitolo 5. Nuove applicazioni delle cellule staminali	123
<i>Indice analitico</i>	<i>127</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>133</i>

Capitolo 1

La cellula staminale

ANTONELLA ISGRÒ

Introduzione

Si può definire staminale “una cellula che si divide (di solito raramente) dando origine a due cellule diverse tra loro: una cellula figlia è uguale alla cellula madre (staminale) mentre l'altra cellula figlia è diversa (progenitore) e, anche se può dividersi numerose volte, non può più farlo indefinitamente (perdita della staminalità) e prima o poi tutta la sua progenie differenzierà in un solo tipo (cellula staminale unipotente) o in diversi tipi (cellula staminale multipotente) di cellule differenziate”.

In base alle conoscenze attuali, le cellule staminali vengono divise in due gruppi: cellule staminali embrionali e cellule staminali adulte.

Questa definizione è imprecisa perché tra le cellule staminali adulte sono comprese quelle fetali, presenti negli abbozzi degli organi, quelle neonatali, isolabili dal cordone ombelicale e quelle propriamente adulte, presenti in molti gli organi del nostro organismo.

Una cronologia degli sviluppi e delle ricerche sulle cellule staminali può aiutare a meglio inquadrare tutte le problematiche, scientifiche, etiche e legali, legate alla loro derivazione ed al loro impiego. Si deve al lavoro di ricercatori canadesi della McGill University (Montreal, Quebec, Canada), nel corso degli anni Cinquanta dell'ultimo secolo, la prova della loro esistenza.

Sin dagli inizi degli anni Cinquanta si era teorizzata la loro presenza in base al concetto di “stato dinamico dei costituenti del corpo”, concetto già presente in Eraclito (V secolo avanti Cristo). Negli anni

Trenta e Quaranta viene sviluppata la tecnica di autoradiografia, grazie alla quale è possibile introdurre nello studio delle cellule e dei tessuti, sino ad allora studiati nelle loro relazioni architettoniche nelle tre direzioni spaziali, la dimensione tempo. Charles Leblond ed i suoi collaboratori (H. Cheng, W. Chang, J. Marques Pereira, B. Messier, J. Nadler) rivelano così la dinamica della assunzione e lo spostamento tra diversi tipi cellulari di sostanze (normalmente presenti nelle cellule) marcate con elementi chimici capaci di emettere elettroni (ad esempio isotopi radioattivi di idrogeno, zolfo, carbonio). Dimostrano in tal modo che le cellule alla base dei villi intestinali sono capaci di dividersi in maniera asimmetrica, come si era ipotizzato, e che si tratta di cellule staminali; successivamente, Leblond ne dimostra l'esistenza anche nel testicolo.

Ai lavori della scuola canadese seguono una serie di contributi della comunità scientifica che dimostrano l'esistenza di cellule staminali in tutti i diversi compartimenti anatomici ed a partire da questi anni, comincia un lento susseguirsi di tanti piccoli avanzamenti delle conoscenze che, come è tipico nell'impresa scientifica, in breve tempo permettono applicazioni terapeutiche oggi ben consolidate (trapianti di midollo osseo, pelle artificiale, cornea), altre, in via di definizione (Parkinson, infarto, diabete) o del tutto sperimentali (stroke spinali, Alzheimer, sclerosi amiotrofiche).

Negli anni Sessanta, R. Cole, R.G. Edwards e J. Paul (1964 e 1966) alla Glasgow University (UK) isolano la prima colonia di cellule staminali embrionali (immortali) da blastocisti di coniglio e R.L. Gardner (1968) dimostra la capacità differenziativa di una singola cellula staminale embrionale nel topo.

Nella decade successiva, M.J. Evans (1972) isola e caratterizza cellule staminali di topo, mentre R.A. Fleischman e B. Mintz (1979) innestano nelle placente di topi immunosoppressi, staminali ematopoietiche embrionali e curano un'anemia geneticamente determinata. Negli anni Ottanta M. J. Evans e M. H. Kaufman (1981) isolano e stabiliscono la prima linea cellulare di cellule staminali embrionali nel topo e S. Fishel (1984) ottiene le prime cellule staminali embrionali umane. Gli anni Novanta vedono molti avanzamenti: A.M. Wobus (1991 e 1995) ottiene cellule del cuore da cellule staminali embrionali di topo e E.Y. Snyder (1992) dimostra che staminali neuronali embrionali so-

no trapiantabili ed attecchiscono nel cervelletto di topo. Ancora, S. Weiss (1992) isola cellule staminali neuronali dal cervello di topi adulti mentre S. Okabe (1996) differenzia diversi tipi di cellule nervose da cellule staminali embrionali di topo.

Le prime linee cellulari di staminali embrionali umane (3 maschili e 2 femminili) e di scimmie macache vengono allestite da J. A. Thompson (1998) mentre M.J. Shablott (1998) ottiene le prime linee di cellule staminali germinali umane. Agli inizi del nuovo secolo (2000) S.H. Lee produce neuroni dopaminergici da cellule staminali di topo mentre A. Vescovi e G. Cossu transdifferenziano cellule staminali neuronali in cellule del sangue e del muscolo.

Nell'anno 2001, N. Lumelsky ottiene cellule secernenti insulina da staminali di topo e diversi gruppi scandinavi confermano che il trapianto di staminali neuronali, derivate da feti abortiti, sono efficaci nel trattamento del Parkinson (487 fino ad oggi); D. Orlic impiega staminali del midollo osseo per rigenerare cuori umani infartuati; Y. Jiang (2002) dimostra che cellule staminali del midollo osseo possono formare diversi tipi di tessuto confermando il dato di D. Krause che, nei topi, con una singola cellula staminale del midollo osseo è possibile ripopolare tutti i distretti anatomici; K. Hubner, H. Scholer e M. Boiani (2003) producono cellule germinali (oociti) da staminali embrionali di topo.

Nell'anno 2004 T. Barberi, del Memorial Sloan Kettering di New York, ottiene milioni di neuroni dopaminergici da una singola cellula staminale embrionale umana. Nel 2006 G. Cossu ed i suoi collaboratori dimostrano che mesangioblasti, eterologhi o autologhi ingegnerizzati, sono in grado di recuperare, nel modello canino, la distrofia di Duchenne.

I contributi si susseguono ormai ad un ritmo incalzante e negli ultimi anni sono inoltre migliorate le metodiche per il loro isolamento e la loro coltura. È oggi possibile ricostituire l'intero sistema ematopoietico di un topo irradiato letalmente, utilizzando una singola cellula staminale. Questa procedura è facilitata dall'impiego di un topo transgenico che esprime in tutte le sue cellule una proteina fluorescente (GFP o *green fluorescent protein*), così che la cellula donatrice e tutta la sua progenie saranno facilmente identificabili perché fluorescenti. Pertanto, se una singola cellula staminale fluorescente (più un certo

quantitativo di progenitori non fluorescenti necessari per mantenere l'emopoiesi durante il periodo di espansione e colonizzazione midollare da parte della cellula staminale fluorescente) viene trapiantata in un topo letalmente irradiato, il topo ricevente sopravviverà e tutte (o quasi) le sue cellule del sangue saranno fluorescenti per il resto della sua vita. Inoltre, è possibile trapiantare con il midollo fluorescente del topo trapiantato un secondo topo irradiato e ripetere la procedura alcune volte. Questo dimostra che una singola cellula staminale emopoietica ha la capacità di generare tutti gli elementi figurati del sangue per tutta la vita di uno o più organismi (almeno nei roditori). Al contrario, se viene trapiantato un progenitore, questo sarà in grado di dare origine agli elementi figurati del sangue del topo ricevente per un periodo limitato di tempo (settimane o pochi mesi), trascorso il quale, tutte la progenie differenzierà in cellule mature del sangue e poi il midollo andrà in aplasia.

La biologia della cellula staminale

Le cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali sono presenti nella massa cellulare interna (o embrioblasto) della blastocisti, poco prima dell'impianto nella mucosa uterina. Queste cellule possono essere coltivate, in opportune condizioni, per lunghi periodi e sono quindi in grado di generare un numero elevatissimo di cellule figlie, le quali mantengono la capacità di differenziare in tutti i tessuti dell'organismo e per tale motivo sono definite "totipotenti". Le cellule staminali embrionali o ES (dall'inglese: *embryonic stem cells*) possono essere geneticamente modificate in vitro mediante sostituzione di un gene sano con uno mutato o viceversa (ricombinazione omologa). Quando sono iniettate nella cavità (blastocela) di una blastocisti ospite, le cellule embrionali colonizzano tutti i tessuti dell'embrione chimerico (così definito perché composto dalla mescolanza di due genotipi diversi) compresa la linea germinale. Possono pertanto trasmettere un gene d'interesse alla progenie della chimera permettendo così di creare modelli di malattie umane o di terapie in utero.

Cellule staminali embrionali umane possono dare origine a tutti i tessuti differenziati del nostro corpo e quindi generare nuovi neuroni o cardiomiociti o epatociti per riparare tessuti vitali danneggiati da malattie degenerative. Tuttavia le cellule staminali ottenute da embrioni non impiantati, quali quelli ottenuti in eccesso durante procedure di fecondazione in vitro, sono immunologicamente diverse dal paziente in cui sarebbero trapiantate e ciò richiederebbe procedure di immunosoppressione simili a quelle utilizzate per i trapianti di organo.

Le cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte sono presenti in molti e forse in tutti gli organi dei mammiferi, anche se il loro numero si riduce probabilmente con l'età. In passato si riteneva che soltanto i tessuti soggetti a continuo ricambio (sangue ed epiteli) possedessero cellule staminali, necessarie per sostituire con nuove cellule differenziate le cellule perdute quotidianamente durante tutta la vita dell'individuo.

Ciò spiegava come questi tessuti fossero soggetti principalmente a patologie di tipo proliferativo (tumori). Al contrario, i tessuti le cui cellule non si rinnovano (o si rinnovano con estrema lentezza) nella vita adulta (muscolo scheletrico e cardiaco, tessuto nervoso) erano ritenuti privi di cellule staminali e quindi prevalentemente soggetti a patologie di tipo degenerativo.

Le cose sono cambiate con la dimostrazione, oggi incontrovertibile, che il sistema nervoso centrale e quello periferico contengono cellule staminali neurali, capaci di proliferare indefinitamente, o quasi, nelle opportune condizioni sperimentali e di generare i principali tipi cellulari del sistema nervoso quali neuroni e glia. Inoltre, anche il cuore, finora ritenuto incapace di rigenerazione, contiene cellule staminali capaci di generare nuovi cardiociti e forse anche cellule muscolari lisce ed endoteliali. Dagli studi condotti dal gruppo di C. Verfaillie (Minneapolis, USA) è emerso che anche nei tessuti adulti potrebbero essere presenti cellule staminali realmente multipotenti. Le fonti più accessibili di cellule staminali adulte, e quindi anche le più sfruttate dalla ricerca, sono il midollo osseo e il cordone ombelicale.

Da questa breve descrizione deriva il concetto di cellula staminale: un particolare tipo di cellula, come già detto, che ha la unica capacità

di rinnovare se stessa e di dare origine ad uno dei più di 200 tipi diversi di cellule specializzate (osso, muscolo, fegato, nervi, ecc.) che costituiscono il corpo di un vertebrato. In altre parole, la gran parte delle cellule che compongono il corpo, ad esempio le cellule del cuore o della pelle, sono specializzate per compiere una funzione specifica mentre le cellule staminali non sono specializzate e rimangono indifferenziate sino al momento in cui ricevono degli stimoli che le portano a svilupparsi in cellule mature.

La caratteristica di mantenere la capacità proliferativa associata alla abilità a differenziarsi in una cellula specializzata è unica delle cellule staminali.

Le cellule staminali si distinguono in:

- cellule totipotenti: sono delle cellule altamente indifferenziate che hanno la capacità di orientarsi verso la formazione di qualunque organo o tessuto;
- cellule pluripotenti: hanno la possibilità di differenziarsi in molti, ma non in tutti, organi o tessuti;
- cellule multipotenti: derivano dalle cellule pluripotenti e hanno una capacità differenziativa sempre ampia, ma in un numero di organi più ristretto rispetto alle cellule dalle quali derivano;
- cellule unipotenti: sono cellule che possono dar luogo soltanto ad un tipo cellulare.

Fonti delle cellule staminali

Midollo osseo

L'origine comune di tutta la componente cellulare del sangue e dell'immunità specifica e non specifica è la cellula staminale ematopoietica.

Le cellule mature del sangue sono destinate a vivere da poche ore a molte settimane, prima di essere sequestrate e distrutte. In un giorno, pertanto, miliardi di cellule devono essere prodotte per rimpiazzare quelle distrutte. La necessità di un rifornimento continuo di cellule

ematopoietiche deriva dal fatto che le cellule ematiche hanno una durata di vita limitata e devono essere continuamente sostituite durante l'arco della vita.

Giornalmente vengono prodotti nel midollo 1×10^9 leucociti/kg, $3-4 \times 10^9$ globuli rossi/kg, $1-2 \times 10^9$ piastrine/kg. Il midollo osseo rappresenta circa il 5% del peso corporeo totale ed è distribuito prevalentemente nelle ossa piatte e lunghe in età pediatrica e giovanile, mentre in età più avanzata si dispone a livello delle costole, vertebre, sterno e bacino.

Durante la vita intrauterina l'emopoiesi avviene, invece, dapprima (primi 2 mesi di gestazione) nel sacco vitellino e quindi nel fegato e nella milza. A partire dal 7-8° mese di gestazione, l'emopoiesi si afferma progressivamente nel midollo osseo.

Questo enorme processo di rinnovamento cellulare è assicurato da una piccola popolazione di cellule, calcolata fra lo 0,005% e lo 0,01% di tutta la popolazione midollare, le cellule staminali.

Recenti studi hanno evidenziato che la cellula staminale umana:

- si trova ad una frequenza di 1:104 cellule midollari;
- è capace di autorigenerarsi grazie ad un processo di “autorinnovamento”;
- è metabolicamente quiescente e raramente entra in ciclo cellulare;
- contribuisce ad espandere il pool dei “progenitori multipotenti”, capaci di sviluppare tutte le linee ematopoietiche, fino a perdere, ad un certo punto, la loro capacità differenziativa in senso linfoide e diventare “i progenitori commissionati mieloeritroidi”.

Affinchè si abbia una buona emopoiesi è necessario un microambiente ematopoietico adatto. Importanti sono quindi i rapporti che si stabiliscono nel midollo tra le cellule staminali e osteoclasti, adipociti, cellule stromali, sistema vascolare e matrice extracellulare la cui funzione non è solo quella di ancorare i precursori ematopoietici con la giusta interazione integrina-integrina (VLA-4 e VCAM-1) ma anche quella di compartimentalizzare i fattori solubili, come il GM-CSF, IL-3, *T cell growth factor*, orientando spa-

zialmente i precursori ematopoietici in isolotti eritrocitari e granulocitari.

Il ruolo fondamentale del microambiente nella regolazione dell'ematopoiesi è provato nel topo affetto da una patologia ipo/aplastica, primitivamente determinata da un difetto genetico del tessuto stromale, l'anemia di Steel. La causa dell'anemia è, in questo caso, una mutazione del gene *Sl* che codifica per un fattore di crescita di origine stromale (SCF), essenziale per la proliferazione e maturazione delle cellule staminali.

La combinazione della capacità differenziativa e proliferativa delle cellule staminali è finalizzata allo sviluppo di una progenie di altri precursori ematopoietici con potenzialità differenziative e maturative più ristrette rispetto alle cellule staminali: le cellule "*committed*" per lo sviluppo di una sola linea cellulare. Bisogna sottolineare che l'emopoiesi (Fig.1) è influenzata in maniera decisiva da numerosi fattori di crescita.

Nella linea neutrofilo-monocitaria esistono infatti 4 classi di cellule:

- CFU-GEMM formanti colonie miste (granulo-eritro-macrofagico-megacariocitario) (Fig. 2);
- CFU-GM formanti colonie granulomonocitiche (Fig. 3);
- CFU-G formanti colonie granulocitarie;
- CFU-M formanti colonie monocitarie.

Nella linea eritroide:

- BFU-E o cellula che forma grandi colonie eritroidi (Fig. 4);
- CFU-E o cellula che forma piccoli aggregati eritroidi (Fig. 5).

Nella linea megacariocitaria.

- BFU-MK;
- CFU-MK più mature.

In questo modo i precursori differenziano e maturano verso cellule più "terminali", che costituiscono la loro progenie e un flusso inverso non è possibile.

Lo stato generativo del sistema cellulare mielopoietico è inversamente proporzionale al grado di potenzialità: le cellule staminali sono, in condizioni normali, quasi tutte in G₀, mentre il 50% delle CFU-GM sintetizzano DNA.

In altre parole, ogni sistema è mantenuto dalla cellula a staminalità e potenzialità più ristretta, mentre le cellule multipotenti costituiscono una riserva per situazioni di emergenza.

Il maggior ostacolo alla identificazione della presunta cellula staminale ematopoietica è stato per lungo tempo la mancanza di mezzi idonei per separare tale popolazione cellulare dalle cellule più mature.

Ultimamente, progressi straordinari sono stati compiuti mediante l'uso della citometria a flusso e di altre metodiche di separazione cellulare, associate all'utilizzo di anticorpi monoclonali in grado di evidenziare la presenza o la mancanza di particolari antigeni nella superficie di tali cellule.

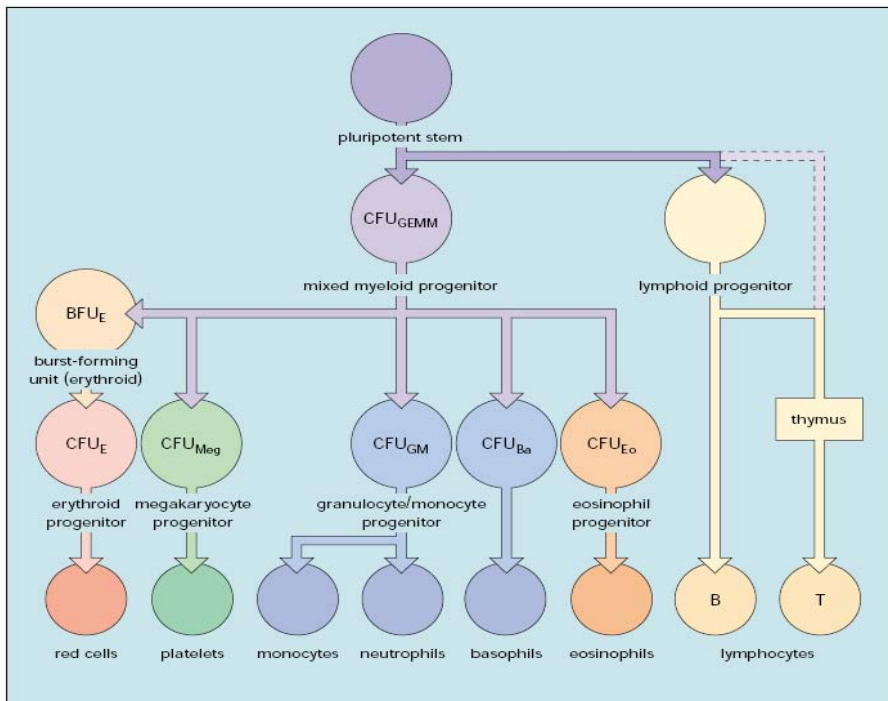


Figura 1. *Emopoiesi.*

In particolare, l'antigene CD34 è il marcatore di una popolazione cellulare morfologicamente ed immunologicamente eterogenea, il cui elemento unificante è rappresentato, in vitro, dalla capacità di generare aggregati clonali e, in vivo, dalla capacità di ricostruire la mielo-linfopoiesi nel ricevente sottoposto a terapia mielo-linfoablattiva.

L'antigene CD34 identifica tutte le cellule ematopoietiche staminali e progenitrici del midollo osseo, mentre risulta assente nei precursori midollari morfologicamente identificabili e nelle cellule circolanti del sangue periferico.

Per tale motivo il CD34 è considerato un marcatore specifico di stadio maturativo, ma non di linea differenziativa.

Questo marcatore è espresso dallo 1–3% delle cellule del midollo, dallo 0,01–0,1% delle cellule del sangue periferico e dallo 0,1–0,4% delle cellule di cordone ombelicale.

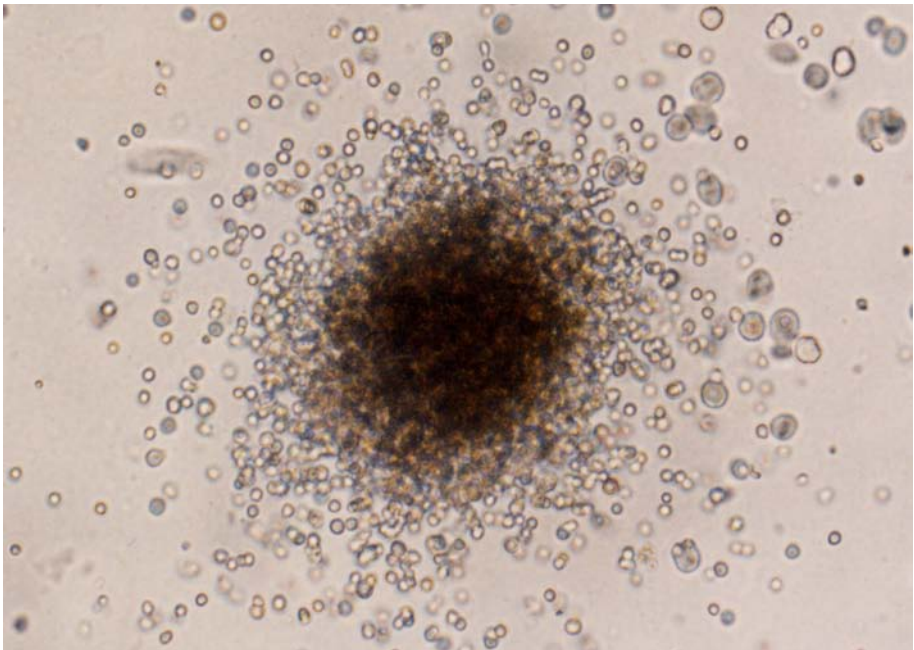


Figura 2. *Colonia ematopoietica derivata da un progenitore staminale multipotente. Essa include progenitori granulocitari, eritroidi e megacariocitari (CFU–GEMM).*

Recentemente è stato dimostrato che il numero di cellule staminali aumenta nel sangue periferico fino a 100–1000 volte dopo trattamenti ad alte dosi con farmaci citostatici e/o fattori di crescita quali il G-CSF o il GM-CSF. Questa tecnica ha consentito lo sviluppo del trapianto di cellule staminali periferiche che rappresenta ad oggi il tipo di trapianto più frequentemente praticato nei paesi europei e americani.

La sua espressione si può associare a quella di altri marcatori:

- marcatori non linea-specifici (Thy1, CD38, HLA-DR, CD45RA, CD71);

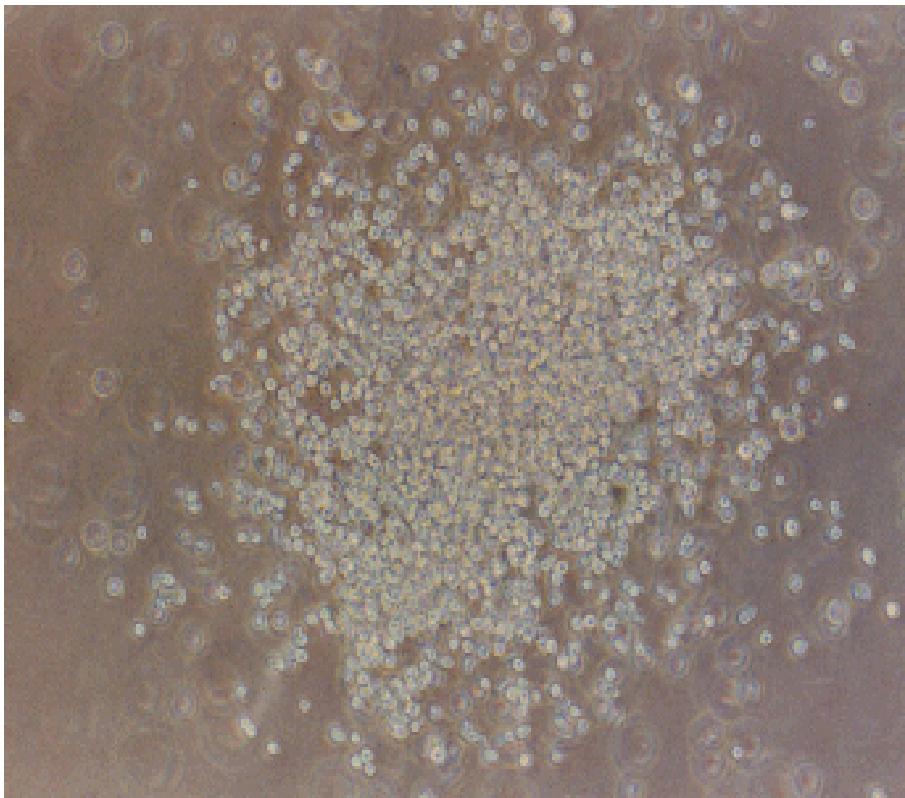


Figura 3. *Colonia granulocito-macrofagica (CFU-GM), in grado di dare origine ad entrambe le linee granulocitarie (neutrofila e monocito-macrofagica).*

- marcatori linea-specifici: T-linfocitaria (TdT, CD10, CD7, CD5, CD2); B-linfocitaria (TdT, CD10, CD19); mieloide (CD33, CD13); megacariocitaria (CD61, CD41, CD42b).

Proprio l'espressione combinata dei marcatori consente di frazionare l'eterogenea popolazione di cellule CD34 in sottopopolazioni più o meno primitive, comprese le cosiddette "*long-term culture-initiating cells*" (LTC-IC) (Fig.6).

L'espressione di alcuni marcatori delle cellule staminali ematopoietiche cambia durante l'ontogenesi e la loro variabile associazione ci permette di identificare una popolazione cellulare in una diversa fase differenziativa.

Tra questi assumono importanza, oltre il CD34, il CD38, HLA-DR e, ultimamente, il KDR.

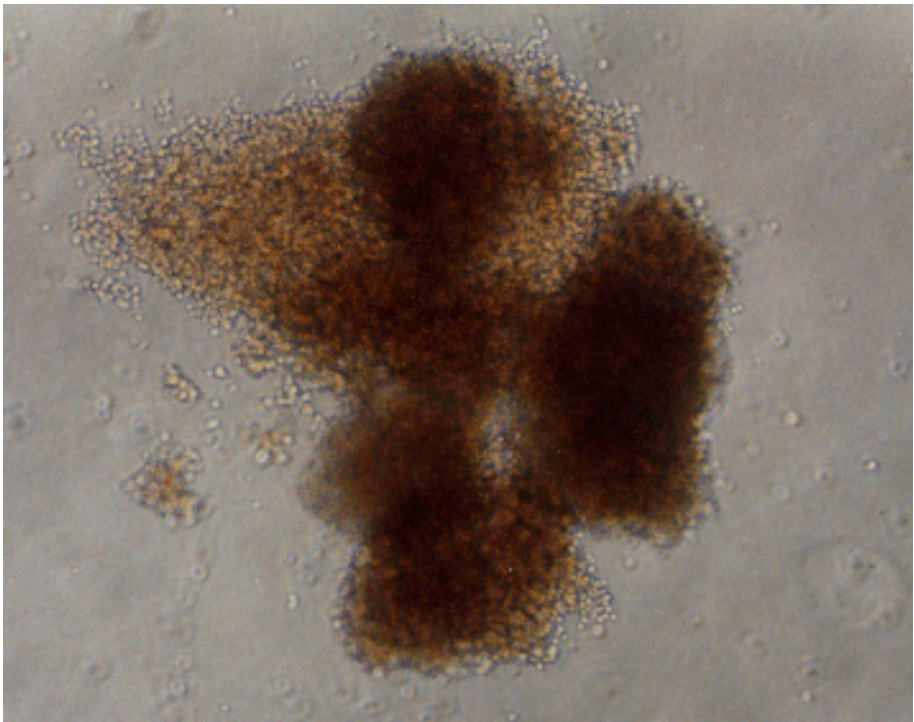


Figura 4. *Colonie eritropoietiche allo stadio di BFU-E.*

– CD34

Utilizzato per identificare e purificare i progenitori ematopoietici del midollo osseo o del sangue periferico.

In associazione, infatti, con CD45, consente di evidenziare una popolazione mononucleata, granulo–linfo–monocitaria, e di escludere gli eritrociti, piastrine o detriti cellulari.

I veri blasti CD34+ possono essere distinti grazie alla loro bassa densità di espressione del CD45 e alle loro caratteristiche di bassa granulosità (basso “*side scatter*”).

In questo modo la popolazione CD34+ così identificata comprende sia i progenitori monopotenti che i multipotenti, comprese le cellule LTC–IC.

L’antigene CD34 è una proteina integrale di membrana, del peso molecolare di 110 kD. La presenza di molti siti di glicosilazione, la mancanza di attività tirosin–chinasica e la frequenza molto bassa di sintesi e di degradazione suggeriscono che il CD34 non sia un recettore per un fattore di crescita o una molecola di trasduzione del segnale, ma che sia più probabilmente coinvolto nelle interazioni cellula–cellula o cellula–matrice extracellulare.

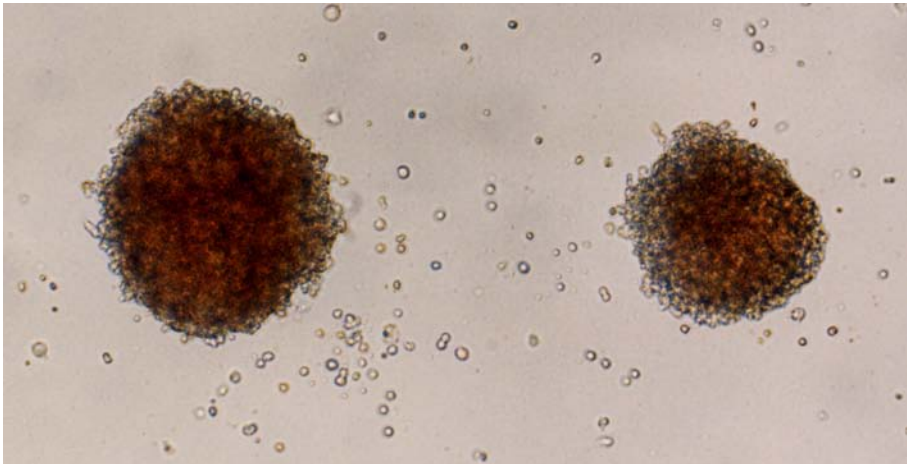


Figura 5. *Colonie eritropoietiche allo stadio di CFU–E.*

La sua espressione è variabile a seconda del grado di differenziazione e del potenziale proliferativo degli elementi cellulari ematopoietici: infatti è più alta nelle LTC-IC, che rappresentano la popolazione più primitiva nel midollo, e si pensa che venga persa progressivamente nel corso della maturazione cellulare, tanto da essere trascurabile nelle CFU-E.

- HLA-DR

Espresso nelle cellule staminali ematopoietiche fetali, ma non in quelle del midollo adulto.

- CD38

È espresso anche sulla membrana cellulare di plasmacellule, timociti e linfociti T attivati.

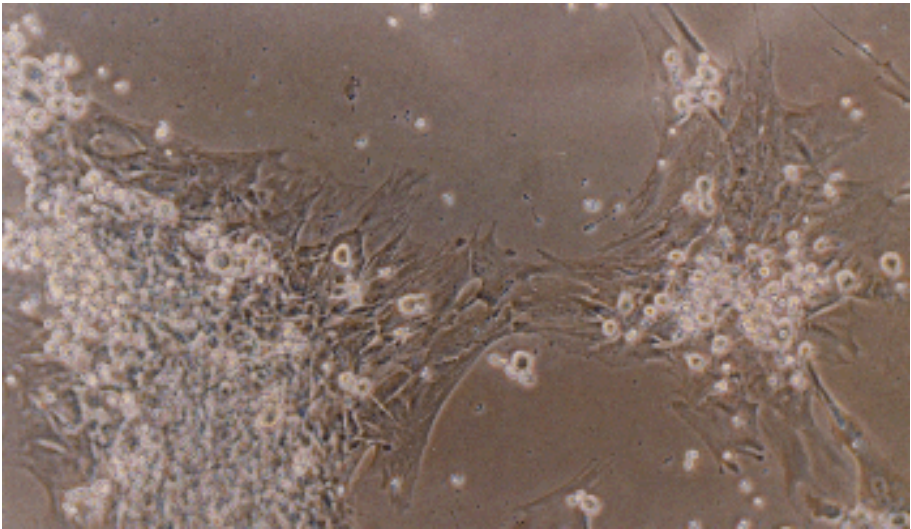


Figura 6. *Cellule LTC-IC coltivate in presenza di cellule stromali murine M2-10B4 (a e b). Le cellule midollari stabiliscono rapporti con le cellule stromali, così da configurare caratteristiche "aree a ciottolato".*

La mancanza di espressione delle molecole CD38 è caratteristica del sottogruppo più primitivo di cellule CD34+ e cioè delle BFU-E immature, CFU-GEMM e CFU-GM ad alto potenziale proliferativo (con colonie di più di 1:104 cellule).

Il CD38 è regolato positivamente durante il differenziamento delle cellule CD34+/CD38- in progenitori “committed” e simultaneamente si verifica l’acquisizione di altri marcatori specifici per ogni linea.

– Il recettore KDR

Recentemente è stato identificato da Peschle et al. un marcatore di membrana, noto come KDR o VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), che sembrerebbe ristretto alla popolazione di cellule staminali ematopoietiche CD34+.

La sua espressione è stata infatti verificata nello 0.1–0.5% delle cellule CD34+ umane, prevalentemente nel compartimento ematopoietico più primitivo; cellule pluripotenti sono infatti risultate CD34+KDR+, a dispetto delle cellule “committed”, appartenenti piuttosto al subset CD34+KDR-.

A conferma che il KDR può essere considerato un marcatore delle cellule staminali ematopoietiche più primitive, un saggio LTC a 12 settimane ha evidenziato una espressione del KDR del 25–42% nelle cellule staminali derivate da midollo, sangue periferico o cordone ombelicale, e del 53–63% nelle colture LTC supplementate con il fattore VEGF, probabile regolatore positivo dell’espressione del recettore.

Partendo dall’ipotesi della presenza nel midollo di varie aree di microambienti stromali, in cui i differenti fattori di crescita esplicano la loro azione sulle cellule staminali e sui progenitori promovendo preferibilmente lo sviluppo di cellule eritroidi o granulocitarie, anche l’ematopoiesi può essere mantenuta in “vitro” in colture a lungo termine in presenza di:

- cellule stromali
- fattori di crescita.

A questo proposito, esistono regolatori positivi ed altri che fungono da regolatori negativi sull’ematopoiesi:

regolatori positivi:

- fattori linea specifici (EPO, M-CSF, IL-5)
- fattori linea non specifici (GM-CSF, IL-3, IL-4)
- fattori per il reclutamento di progenitori più immaturi (IL-6, IL-11, IL-12, LIF, SCF, soprattutto se associati a IL-3, GM-CSF, G-CSF, EPO).

regolatori negativi:

- MIP-1 α
- TNF- α
- IFNs
- TGF- β (che tuttavia inibisce le cellule più immature ma stimola con il GM-CSF i progenitori CFU-GM più maturi).

L'insieme di questi studi ha indicato che la proliferazione o l'inibizione delle cellule ematopoieticamente attive è il risultato della complessa interazione fra microambiente midollare, fattori di regolazione positiva e negativa e cellula staminale; perturbare questo equilibrio può voler dire alterare una normale ematopoiesi.

Dall'altra parte, queste osservazione hanno suggerito l'uso di citochine per la mobilitazione periferica delle cellule CD34+ in corso di trattamenti chemioterapici o in sostituzione di allotrapianto nel trattamento di gravi immunodeficienze o di severe emopatie ed apre nuove prospettive terapeutiche anche per l'infezione da HIV-1, al fine di un corretto e completo recupero immunologico ed ematologico.

Sangue periferico

Dopo la nascita, le cellule staminali sono localizzate nella cavità delle ossa lunghe e piatte, in particolare nelle ossa iliache del bacino e dello sterno; da questa sede possono, come sarà spiegato nelle pagine successive, essere prelevate, in anestesia generale, tramite aspirazioni multiple.

Per lungo tempo sorgenti di cellule staminali emopoietiche alternative a quelle midollari sono state conosciute ma non utilizzate.

Le cellule staminali emopoietiche del sangue periferico sono state utilizzate solo da quando sono divenuti disponibili gli studi sulla loro mobilitazione e raccolta, sia nell'autotrapianto che nel trapianto allogenico.

Solo negli anni Ottanta si è potuto dimostrare la validità dell'attecchimento midollare da parte delle staminali periferiche. Questo tipo di cellule ha dimostrato, in seguito, di permettere dei tempi di attecchimento e ricostituzione midollare inferiori rispetto all'uso delle cellule staminali emopoietiche midollari, diminuendo il periodo di esposizione alle infezioni ma aumentando il rischio di GvHD cronica.

Nel sangue periferico le cellule CD34+ sono estremamente rare ma, in seguito a chemioterapia mielosoppressiva, possono essere indotte a circolare; il meccanismo che conduce a questo rilascio è il risultato di una modificazione nel microambiente midollare a livello dell'adesione tra il progenitore e lo stroma midollare. Lo stimolo mobilizzante esercitato dal chemioterapico può essere potenziato con l'introduzione del fattore di crescita G-CSF. Pertanto, la scelta sul tipo di prelievo si è progressivamente spostata a favore della mobilitazione e raccolta mediante leucoaferesi, procedura meno invasiva, comportando lo sviluppo di un programma che ha coinvolto numerose figure professionali per la scelta del protocollo di mobilitazione, lo studio della cinetica di mobilitazione al fine di cogliere l'esatto timing di raccolta delle cellule CD34+, la loro caratterizzazione, criopreservazione e conservazione in azoto liquido. Infuse per via endovenosa, mediante catetere venoso centrale, le cellule staminali oltrepassano il parenchima polmonare per migrare nello spazio extravascolare ed ancorarsi nel microambiente delle cavità midollari che vengono così ripopolate da nuovo tessuto emopoietico. Questo è un processo attivo, coordinato, multifase, che prende il nome di *homing*; è rapido ed essenziale nel trapianto ed ha un ruolo fisiologico nell'omeostasi del tessuto emopoietico. Il ricevente, trattato con dosi mieloablativa di chemioterapia e radioterapia, non potrebbe sopravvivere se le cellule staminali non sostenessero la completa e duratura ricostituzione ematopoietica.

Nel trapianto allogenico si è pertanto assistito ad un incremento dell'impiego delle cellule staminali allogeniche ottenute da sangue pe-

riferico del donatore dopo mobilitazione indotta dalla somministrazione del fattore di crescita, più comunemente il G-CSF.

I presupposti per la diffusione di tale procedura sono stati i quelli descritti di seguito:

- comparsa di una ricostituzione emopoietica completa e permanente con chimerismo completo del donatore;
- possibilità di aumentare ulteriormente il numero di cellule staminali circolanti per mezzo di citochine in modo da garantire l'attecchimento;
- buona tollerabilità da parte del donatore del G-CSF impiegato per la mobilitazione delle cellule staminali;
- vantaggi per il donatore al quale viene evitata l'anestesia, l'ospedalizzazione, l'autotrasfusione, il dolore nella sede del prelievo;
- una più rapida risalita dei neutrofili e delle piastrine;
- il maggior numero di linfociti T e di cellule NK presenti nell'inoculo con possibile incremento dell'effetto graft versus leucemia (GvL).

Nonostante il numero di linfociti T e cellule NK sia superiore nei concentrati cellulari da sangue periferico rispetto al midollo osseo, numerosi studi non hanno messo in evidenza un aumento nell'incidenza della GvHD acuta rispetto al trapianto midollare, al contrario di quanto avviene nella GvHD cronica, la quale presenta una maggiore incidenza nel trapianto da cellule staminali periferiche rispetto ai pazienti sottoposti a trapianto con cellule provenienti dal midollo osseo.

Sangue placentare

Alla fine degli anni 80 fu proposta come sorgente di cellule staminali emopoietiche il sangue cordonale. Questo sviluppo è stato preceduto da studi sperimentali sull'utilizzo di cellule di fegato fetale, anche umano, come fonte di cellule staminali emopoietiche.

Le potenzialità del cordone ombelicale come sorgente alternativa risultano essere la permanenza e disponibilità nelle banche per lunghi

periodi e l'imaturità dei linfociti introdotti durante il trapianto con le cellule staminali, a cui consegue un ridotto rischio di sviluppare GvHD.

Il primo successo con questa metodica fu descritto a Parigi in un paziente affetto da Anemie di Fanconi. Successivamente questa metodica si è estesa ad altre patologie. Un ulteriore vantaggio delle cellule staminali del sangue cordonale dipende dal fatto che riceventi e donatori possono avere delle maggiori incompatibilità antigeniche per le potenzialità minori di sviluppare GvHD.

Il numero di trapianti da cellule staminali cordonali, attualmente, è minore rispetto alle altre fonti, ma il trend è in continuo crescendo, privilegiando la popolazione pediatrica.

Ancora oggi, per molte oncoemopatie l'unica possibilità di cura rimane il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche da midollo osseo e da sangue periferico dopo mobilizzazione con G-CSF.

Visto che più di un terzo dei pazienti candidati al trapianto allogenico non dispone di donatore consanguineo HLA-identico e la ricerca di un donatore compatibile non consanguineo dal registro internazionale si conclude con esito negativo in più del 50% dei casi, sono state esplorate sorgenti alternative di cellule staminali come il sangue cordonale. Le cellule da cordone ombelicale offrono alcuni vantaggi teorici rispetto alle cellule da sangue midollare e periferico, in ragione della loro immaturità immunologica e dell'elevato potenziale di ripopolamento midollare e immunologico. Principale limitazione è la quantità ridotta di cellule staminali presenti in un'unità di cordone.

L'utilizzo di unità di cellule staminali da sangue placentare ha i seguenti vantaggi:

- consente una disparità HLA tra donatore e ricevente fino a 2 mismatches (4-5/6) a livello dei loci HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1, senza riscontrare un aumento dell'incidenza di GvHD. Questa maggiore immunotolleranza è dovuta alla presenza nel sangue placentare di un basso numero di linfociti T, prevalentemente naive con fenotipo Th0, incapaci di innescare una risposta immunologica importante quando attivati dagli antigeni del ricevente;

- permette la riduzione dei tempi di ricerca e l'immediata disponibilità, perché le unità vengono sistematicamente tipizzate per HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1 conservate in biobanche;
- assenza di rischio per il donatore e minor rischio di trasmissione di infezioni latenti (CMV e EBV).

Anche se le cellule staminali da cordone ombelicale hanno potenziale rigenerativo e capacità di ripopolare il compartimento emopoietico superiore rispetto a quelle del sangue midollare o periferico, esiste comunque il fattore limitante importante per la scelta di un'unità di cordone ombelicale: la scarsa cellularità. Infatti il numero totale delle cellule nucleate e delle CD34+ presenti in una unità di sangue cordonale è 10 volte inferiore a rispetto a quello che si riscontra nelle unità provenienti da altre fonti. Diversi studi hanno permesso di stabilire, oltre alla presenza di correlazione positiva tra dose cellulare, grado di attecchimento e rapidità del recupero ematologico, che il numero minimo di cellule nucleate da infondere deve essere superiore a $2.0 \times 10^7/\text{kg}$ di peso corporeo del ricevente, dose che spesso non si riesce a raggiungere nel paziente adulto. Proprio per questo motivo l'incidenza di "*graft failure*" varia tra il 10 ed il 25%. Diverse strategie sono state sperimentate per superare il limite dato dalla minore quantità di cellule nucleate del cordone ombelicale, come l'infusione di due unità, la riduzione dell'intensità del condizionamento o l'espansione delle cellule cordonali in vitro