

# Perchè si raccoglie il sangue del cordone ombelicale?

**Vito Chiantera, Manuela Rivellini, Stefania Caruso\*\*,  
Imma D'Ambra\*, Piero Iacobelli**

---

**Dipartimento Materno-Infantile (Direttore: Prof A. Chiàntera)  
Ospedale Buon Consiglio-Fatebenefratelli, Napoli**

**\*\* BaSCO Campania (Resp: Dott. Anna Canazio)**

**A.O.R.N. Santobono-Pausilipon, Napoli**

**\* Patologia Neonatale (Direttore: Dott. Lucio Giordano)**

**A.O.R.N. Santobono-Pausilipon, Napoli**

La sopravvivenza di molti pazienti affetti da numerose patologie oncologiche, ematologiche, immunologiche e dismetaboliche dell'infanzia e dell'età adulta, dipende dalla possibilità di effettuare un trapianto di cellule staminali da midollo osseo, per eseguire il quale è necessario che tra il donatore ed il ricevente vi sia istocompatibilità accertata mediante tipizzazione HLA. Purtroppo le barriere di istocompatibilità sono tali da costituire un grosso limite all'applicazione della tecnica e solo il 20% dei pazienti trova un donatore compatibile nell'ambito familiare, meno di 1/3 lo trova tra i donatori volontari iscritti nei registri internazionali dei donatori di midollo, mentre la restante parte dei pazienti, circa il 45%, non può accedere al trapianto per mancanza di donatori.

Il termine cellula staminale identifica una cellula capace di automantenersi, rigenerando se stessa (divisione espansiva), di generare le cellule mature e differenziate di un determinato tessuto (divisione differenziativa). La capacità delle cellule staminali di differenziarsi nei diversi tessuti cambia secondo l'origine delle cellule e dello stadio di sviluppo dell'organismo al quale appartengono. Sono state identificate diverse sorgenti di cellule staminali umane; esse differiscono per la minor o maggior facilità con cui possono essere isolate, moltiplicate e coltivate in laboratorio. A tutt'oggi sono state isolate cellule staminali negli embrioni ai primi stadi di sviluppo, nei tessuti fetali, nel sangue placentare (o sangue di cordone ombelicale). In ambito ematologico il midollo osseo ha storicamente rappresentato la sorgente di cellule staminali emopoietiche. Più recentemente è stato dimostrato che anche dal sangue periferico di soggetti sani trattati con fattori di crescita emopoietici, quali granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) è possibile ottenere progenitori emo-

poietici in grado di ricostruire il sistema emopoietico e immunitario di pazienti sottoposti a terapia mieloablattiva.

Alla fine degli anni '80 si è affacciata una nuova prospettiva, rappresentata dall'utilizzo del sangue del cordone ombelicale quale fonte di cellule da trapiantare. Il sangue placentare, infatti, è ricco di cellule staminali emopoietiche che, pur riconoscendo una organizzazione simile a quella delle cellule del midollo osseo, hanno tuttavia caratteristiche peculiari. Il sangue placentare contiene una rilevante quota di progenitori emopoietici immaturi (quali le long-term culture CFC), e la loro capacità clonogenica sembra essere superiore a quella delle corrispettive cellule midollari.

Allo stesso modo, i progenitori orientati (CFU-GM e BFU-E) sono meno rappresentati rispetto al midollo, mentre cellule meno differenziate come CFU-GEMM e HPP-CFC sono più frequenti nel cordone.

Grazie alla ridotta risposta immunitaria dei linfociti del sangue cordonale, il trapianto di sangue del cordone ombelicale è possibile anche in caso di comparibilità parziale tra donatore e ricevente. I linfociti contenuti nelle unità di sangue placentare sono infatti dotati di un fenotipo *naïve*. Tra le principali caratteristiche ricordiamo che a differenza dei linfociti adulti, quelli del sangue placentare sono rappresentati in maggior percentuale da cellule CD45RA+ incapaci di produrre IL2; che i linfociti T dopo stimolazione con agenti mitogeni non proliferano e producono bassi livelli di IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  ed IL10; le cellule T hanno la capacità di maturare in cloni ad alta produzione di IL10; le cellule Nk non esprimono il CD57 e presentano ridotta capacità di killing; la citotossicità di tipo NK e LAK risulta conservata dopo stimolazione con IL2. Tutto questo si traduce, nell'applicazione clinica pratica in una ridotta incidenza della "malattia del trapianto verso l'ospite" (GVHD) ma con un conservato effetto di "graft versus leukemia" (GVL). In particolare, la ridotta incidenza di graft versus host disease (GVHD), che è la maggiore causa di mortalità correlata al trapianto, permette di ampliare la scelta del donatore anche ad unità non totalmente compatibili.

Un'altra preziosa caratteristica delle cellule staminali da sangue cordonale è la possibilità di crioconservazione, che unita alla teoricamente pressochè illimitata disponibilità di sangue placentare, renderebbe possibile ottenere campioni HLA compatibili per tutti.

Il primo trapianto di cellule staminali emopoietiche da SCO, fu effettuato da Eliane Glickman nel 1989 in un bambino affetto da anemia aplastica costituzionale di Fanconi, utilizzando le cellule provenienti dal sangue del cordone del fratellino del paziente, compatibile per gli antigeni del sistema HLA e aprendo la strada al possibile utilizzo terapeutico.

L'insieme delle caratteristiche del sangue placentare/cordonale ed i vantaggi che il trapianto di cellule staminali cordonali offre rispetto al trapianto da midollo osseo (per il ricevente: disponibilità immediata, ridotto rischio di malattie da trapianto, necessità di minor grado di compatibilità con il donatore; per il donatore:

assenza di rischi legati all'anestesia ed alle procedure chirurgiche necessarie per l'espianto del midollo osseo) hanno portato ad un uso sempre più diffuso di questa preziosa risorsa. La ricchezza in cellule emopoietiche ha trasformato in pochi anni il cordone ombelicale da semplice scoria biologica a potenziale fonte di risorse terapeutiche. Sino ad oggi sono stati eseguiti nel mondo alcune migliaia di trapianti di cellule staminali cordonali con elevata percentuale di successo in pazienti altrimenti condannati a morte certa.

Uno dei maggiori problemi connessi con la raccolta del sangue placentare e del cordone ombelicale è che si tratta di una procedura non ripetibile e che la quantità di sangue ottenibile da un singolo donatore è limitata. Il volume raccolto varia ampiamente passando da 40 a 200 ml, ma non sono infrequenti raccolte di soli 20-40 ml, del tutto insufficienti allo scopo trapiantologico di cellule staminali emopoietiche. Fattori ostetrici relativi alla madre ed al neonato e modalità e tecnica della raccolta possono influenzare il volume del campione finale.

Il limite principale per un più ampio ricorso al trapianto di cellule staminali da cordone ombelicale, è quindi rappresentato dal ridotto volume di ciascuna raccolta. La conta delle cellule nucleate e delle cellule CD34+ (la proteina CD34 definisce la gran parte delle cellule progenitrici attive nell'emopoiesi) è il parametro maggiormente utilizzati per l'utilizzo clinico del SCO. All'interno della popolazione che esprime la proteina CD34 esiste inoltre una ulteriore suddivisione, rendendo possibile l'individuazione di sottopopolazioni cellulari più primitive e non ancora indirizzate verso una specifica linea di differenziazione (CD38-). E' recente inoltre l'identificazione di cellule staminali emopoietiche non esprimenti la proteina CD34 capaci di differenziarsi anche in tessuti non emopoietici (transdifferenziamento).

In letteratura il numero medio di cellule staminali emopoietiche CD34+/Kg utilizzato nei trapianti è di  $2 \times 10^5$  CD34+/Kg (range 0.4- $5 \times 10^5$ ); un numero inferiore a  $2 \times 10^6$  cellule staminali emopoietiche CD34+ risulta quindi del tutto inaccettabile per il banking per l'uso clinico. Una sacca di sangue cordonale dalle caratteristiche ottimali, contiene circa 1 miliardo di cellule nucleate: un trapianto si può eseguire con successo trasferendo nel ricevente almeno 30 - 40 milioni di cellule nucleate per Kg di peso corporeo e quindi ciò comporta la possibilità di trapiantare solo pazienti di peso inferiore a 35 - 40 kg ed in pratica solo bambini.

Attualmente si pratica la raccolta di sangue del cordone ombelicale per:

raccolta dedicata (related) di SCO per trapiando di cellule staminali emopoietiche in pazienti con patologie ematologiche sicuramente o probabilmente compatibili con il neonato "donatore" (fratello e sorella);

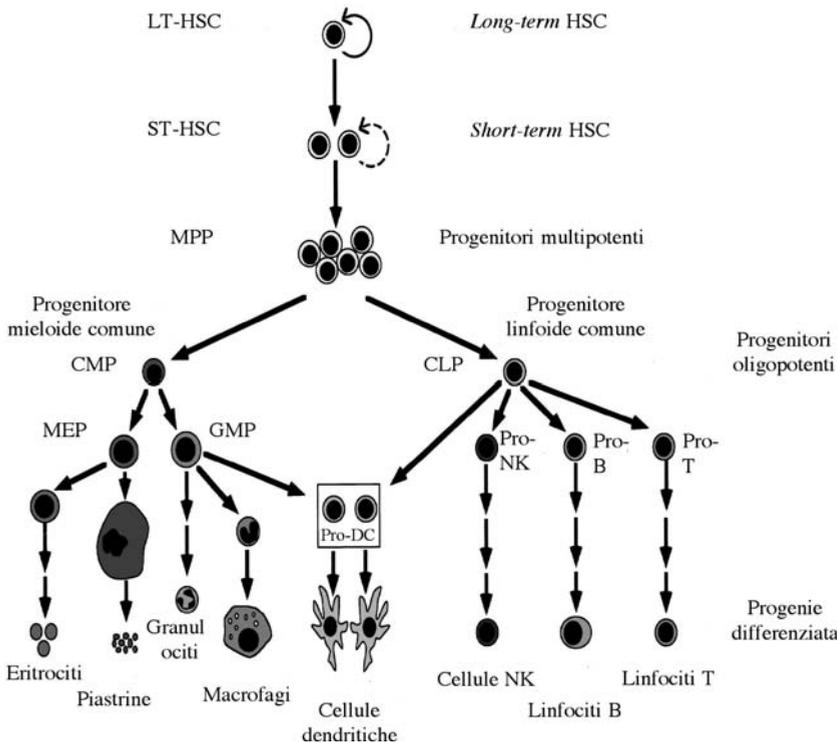
raccolta di SCO per donazione (unrelated), a scopo trapiantologico, che viene bancato presso la Banca del Sangue del Cordone Ombelicale

Abbiamo deciso di non prevedere il bancaggio di SCO ad uso esclusivo del donatore sia perché abbiamo deciso di privilegiare lo spirito della "donazione" sia per-

ché la nostra BaSCO non potrebbe conservare un numero elevato di campioni per un ipotetico e ridottissimo utilizzo.

La raccolta per donazione (unrelated) effettuata nei reparti di ostetricia ha lo scopo di ottenere unità di sangue cordonale da criopreservare nelle BaSCO, a disposizione di un potenziale ricevente. Fatti salvo i casi di raccolta dedicata (related), per i quali vengono raccolte e sfruttate anche quantità minime di sangue, la raccolta per "donazione" tende ad ottenere campioni ottimali. La propaganda attraverso i media ha fortemente aumentato la richiesta delle puerpere di "donare" il sangue del cordone ombelicale ma, per la necessità di ottenere raccolte adeguate in termini di numerosità di cellule nucleate (e cellule CD34+), non tutte le pazienti possono essere candidate come "donatrici". Allo scopo di ridurre inutili sprechi di risorse economiche (costo delle sacche, della valutazione dell'idoneità del campione, tempi di raccolta e di laboratorio) è opportuno evitare di praticare la raccolta in tutte quei casi in cui è già ipotizzabile in partenza un basso volume di sangue cordonale. Rientrano tra questi i casi di IUGR, di parto prima della 37a settimana, di gemellarità.

**Cellule staminali emopoietiche**



**Bibliografia**

1. Bertolini F, De Vincentiis A, Lanata L et al. Allogenic hematopoietic stem cells from sources other bone marrow : biological and technical aspects. *Haematologica* 1997 ;82 :220-238.
2. Glukaman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation [Review]. *Exp Hematol* 2000; 28: 1197-1205
3. Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation. *Transfusion* 1995;35:619-621.
4. Knapp JA, Dorken B , Rieber P , et al. Update of CD antigens after the 4th International Workshop International Journal of Cancer, 44:190-191,1989.
5. Mc Cullough et al, *Blood Cells*, 20, pp 609, 1994.
6. Eurocord, Parigi 20 febbraio 1997, Protocol for unrelated cord blood transplant.
7. Almilci C, Carlo -Stella C,Wagner JE et al. umbilical cord blood as a source of hematopoietic stem cells: from research to clinical application. *Haematologica* 1995;7:47-55
8. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE et al.Processing and cryopreservation of placental / Umbilical cord blood for unrelated marrow reconstitution .*Proc Natl Accad Sc USA* 1995;92: 10119-10122.
9. Rebullia P,De Bernardi N,Villa A,et al.Evaluation of new device for volume reduction of placental blood units by filtration through polyurethane .*Vox Sang* ,74,36,1998
10. Harris DT ,Schumaker MJ Richlick S et al.collection separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation .*Bone Marrow Transplant*,13,135,1994.
11. Donaldson C,Armitage WJ Dening - Kendall PA et al. Optimal cryopreservation of human umbilical cord blood.*Bone Marrow transplant* 1996;18 725 731.
12. L.Perugini, L Fazio, E In et al Congelamento, conservazione e rintracciabilità dell'unità del sangue placentare. *La trasfusione del sangue* Vol.45,n.6 nov-dic 2000(338-343)
13. Lovelock JE,Bishop MWH. Prevention of freezing damage to living cells *Nature*,183,1394,1959.
14. Broxmeyer HE Coopel S High efficiency recovery of immature hematopoietic progenitor cells with extensive proliferative capacity from human cord blood cryopreserved for 10 years. *Clin Exp immunol* 107, 45, 1997.
15. Kobylika P, Ivanyi P, Breur-Vriesendirp BS et al. Preservation of immunological and colony forming capacities of long term (15 years) cryopreserved cord blood cells. *Transplantation*, 65, 1275, 1998.
16. Cairo M, wagner JE, Placental and/or umbilical cord blood:an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood*, 90, 4665,1997.
17. Locatelli F, Maccario R, Comoli P et al. Hematopoietic and immune recovery after transplantation of cord blood progenitor cells in children. *Bone Marrow*

Transplant 1996;18:1095-1101

18. P Rebutta, L.Lazzari M P Blundell et al :Expansion ex vivo del sangue placentare. La trasfusione del sangue ,vol. 45 n6 nov-dic 2000(334-337).
19. Rubinstein P, Rosenfield RE,Adamson JW et al .Stored placental blood for unrelated Bone Marrow reconstitution.Blood 1993;81:1679-1690.
20. Rubinstein P, Taylor PE , unrelated placental blood for bone marrow reconstitution :organization of placental blood program Blood cells 1994;20:587-600.
21. Gluckman E .Hows J, Scardavou Aet al. et al cord blood banking for Hemopoietic stem cell transplantation ;an international cord blood transplant registry. Bone Marrow Transplant 1993;11:199-200.
22. Gluckman E.European organization for cord blood banking. Blood Cells 1994;20:601-608.
23. Sirchia G. GRACE:Il network italiano delle banche di sangue placentare. Progressi in ematologia clinica 1997;16:165-182.