



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto "Progressi in Biologia e Medicina"

1° Corso di formazione avanzata

Cellule staminali somatiche da adulto nella medicina rigenerativa

8 - 12 novembre 2004, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

1° Corso di formazione avanzata

**Cellule staminali somatiche da adulto
nella medicina rigenerativa**



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto "Progressi in Biologia e Medicina"

1° Corso di formazione avanzata

**Cellule staminali somatiche da adulto
nella medicina rigenerativa**

8 - 12 novembre 2004, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

© Copyright 2004 

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)
senza il permesso scritto dell'editore.

Indice

Presentazione	pag. VII
<i>C. Bernasconi</i>	

Biologia delle cellule staminali

1. Clonazione: storia e tecniche. Dalle cellule staminali embrionali all'architettura funzionale dei tessuti <i>C.A. Redi</i>	» 3
2. Molteplici sorgenti di cellule staminali somatiche da adulto <i>C. Bernasconi</i>	» 11
3. Riprogrammazione genetica di cellule somatiche differenziate: i citoplasti naturali e artificiali. Definizione di plasticità differenziativa: i geni stemness <i>C.A. Redi</i>	» 14
4. Caratterizzazione biologica delle cellule del cordone ombelicale: cellule staminali somatiche di origine fetale <i>F. Bertolini</i>	» 24
5. Linee di cellule staminali derivate da villi corionici umani e liquido amniotico: una nuova prospettiva di terapia cellulare <i>P. De Coppi</i>	» 26
6. Mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche <i>L. Salvaneschi</i>	» 28
7. Allestimento di colture di cellule staminali somatiche <i>T. Neri</i>	» 38
8. Caratterizzazione e manipolazione ex-vivo delle cellule staminali emopoietiche W. Piacibello	» 45
9. Modificazione genetica delle cellule staminali <i>F. Mavilio</i>	» 47

Plasticità delle cellule staminali somatiche

10. Basi molecolari della plasticità differenziativa delle cellule staminali emopoietiche <i>S. Ferrari</i>	» 51
11. Rigenerazione dell'endotelio vascolare da cellule staminali somatiche <i>F. Bertolini</i>	» 56

12. Differenziazione e determinazione dei progenitori neurali <i>L. Magrassi</i>	» 59
13. Plasticità delle cellule staminali neurali <i>A. Vescovi</i>	» 64
14. Differenziazione di midollo osseo umano adulto in cellule muscolari scheletriche <i>D. Soligo, P. Bossolasco</i>	» 69
15. Danno tissutale e induzione di plasticità, transdifferenziazione, fusione cellulare <i>C. Bernasconi</i>	» 77

Studi preclinici

16. Muscle regeneration by bone marrow-derived progenitors <i>G. Ferrari</i>	» 85
17. Quali cellule staminali somatiche per riparare un danno miocardico? <i>R. Lorusso, G. de Cicco</i>	» 89
18. Neuroprotezione e rimielinizzazione <i>G. Martino</i>	» 96
19. Rigenerazione di tessuto epatico con infusione di cellule staminali: modelli animali <i>M. Muraca</i>	» 108
20. Cellule staminali mesenchimali: biologia e applicazioni cliniche <i>C. Carlo Stella, M. Di Nicola</i>	» 110

Impiego clinico: attualità e prospettive

21. Terapia trapiantologica con cellule staminali emopoietiche delle malattie autoimmuni gravi/refrattarie, immunosoppressione, immunomodulazione, e/o abrogazione di autoimmunità? <i>A. Marmont</i>	» 119
22. Trapianto di cellule staminali nelle distrofie muscolari <i>N. Bresolin</i>	» 123
23. Possibilità di intervenire con protesi biologiche nella terapia della malattia di Parkinson <i>A. Albanese</i>	» 125
24. Treatment of ischemic heart disease with adult stem cells <i>C. Stamm</i>	» 133
25. Cellule staminali come cura per l'insufficienza renale acuta <i>M. Morigi</i>	» 134

Presentazione

Nell'ambito degli studi di Biologia e Medicina un indirizzo oggi particolarmente importante è quello di favorire l'incontro fra la ricerca scientifica di base e l'applicazione pratica in clinica. Per raggiungere tale scopo il Collegio Ghislieri, utilizzando i fondi che gli vengono annualmente erogati dalla Fondazione MINTAS, ha deciso di attuare diverse iniziative: organizzare corsi di formazione avanzata, assegnare borse di studio, finanziare progetti di ricerca, stipulare accordi e convenzioni con altre Istituzioni o Enti culturali e di ricerca. In ottemperanza al Regolamento del proprio "Centro per la Comunicazione e la Ricerca", il Comitato scientifico dell'area di Biologia e Medicina ha quindi esaminato ed approvato nel giugno scorso l'organizzazione del 1° corso di formazione avanzata: "Cellule staminali somatiche da adulto nella medicina rigenerativa".

Il rationale seguito nella formulazione del programma scientifico del corso è stato di trattare in successione, in sessioni e giornate diverse, i seguenti argomenti: premesse di biologia delle cellule staminali, manipolazione in vitro delle cellule staminali somatiche, plasticità differenziativa delle cellule staminali, studi preclinici, attualità e prospettive dell'impiego clinico. Le lezioni vengono tenute da Docenti italiani e stranieri, esperti a livello internazionale dei singoli argomenti trattati. Esprimo a tutti i Docenti il più vivo ringraziamento del Collegio Ghislieri e mio personale per aver generosamente accettato il nostro invito a svolgere un gravoso impegno didattico.

I corsi sono infatti impostati secondo particolari modalità didattiche, che consentono un'ampia e organica presentazione di ciascun argomento, seguita dalla possibilità di un'efficace e proficua discussione fra docenti e discenti. Il numero dei partecipanti a ciascun corso è necessariamente limitato ad un massimo di trenta. I partecipanti vengono ammessi in base al parere espresso da una Commissione costituita da componenti del Comitato Scientifico di Biologia e Medicina, in considerazione dei titoli di merito. Dieci dei trenta partecipanti possono usufruire di una borsa di studio, che consiste nella copertura della tassa di iscrizione e delle spese di residenza presso le strutture del Collegio. L'attribuzione di borse di studio residenziali sottolinea la caratteristica "collegiale" di questi corsi. Tale caratteristica, che consente di far incontrare per una settimana docenti di provata esperienza e discenti veramente interessati ai temi trattati, rappresenta anche un'occasione di scambio di idee, di confronto scientifico, di impostazione di programmi di studio, di future collaborazioni.

Per fornire ai partecipanti una guida sugli argomenti trattati, viene loro consegnato un fascicolo che raccoglie i brevi testi delle singole lezioni. Rinnovo i nostri ringraziamenti ai Docenti che hanno inviato anche il testo riassuntivo della loro lezione.

Carlo Bernasconi

Pavia, 8 novembre 2004

**BIOLOGIA DELLE CELLULE
STAMINALI**

Clonazione: storia e tecniche. Dalle cellule staminali embrionali all'architettura funzionale dei tessuti

Carlo Alberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia

La capacità tecnica di manipolare spermatozoi, oociti e cellule dei primi stadi embrionali nei mammiferi, è giunta in anni recenti ad aprire prospettive applicative, nell'ambito della biologia della riproduzione animale ed umana, tali da porre imperative domande legate alle conseguenze del loro impiego. Queste sono fondamentalmente due: l'una rivolta a capire quale effetto avrà sulla biodiversità se la fecondazione artificiale con pochi riproduttori diverrà la sola tecnica di riproduzione impiegata per gli animali di interesse economico, l'altra legata agli aspetti bioetici. Si scontrano su questo terreno le due vocazioni della ricerca scientifica, come la storia della scienza insegna, quella applicata e quella di base. Ciò che abbiamo appena ricordato cade infatti nella sfera di applicazioni di tipo mercantile di ricerche che hanno sì contribuito enormemente all'avanzamento delle conoscenze scientifiche di base, ma che ancora necessitano di tanto tempo e molti investimenti per giungere ad avere una idea più chiara di fenomeni biologici che comunque siamo già in grado di tradurre in applicazioni commerciali. A più di 200 anni dalla prima fecondazione artificiale (1781) per opera di **Lazzaro Spallanzani** (1729-1799) ancora grande resta la nostra ignoranza degli eventi che regolano le primissime fasi dello sviluppo embrionale. La fecondazione ha inizio con la fusione tra la cellula germinale femminile (cellula uovo) e quella maschile (spermatozoo) a formare lo zigote. Lo zigote è la prima cellula del nuovo individuo che inizia a dividersi in due cellule, poi quattro, otto, sedici, trentadue e così via fino al completo sviluppo del nuovo individuo. **August Weissman** (1834-1914) per primo postulò che durante la moltiplicazione cellulare le cellule somatiche si differenziano a formare i diversi organi e strutture che compongono l'intero corpo, mentre le cellule germinali mantengono l'insieme dell'informazione ereditaria che verrà tramandata di generazione in generazione.

Studi successivi condotti da grandi embriologi quali **Hans Driesch** (1876-1941) e **Hans Spemann** (1869-1941) arrivarono a chiarire, nei modelli prediletti dalla biologia dello sviluppo e cioè il riccio di mare, la rana ed i tritoni, i momenti durante lo sviluppo embrionale in cui la via differenziativa delle diverse linee di sviluppo assumeva le caratteristiche di "non ritorno". In particolare, Hans

Spemann dimostrò con i suoi esperimenti, che la determinazione è un processo progressivo, attivo durante lo sviluppo embrionale, che porta le cellule dell'embrione a seguire una via differenziativa irreversibile da un certo stadio di sviluppo in poi. Egli intuì che i criteri per la differenziazione cellulare sono di tipo *operativo*, poiché nell'embrione iniziale, non riscontrava una evidente differenziazione morfologica cellulare. Rimaneva però aperto il quesito: *'La differenziazione cellulare è un processo terminale oppure il programma genetico di una cellula differenziata può essere riprogrammato?'*. Per rispondere a quest'ultima domanda, Spemann propose nel 1938 quello che lui stesso definì "un fantastico esperimento". Egli suggerì di prelevare il nucleo da una cellula di un embrione in avanzate fasi di sviluppo (oppure di un individuo adulto) e trasferirlo nel citoplasma di una cellula uovo enucleata, privata cioè del proprio nucleo, del proprio corredo genetico. In altre parole propose un esperimento di trasferimento nucleare per capire se il nucleo di una cellula differenziata era in grado di riprogrammare l'informazione espressa e di controllare lo sviluppo embrionale. Purtroppo l'avanzamento delle conoscenze scientifiche necessita non solo di idee brillanti, ma anche di opportunità tecniche. Spemann non fu in grado di condurre l'esperimento, per la mancanza di strumenti adatti alla manipolazione e alla dissezione delle cellule somatiche e germinali utili al trasferimento nucleare: saranno necessari 14 anni prima che gli embriologi riescano a cimentarsi con l'esperimento proposto da Spemann.

Nel 1952 due ricercatori americani, **Robert Briggs** e **Tom J. King**, utilizzando una pipetta di vetro molto sottile estrassero il nucleo da una cellula di embrione di *rana* allo stadio di blastula e lo trasferirono in una cellula uovo enucleata. L'embrione così costituito raggiunse lo stadio di girino ma non fu in grado di arrivare allo stadio di adulto.

Il lavoro di Briggs e King aveva per la prima volta posto le basi sperimentali, (definendo gli strumenti e le tecniche necessarie per eseguire l'esperimento proposto da Spemann) per giungere ad ottenere le due più importanti risposte che la comunità scientifica attendeva in quegli anni:

- 1) l'informazione genetica contenuta nel nucleo di una cellula differenziata è ancora presente nella sua totalità fisica? E se lo è, può essere di nuovo riprogrammata per lo sviluppo di un nuovo individuo?
- 2) le interazioni tra il citoplasma dell'oozita ed il nucleo trasferito sono in grado di de-differenziare il nucleo introdotto e di dirigere poi lo sviluppo di un nuovo individuo? Passarono quasi quindici anni e nel 1966 **John Gurdon**, dell'Università di Cambridge in Gran Bretagna, pubblicò un lavoro straordinario in cui, utilizzando la metodica di Briggs e King, dimostrava di aver ottenuto lo sviluppo di un embrione, generato dal trasferimento di un nucleo di una cellula differenziata prelevata dall'intestino di un girino di *Xenopus* in un'oozita enucleata, fino al completamento dello stadio larvale. Gurdon aveva dimostrato che i nuclei di cellule somatiche differenziate, trasferiti nel citoplasma di una cellula uovo enucleata sono in grado di modificare il loro programma genetico fino ad assumerne uno nuovo, di tipo embrionale e quindi capaci di iniziare e proseguire lo sviluppo larvale. Sul finire degli anni '70

quindi il “fantastico esperimento” proposto da Spemann aveva avuto luogo, sebbene nessun embriologo fosse stato ancora in grado di ottenere un individuo adulto dal trasferimento di nuclei somatici differenziati prelevati da girini oltre lo stadio differenziativo di girino in grado di alimentarsi, né tantomeno da individui adulti.

Nel 1981 un giovane ricercatore americano, **Peter Hoppe**, ed un brillante ricercatore di origine tedesca, **Karl Illmensee**, pubblicarono un articolo sostenendo di aver ottenuto dei topolini in seguito al trasferimento di nuclei di cellule embrionali allo stadio di blastocisti in oociti enucleati. Con il loro lavoro, Hoppe ed Illmensee riuscendo a micro-manipolare il gamete femminile e l'embrione preimpianto di un topolino, dimostrarono la possibilità di clonare anche i Mammiferi classe alla quale appartiene anche l'uomo. Di nuovo, l'esperimento di Hoppe ed Illmensee aveva dimostrato la pluripontezialità dei nuclei di cellule embrionali, il passo successivo, la clonazione a partire da nuclei prelevati da cellule di individui adulti, avrebbe definitivamente dimostrato la reversibilità dei processi attivi nella determinazione del differenziamento cellulare. Purtroppo, nonostante i numerosi tentativi di ripetere l'esperimento di Illmensee e Hoppe nessun ricercatore riuscì più ad ottenere il completo sviluppo di un embrione di topo, nemmeno embriologi del calibro di James McGrath e Davor Solter, i quali tentarono di clonare topi a partire da nuclei prelevati da blastomeri di embrioni a 2, 4, 8 cellule sino alla blastocisti (stadio utilizzato da Hoppe ed Illmensee) con risultati sempre negativi. Nel 1984, in un articolo pubblicato sulla rivista *Nature*, essi dichiararono che “la clonazione di topi, utilizzando tecniche di trasferimento nucleare, è biologicamente impossibile”.

Gli stessi Illmensee ed Hoppe, non furono più in grado di ripetere con successo i risultati riportati nell'articolo del 1981, e l'intero gruppo di ricerca ormai screditato dal punto di vista accademico, si sciolse. Tale fu l'impatto sulla comunità scientifica che i finanziamenti ai laboratori di embriologia impegnati in ricerche di base sui fenomeni biologici che regolano lo sviluppo embrionale e la differenziazione cellulare (e che per questi studi utilizzavano tecniche di trasferimento nucleare) vennero bloccati. In seguito, la clonazione di mammiferi perse di interesse per i biologi dello sviluppo ma continuò nell'ambiente veterinario per l'interesse applicativo in ambito zootecnico. In quest'ambito infatti, le potenziali ricadute economiche derivanti dall'opportunità di ottenere con successo animali (bovini, suini etc) identici agli individui donatori di un genoma (quindi del nucleo utilizzato nel trasferimento nucleare) ricco di tratti genetici di interesse commerciale risultano immediatamente evidenti. Due erano i laboratori impegnati in questo tipo di ricerche, quello di **Steen M. Willadsen** in Gran Bretagna e quello di **Neil First** negli Stati Uniti d'America. Nel 1986, Willadsen annunciava di aver clonato delle pecore trasferendo nuclei di embrioni preimpianto in oociti enucleati. Nel giro di pochi mesi (1987) Neil First pubblicava un articolo dimostrando di aver ottenuto nel suo laboratorio dei vitelli a partire da cellule embrionali preimpianto e più tardi ottenne un nuovo successo a partire da cellule della blastocisti, le stesse cellule del nodo embrionale utilizzate anni prima negli esperimenti di Illmensee e Hoppe sul topo. Impiegando tecniche di

trasferimento nucleare a partire dal 1986 ad oggi sono stati ottenuti migliaia di bovini, suini, ed ovini. Nel 1996, il gruppo diretto da **Ian Wilmut**, dell'Istituto Roslin di Edinburgo in Scozia, dalla disgregazione delle cellule del nodo embrionale di pecora ottenne circa 20 cellule che non saranno utilizzate come tali, ma bensì coltivate *in vitro* per alcuni giorni, così da ottenere una popolazione di migliaia di cellule identiche tra loro. Ciascuna di queste cellule era potenzialmente in grado di dare origine ad un individuo clonato, identico alle altre migliaia di individui ottenibili a partire dalle cellule embrionali della stessa popolazione.

Nonostante la clonazione di individui a partire da cellule embrionali non costuisse più una novità almeno in ambiente zootecnico, la notizia, nel febbraio del 1997, sempre ad opera del gruppo di ricerca diretto da Ian Wilmut, apparsa sulla rivista *Nature* della nascita di un agnello a partire da un oocita enucleato nel quale era stato trasferito un nucleo di una cellula somatica di pecora adulta, colse di sorpresa la comunità scientifica internazionale. Esaminiamo da vicino l'esperimento di Wilmut. Cellule della ghiandola mammaria furono disgregate e mantenute, per un periodo di due settimane, in un terreno di coltura privo di alcuni nutrienti al fine di rallentarne la divisione cellulare e bloccarle in una fase del ciclo cellulare detta G0. Le cellule furono poi incubate in un terreno contenente il virus Sendai che legandosi alla membrana plasmatica della cellula somatica facilitava, successivamente al trasferimento di quest'ultima nello spazio perivitellino dell'oocita, la sua fusione con l'oocita.

Nell'esperimento del gruppo scozzese furono trasferite 277 cellule somatiche in altrettanti oociti. Di questi oociti, 29 (10,5%) si svilupparono fino allo stadio di morula/blastocisti trasferiti poi nell'utero di 13 femmine. Di queste 29 blastocisti, 1 completò lo sviluppo fino alla nascita di un agnello, chiamato Dolly. Dall'analisi critica del lavoro del gruppo scozzese emerge un punto di estrema rilevanza concettuale: l'impossibilità di riconoscere tra le cellule disgregate della ghiandola mammaria quale abbia contribuito alla nascita di Dolly. In seguito alla disgregazione delle ghiandole mammarie si ottengono diversi tipi cellulari isolati, cellule epiteliali, fibroblasti e linfociti di cui è però molto difficile distinguere le caratteristiche morfologiche, il fenotipo, dopo essere state a lungo coltivate *in vitro*. Quindi, ad oggi, non conosciamo quale sia la cellula somatica che ha permesso la nascita di Dolly. Anche se la procedura adottata dal gruppo scozzese si è rivelata aperta a critiche, non vi è dubbio però sul fatto che questo esperimento rappresenta un *passaggio* importantissimo nella storia dell'embriologia e finalmente, a ottanta anni dagli esperimenti di Spemann, siamo in grado di dare una risposta alle domande allora poste: il genoma di una cellula somatica di mammifero adulto può essere riprogrammato all'interno del citoplasma di un oocita enucleato ed è in grado di sostenere lo sviluppo embrionale a termine fino alla nascita di un nuovo individuo.

Rimangono comunque completamente oscuri quali siano i meccanismi e le molecole coinvolte in questo processo di riprogrammazione del genoma della cellula somatica dopo il suo trasferimento all'interno dell'oocita. La pecora purtroppo non rappresenta il modello animale ideale per gli studi di base che porte-

ranno alla comprensione di questi fenomeni. Le conoscenze di biologia della riproduzione, di embriologia molecolare e più in generale di genetica di questo animale sono estremamente limitate. Al contrario, il topo rappresenta il modello sperimentale ideale perché è il mammifero di cui meglio conosciamo la genetica, insieme all'uomo, la biologia della riproduzione e dello sviluppo. Il topolino rappresenta quindi il modello animale più prezioso per la ricerca biomedica. Alla nascita di Dolly, i biologi dello sviluppo sono tornati a chiedersi quali siano i fattori che permettono ad uno zigote ottenuto dal trasferimento nucleare di terminare lo sviluppo. Un aspetto importante che distingue lo sviluppo preimpianto di pecora da quello di topo riguarda le modalità ed i tempi di attivazione dei geni embrionali. In tutti i mammiferi le prime fasi dello sviluppo embrionale a partire dallo zigote avvengono grazie agli RNA messaggeri (mRNA) e alle proteine di origine materna, ovvero presenti nel citoplasma dell'ovocita e prodotti durante l'oogenesi. Questi mRNA e queste proteine andranno, col procedere dello sviluppo embrionale, esaurendosi e quindi l'embrione dovrà sintetizzarne di nuovi. L'attivazione del genoma embrionale (in inglese detta anche *zygotic genome activation*, ZGA) avviene durante lo sviluppo preimpianto in momenti diversi nelle diverse specie di Mammiferi. Nel topo lo ZGA avviene a partire dall'embrione a 2 cellule, nell'embrione umano a partire da 4 cellule, nel coniglio e nella pecora a 16/32 cellule. L'embrione di pecora raggiunge lo stadio a 32 cellule 2,5 giorni dopo la fecondazione (o dopo il trasferimento del nucleo somatico), mentre il topo raggiunge lo stadio di 2 cellule, 15-20 ore dopo la fecondazione. Ne consegue che l'embrione di pecora, rispetto a quello di topo, dispone di una maggior quantità di tempo per modificare il programma genetico del genoma della cellula somatica. L'embrione di topo, ottenuto dopo trasferimento di un nucleo somatico, deve avere il nuovo programma genetico adatto allo sviluppo dell'embrione già pronto allo stadio di 2 cellule. Questa differenza era ritenuta da molti embriologi fondamentale nello spiegare gli insuccessi con il modello topo.

Nel luglio del 1998 la rivista scientifica *Nature* pubblica un lavoro ove si riporta la nascita di alcuni topolini da embrioni ottenuti dal trasferimento di nuclei somatici in oociti enucleati. Il gruppo di ricerca è diretto dal Prof. **Ryuzo Yanagimachi** e comprende ricercatori giapponesi, inglesi, italiani (M.Z. tra gli autori del presente articolo) ed americani.

Come ricordato, un punto critico dell'esperimento di Wilmut e collaboratori riguardava l'impossibilità di conoscere il fenotipo della cellula somatica utilizzata per il trasferimento nucleare. Il gruppo diretto da Yanagimachi ha utilizzato tre tipi cellulari di cui erano perfettamente noti l'origine ed il fenotipo. Le cellule follicolari del cumulo ooforo, le cellule del Sertoli e le cellule nervose. Tutti e tre questi tipi cellulari hanno smesso di moltiplicarsi e sono uscite dal ciclo cellulare, sono inoltre terminalmente differenziate. Al momento dell'isolamento si trovano in quella che è conosciuta come fase G_0 del ciclo cellulare. Le cellule follicolari a centinaia circondano l'ovocita ovulato a formare una corona (il cumulo ooforo). Le cellule del Sertoli rappresentano la componente somatica del tubulo seminifero e regolano l'andamento della spermatogenesi. Le cellule nervose uti-

lizzate provengono dalla corteccia cerebrale di individui adulti. Diversamente dal gruppo di Ian Wilmut, che ha scelto di trasferire la cellula somatica intera nello spazio perivitellino dell'ovocita e mediare la fusione tra le membrane plasmatiche con un virus, Yanagimachi e collaboratori hanno preferito estrarre il nucleo dalle cellule somatiche prescelte e trasferirlo direttamente all'interno del citoplasma dell'ovocita.

Nell'esperimento, l'immediata verifica del successo della clonazione avviene verificando il colore del pelo dei topolini. Sono stati infatti utilizzati tre ceppi di topolini caratterizzati dal diverso colore del pelo: un ceppo a pelo nero donatore delle cellule somatiche e quindi dei nuclei trasferiti, un ceppo a pelo grigio donatore delle cellule uovo ed un terzo ceppo a pelo albino di femmine pseudo-gravide deputato a portare a termine la gravidanza dopo il trasferimento degli embrioni allo stadio di blastocisti. La possibilità di indurre uno stato di pseudo-gravidanza nelle femmine di topo è molto utile ai ricercatori. La pseudo-gravidanza infatti viene ottenuta accoppiando la femmina di topo con un maschio sterile: la condizione ormonale che sostiene lo stato di gravidanza ha inizio con l'accoppiamento, indipendentemente dalla presenza di spermatozoi e dalla avvenuta fecondazione delle cellule uovo. I ricercatori possono così trasferire nell'utero della femmina pseudogravida degli embrioni ottenuti *in vitro*, i quali potranno impiantarsi sulle pareti di un utero già pronto ad accoglierli. Dei tre tipi cellulari impiegati, cellule follicolari, del Sertoli e cellule nervose, solo le cellule follicolari hanno dimostrato la capacità di sostenere lo sviluppo di embrioni normali ed in grado di procedere attraverso tutte le tappe dello sviluppo fetale sino alla nascita di nuovi individui. Raggiunto lo stadio di blastocisti gli embrioni sono stati trasferiti nelle femmine pseudogravide albine. Al termine della gravidanza sono nati topolini il cui pelo, dopo circa 15 giorni si è rivelato nero, così come ci si attendeva. Il primo topolino femmina così ottenuto è stato chiamato Cumulina per la sua derivazione da una cellula del cumulo ooforo, ottenuta con la tecnica ora esposta e chiamata "tecnica di Honolulu". In seguito, Cumulina è stata accoppiata con un maschio fertile e dopo 19 giorni di gravidanza ha partorito alcuni piccoli.

La maggior parte degli embrioni ottenuti con il trasferimento di nuclei di cellule del Sertoli si sono impiantati sulla parete dell'utero, ma non hanno proseguito lo sviluppo embrionale e solo in un caso un embrione si è sviluppato fino allo stadio di 8-9 giorni. I risultati peggiori in termini di sviluppo embrionale sono stati ottenuti con i nuclei delle cellule nervose i cui embrioni non si sono mai sviluppati oltre lo stadio di blastocisti e solo in rari casi si sono impiantati sull'utero delle femmine pseudogravide.

Il colore del pelo non è stato l'unico marcatore genetico impiegato per provare che i topolini nati con la tecnica di Honolulu erano cloni. Anche altri marcatori genetici sono stati utilizzati tipizzando il DNA dei tre ceppi di topoline impiegate nell'esperimento.

L'esperimento condotto da Yanagimachi e collaboratori con le cellule follicolari ha stabilito con chiarezza che il nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate, trasferito nel citoplasma di una cellula uovo, può perdere il proprio pro-

gramma genetico ed acquisirne uno nuovo in grado di iniziare e terminare lo sviluppo embrionale sino alla nascita di un nuovo individuo: dal punto di vista genetico, il nuovo individuo è un clone del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare. Diverse altre decine di topoline sono nate con il trasferimento di nuclei di cellule follicolari.

La ricostruzione storica degli esperimenti che hanno portato alla clonazione di Anfibi prima e di Mammiferi poi mostra quanto importante nella scienza sia l'idea che porta a concepire un esperimento (Spemann pensò alla clonazione nel 1938), ma quanto indispensabile sia anche lo sviluppo di nuove tecniche e strumenti necessari alla sperimentazione. È stato il miglioramento progressivo negli anni delle tecniche di micromanipolazione di gameti ed embrioni preimpianto che ha permesso sia il trasferimento nucleare da una cellula somatica alla cellula uovo enucleata con il minimo danno possibile, sia un aumento sempre maggiore del numero di embrioni manipolati così ottenuti.

La tecnica di trasferimento nucleare impiegata per l'ottenimento di Cumulina appare di estrema utilità per lo studio e la comprensione dei meccanismi molecolari che regolano le prime fasi dello sviluppo dell'embrione di mammifero. È questo infatti un modello di studio che permetterà di capire come una cellula uovo sia in grado di riprogrammare il DNA di una cellula somatica ponendolo in grado di iniziare e completare lo sviluppo embrionale.

Fenomeni simili di azzeramento parziale o completo della "memoria" genetica di una cellula sono noti nel caso della crescita neoplastica, quando una cellula perde quelle che sono le proprie caratteristiche differenziative e, non riconoscendo più alcun segnale di inibizione, continua a proliferare con caratteristiche simili a quelle delle cellule dei primi stadi embrionali. La cellula uovo è straordinaria nelle sue capacità di riprogrammare il DNA del nucleo della cellula somatica che è stata introdotta al suo interno. Essa è chiaramente in grado di *guidare* il DNA della cellula somatica verso un destino differenziativo che è quello caratteristico dello sviluppo embrionale.

La scoperta che anche nei mammiferi la differenziazione cellulare non è un processo terminale, ma può essere modificato, apre enormi possibilità sia nell'ambito della ricerca di base che in quella bio-medica e farmacologica. Quando avremo capito nei dettagli come sia possibile riprogrammare l'informazione genetica di una cellula somatica (e questo richiederà ancora molti anni di ricerca), disporremo di quelle conoscenze e di quegli strumenti concettuali che ci permetteranno di ripercorrere, passo per passo, gli eventi che portano alle trasformazioni tumorali, di individuarne i meccanismi molecolari che li presidono e guidano. Potrebbe quindi diventare possibile un intervento terapeutico in grado di riprogrammare le cellule tumorali e farle "rientrare" nel sentiero differenziativo che avevano ormai perso. La tecnica del trasferimento nucleare sviluppata dal gruppo di Yanagimachi offre ai biologi l'opportunità di impiegare un laboratorio di biologia cellulare e molecolare già confezionato dalla natura, l'oocita, o meglio il citoplasma dell'oocita, per svelare in termini di cinetica dello sviluppo quegli aspetti, e sono molti, ancora oscuri dell'interazione nucleo-citoplasmatica che presidono alle espressioni del genoma nel vivente.

Bibliografia essenziale

1. Briggs R. e King T.J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into trophoblast: studies on polyploid. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 27: 447-465, 1952.
2. Gurdon J.B., Laskey R.A. e Reeves O.R. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 34:93-112, 1975.
3. Illmensee K. e Hoppe P.C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23:9-18, 1981.
4. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-3, 1997.
5. Wakayama T., Perry A.C.F., Zuccotti M., Johnson K.R. e Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394: 369-374, 1998.

Molteplici sorgenti di cellule staminali somatiche da adulto

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia

Esistono due tipi di cellule staminali: le *cellule staminali embrionali*, isolate dalle cellule più interne della blastocisti e capaci di generare i tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma), e le *cellule staminali somatiche*, che nell'individuo adulto si trovano in vari distretti tissutali e sono preposte a generare le cellule differenziate specifiche di quel determinato tessuto.

In base alla loro potenzialità differenziativa le cellule staminali possono essere distinte in: *totipotenti* se generano cellule di tessuti embrionali ed extra-embryonali, *pluripotenti* se generano cellule di tutti i tessuti embrionali, *multipotenti* se generano sottogruppi di linee cellulari, *oligopotenti* se generano sottogruppi ristretti di linee cellulari, *unipotenti* se generano un solo tipo di cellule mature.

Secondo le conoscenze biologiche classiche la cellula staminale somatica è quella cellula capace di rinnovare le cellule del suo stesso tessuto di appartenenza, andate distrutte per il ricambio fisiologico o a seguito di un danno tissutale. Le sue caratteristiche biologiche essenziali sono:

- 1) la capacità di autorinnovarsi;
- 2) la capacità di trasferire il proprio patrimonio genetico a tutte le cellule figlie (clonogenicità);
- 3) la capacità di dare origine ad una popolazione cellulare costituita da progenitori, che sono commissionati verso una determinata linea cellulare e hanno perso la capacità di autorinnovarsi, e da cellule con vari livelli di differenziazione sino agli elementi maturi.

Le cellule staminali somatiche possono essere distinte l'una dall'altra in base ai tessuti da cui vengono raccolte. L'elenco delle cellule staminali tessuto-specifiche sinora identificate comprende cellule di origine ectodermica (cellule staminali cutanee, dei follicoli piliferi, del tessuto nervoso), mesodermica (cellule staminali ematopoietiche, mesenchimali, del cordone ombelicale, del muscolo scheletrico, del muscolo cardiaco) endodermica (cellule staminali delle isole pancreatiche, cellule ovali del fegato). Come già affermato, la loro primaria direzione di differenziazione è diretta nell'ambito del tessuto di appartenenza (Tab. 1). Recentemente, è stato però dimostrato che alcune cellule staminali somatiche

possono differenziare al di fuori del loro tessuto di origine; ad esempio cellule staminali del midollo osseo possono dar origine a cellule endoteliali, epatiche, muscolari, nervose; alternativamente, cellule staminali del fegato, del muscolo o del tessuto nervoso possono dar origine alle cellule del sangue.

Le cellule staminali adulte più studiate sono quelle che hanno sede nel midollo osseo. Nell'ambito di tale popolazione cellulare è possibile distinguere:

1) *cellule staminali ematopoietiche*, la cui esistenza è provata dalla ricostituzione ematologica dopo chemioterapia mieloablattiva, presentano fenotipo CD34+CD38- e CD34-CD38-, in coltura formano colonie e in vivo danno origine alle varie linee maturative ematiche;

2) *cellule staminali mesenchimali*, che in coltura crescono come cellule aderenti e hanno una sopravvivenza definita, in risposta ad appropriati stimoli si differenziano in osteoblasti, condroblasti e adipociti, sono sempre CD45- ma non presentano un fenotipo caratteristico.

Ultimamente ha richiamato particolare attenzione l'osservazione della possibilità che alcune cellule staminali somatiche nell'adulto possano avere proprietà simili a quelle delle cellule staminali embrionali. Mentre sino ad ora non esiste la prova sicura che queste cellule esistano nei tessuti normali, cellule staminali adulte mul-

Tab. 1 - Cellule staminali somatiche nell'uomo adulto e loro primaria direzione di differenziazione.

Tipo cellulare	Localizzazione tessuto-specifica	Cellule o tessuti prodotti
C.s. ematopoietiche	Midollo osseo, sangue periferico	C. linfemopoietiche midollari e del sangue
C.s. mesenchimali	Midollo osseo, sangue periferico	Osso, cartilagine, tendine, tessuto adiposo, muscolo, stroma midollare, c. neurali
C.s. neurali	C. ependimali, astrociti (zona sub-ventricolare) del SNC	Neuroni, astrociti, oligodendrociti
C.s. epatiche	Piccoli dotti terminali biliari (canali di Hering)	C. ovali che generano epatociti e c. duttali
C.s. pancreatiche	C. intransulari, c. ovali, c. duttali	C. beta
C.s. muscolo scheletrico o c. satelliti	Fibre muscolari	Fibre muscolari scheletriche
C.s. cutanee (cheratociti)	Strato basale dell'epidermide, bulbo dei follicoli piliferi	Epidermide, follicoli piliferi
C.s. epiteliali del polmone	C. basali e mucipare della trachea, C. bronchiolari di Clara, pneumociti alveolari di II tipo	C. ciliate e mucose, pneumociti di I e II tipo
C.s. epitelio intestinale	C. epiteliali localizzate attorno alla base di ogni cripta	C. di Paneth, enterociti con borbo a spazzola, c. a calice, c. eteroendocrine dei villi

tipotenti sono state trovate dopo coltura di elementi stromali del midollo osseo per un lungo periodo di tempo e in particolari condizioni; si tratterebbe quindi di un tipo particolare di cellule stromali mesenchimali (Jiang et al., 2002). È stato segnalato che queste cellule progenitrici adulte multipotenti (*multipotential adult progenitor cells*, MAPCs) sono in grado di generare molti tipi cellulari, sia in vitro che in vivo, dopo iniezione nella blastocisti embrionale del topo. MAPCs sono state isolate dal midollo osseo sia del topo che dell'uomo; in parecchi laboratori sono allo studio le condizioni per la loro differenziazione in specifici tipi cellulari, comprendenti tessuti di derivazione ecto- meso- ed endo-dermica. Se queste ricerche avranno successo, tali cellule troveranno un largo impiego nell'ambito della medicina rigenerativa, per riparare un ampio spettro di danni tissutali.

Bibliografia essenziale

1. Cai J., Weiss M. L., Rao M.S. "In search of stemness". *Exper. Hematol.*, 32, 585, 2004.
2. Daley G.Q., Goodell M.A., Snyder E.I. Realistic prospect for stem cell therapeutics. *Hematology*, 398, 2003.
3. Grompe M. Adult versus embryonic stem cells: it's still a tie? *Mol. Ther.*, 6, 303, 2002.
4. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34- hemopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells*, 18, 1, 2000.
5. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 318, 41, 2002.
6. Körbling M., Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept? *N. Engl. J. Med.*, 349, 570, 2003.
7. Kuehnle I., Goodell M.A. The therapeutic potential of stem cells from adults. *Brit. Med. J.*, 325, 372, 2002.
8. Verfaillie C.M., Pera M.F., Lansdorp P.M. Stem cells: hype and reality. *Hematology*, 369, 2002.

Riprogrammazione genetica di cellule somatiche differenziate: i citoplasti naturali e artificiali. Definizione di plasticità differenziativa: i geni stemness

Carlo Alberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia

La biologia dello sviluppo vive oggi un periodo particolarmente felice. La genetica e la biologia cellulare che tanto avevano tratto dagli studi di embriologia, riportano ora a questa disciplina un bagaglio di conoscenze e tecniche che permettono agli embriologi di affrontare e, molto probabilmente, di risolvere quesiti che per decenni sono rimasti senza risposta. Tra questi, fin dal secolo scorso, il più avvincente riguarda le modalità con cui avviene il processo di differenziamento cellulare durante l'embriogenesi. In particolare:

- 1) quali sono i meccanismi e le molecole che inducono una cellula indifferenziata verso una via differenziativa piuttosto che un'altra?
- 2) il processo di differenziamento è terminale oppure la cellula può ritornare allo stato iniziale di totipotenza?

Il novecento è stato caratterizzato da grandi scoperte che hanno costituito un momento di svolta nell'ambito delle conoscenze embriologiche. Dopo quasi un secolo di ricerche conosciamo meglio le dinamiche del differenziamento cellulare anche se ci sfuggono ancora quelle dello sviluppo dell'embrione. Lo zigote, formatosi dalla fusione dello spermatozoo con la cellula uovo, è la prima cellula che costituisce il nuovo individuo. Questa cellula possiede tutte le informazioni, a livello nucleare e citoplasmatico, necessarie a dare inizio allo sviluppo dell'embrione. Con il procedere dello sviluppo, le cellule iniziano a differenziarsi, cioè ad assumere caratteristiche e funzioni diverse e parallelamente l'organizzazione dell'embrione diventa sempre più complessa. Il cambiamento nel numero e nella tipologia dei geni che si esprimono in ogni fase temporale dello sviluppo porta dapprima alla determinazione del destino differenziativo delle cellule e in momenti successivi alla loro effettiva differenziazione, ai diversi tipi cellulari che compongono l'organismo adulto. In alcuni tessuti dell'adulto per-

marranno comunque cellule che non andranno mai incontro al processo di determinazione e differenziamento, mantenendo capacità di rinnovo di tipo embrionale. Queste ultime costituiscono le cellule staminali, cellule in grado di sostituire quelle differenzianti nei tessuti caratterizzati da un alto ricambio cellulare causato da processi di continuo differenziamento (ad esempio, le cellule germinali maschili dell'epitelio seminifero o le cellule del tessuto ematopoietico) o da processi di continua morte cellulare (ad esempio nell'epidermide). Le cellule staminali sono pluripotenti, mantengono cioè capacità proliferative durante tutta la vita dell'individuo e si dividono asimmetricamente, con una delle due cellule figlie che rimane di tipo staminale e l'altra che inizia il processo differenziativo. Nei mammiferi, le cellule staminali pluripotenti sono presenti nella massa di cellule del nodo embrionale della blastocisti nelle fasi preimpianto, nell'embrione e nel feto durante lo sviluppo e si ritrovano anche nell'individuo adulto. Con il procedere dello sviluppo embrionale e fetale il numero di cellule staminali si riduce nell'individuo adulto sono presenti solo in alcuni precisi distretti tissutali.

Dall'embrione preimpianto allo stadio di blastocisti si possono isolare le cellule del nodo embrionale e coltivarle fino ad ottenerne migliaia, le cosiddette cellule embrionali staminali (ES cells, Embryonic Stem cells) la cui caratteristica principale è l'elevata capacità di differenziarsi in qualsiasi altro tipo cellulare. Cellule ES di topo sono state differenziate *in vitro* in cellule epiteliali, muscolari, nervose o pancreatiche. Di recente, un gruppo di ricercatori dell'Università di Bonn e del National Institute of Neurological Disorders and Stroke negli Stati Uniti è riuscito a differenziare delle cellule ES in cellule della glia, un tipo di cellula nervosa che produce lo strato di mielina che ricopre le fibre nervose. Queste cellule, quando trasferite nel cervello di topi deficienti per la produzione di mielina, sono state capaci di esprimere una normale attività sintetica di questa proteina. Un altro gruppo di ricercatori della Washington University School of Medicine in St. Louis ha prodotto, sempre a partire da cellule ES, delle cellule nervose immature che se trasferite nella spina dorsale danneggiata di ratti, ne ristabiliscono le normali funzioni. Analoghi tentativi sulle scimmie e su alcuni pazienti (compiuti ad Harvard dal neurobiologo Evans Snyder) fanno ritenere non lontano nel tempo la possibilità di riparare motoneuroni con la riacquisizione delle funzioni deambulatorie. È recente la notizia dell'isolamento e coltura di cellule ES ottenute da blastocisti umane al quattordicesimo giorno di sviluppo. Le blastocisti provengono dalle cliniche di fecondazione *in vitro* e sono embrioni in eccesso che non sono stati trasferiti nell'utero della madre, ma con il consenso dei genitori utilizzate per la ricerca. Uno studio successivo ha anche dimostrato le potenzialità che hanno le cellule ES umane di differenziarsi, come quelle di topo, in altri tipi cellulari.

Nell'embrione postimpianto e poi nel feto sono ancora molte le cellule staminali presenti, anche se difficile è il loro isolamento. Tra le più studiate sono sicuramente le cellule germinali primordiali (PGC, Primordial Germ Cells) che rappresentano lo stadio di differenziamento che precede la formazione delle gonadi. Le PGC fanno la loro comparsa, nell'embrione di topo e umano, alla 1^a e 3^a settimana di sviluppo rispettivamente. Se isolate dall'embrione queste cellule sono in

grado di moltiplicarsi e produrre cellule pluripotenti dette EG (Embryonic Germ cells) in grado, come le cellule ES, di differenziarsi in quasi tutti i tipi cellulari presenti nell'individuo adulto. La loro difficile reperibilità ne ostacola però fortemente il possibile impiego quale sorgente di reagente biologico utile nel trattamento terapeutico di tante patologie.

Nell'individuo adulto si trovano cellule staminali in diversi distretti tissutali differenziati: nel midollo spinale, nell'epitelio seminifero della gonade maschile, nella retina, negli epitelii, nel cervello. Se le cellule staminali di ciascuno di questi distretti vengono isolate e opportunamente coltivate è possibile espanderle di numero e differenziarle nel tipo cellulare specifico del distretto tissutale da cui derivano o anche transdifferenziarle ottenendo così, ad esempio, cellule del sangue a partire da cellule staminali del tessuto nervoso. Il gruppo diretto da Angelo Vescovi ha differenziato cellule muscolari a partire da cellule staminali neuronali. È chiaro che disporre di un reagente biologico quale le staminali, da differenziare nei diversi tipi cellulari, apre nuovi scenari terapeutici: patologie ora poco trattabili, quali l'Alzheimer, il Parkinson, l'infarto, il diabete e molte altre potrebbero essere affrontate con maggior successo grazie alla sostituzione dei tessuti danneggiati.

Le cellule staminali adulte sono purtroppo di difficile reperibilità, poiché numericamente molto scarse; inoltre non possono essere coltivate a lungo, poiché dopo alcune divisioni cellulari, tendono a perdere le caratteristiche di pluripotenzialità. Diversamente, le cellule ES possono essere mantenute in coltura per moltissimi cicli di divisione, addirittura per più di dieci anni, senza perdere di pluripotenzialità.

Una via alternativa per ottenere cellule staminali è il loro isolamento dal cordone ombelicale. Va comunque ricordato che le limitazioni numerica e fisiologica si presentano anche in questo caso, sebbene in minor misura.

Reversibilità del programma differenziativo

Accanto a queste sorgenti fisiologiche di cellule staminali, negli ultimi tre anni, se ne è aggiunta un'altra molto promettente basata sulla possibilità di modificare il programma genetico delle cellule differenziate. Questa nuova possibilità si è sviluppata a partire dal 1997 quando sono stati pubblicati i risultati di alcune ricerche che dimostrano come il programma genetico di nuclei di cellule terminalmente differenziate può essere modificato fino ad una sua completa riprogrammazione. I ricercatori Willmut e Campbell, nella pecora, e successivamente Yanagimachi e collaboratori, nel topo, hanno stabilito con chiarezza che il nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate, quando trasferito nel citoplasma di una cellula uovo, viene riprogrammato ed è capace di iniziare lo sviluppo embrionale e di portare alla nascita di un nuovo individuo. Dal punto di vista genetico il nuovo individuo è una "copia genomica" del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare e quindi possiamo definirlo un clone genetico.

Rimangono oscuri quali siano i meccanismi e le molecole coinvolte in questo pro-

cesso di deprogrammazione e riprogrammazione del genoma della cellula somatica dopo il suo trasferimento nell'ooplasma. È però chiaro, come dimostato da Kikyo e Wolffe, che la riprogrammazione comporta modificazioni nella composizione proteica della fibra di DNA, modificazioni capaci di determinare variazioni regolative della attività di espressione genica: la cromatina si decondensa, la struttura a nucleosomi si destabilizza per la sostituzione degli istoni somatici H₁ con la loro variante oocitaria B₄ e la dissociazione dalla fibra di DNA delle proteine regolatrici.

Attivazione del genoma embrionale

Un aspetto importante che ci aiuta nel definire i tempi in cui avvengono le modificazioni delle funzioni del genoma della cellula somatica, successivamente al suo trasferimento nel citoplasma della cellula uovo, riguarda le modalità ed i tempi di attivazione dei geni embrionali. In tutti i mammiferi le prime fasi dello sviluppo embrionale a partire dallo zigote avvengono grazie agli RNA messaggeri (mRNA) e alle proteine di origine materna presenti nel citoplasma dell'oocita e prodotti durante l'oogenesi. mRNA e proteine materne si esauriscono col procedere dello sviluppo embrionale mentre parallelamente inizia la sintesi di mRNA da parte dell'embrione. L'attivazione del genoma embrionale (ZGA, Zygotic Genome Activation) avviene durante lo sviluppo preimpianto in momenti diversi nelle diverse specie di Mammifero. Nel topo lo ZGA avviene a partire dall'embrione a 2 cellule, nell'embrione umano a partire da 4 cellule, nel coniglio e nella pecora a 16/32 cellule. Se l'embrione non esprime correttamente i geni embrionali entro questi tempi non potrà proseguire lo sviluppo. Ad esempio, lo zigote di topo ottenuto con il trasferimento di un nucleo somatico deve necessariamente avere il nuovo programma genetico attivo allo stadio di 2 cellule per procedere correttamente nello sviluppo embrionale. Ne consegue che per la comprensione dei meccanismi e delle molecole coinvolti nel processo di de-differenziazione e riprogrammazione del genoma dei nuclei somatici, gli studi devono essere effettuati nelle primissime fasi dello sviluppo embrionale preimpianto, nei momenti immediatamente successivi al trasferimento dei nuclei somatici negli oociti enucleati.

Fattori importanti per la riprogrammazione del genoma del nucleo trasferito

Tra i diversi fattori coinvolti nelle prime fasi che seguono il trasferimento del nucleo somatico nell'ooplasma, sicuramente importanti sono il grado di ploidia del genoma (il contenuto in DNA) ed il momento del ciclo cellulare in cui si trova il nucleo trasferito. Si è notato, ad esempio, che il trasferimento di nuclei nella fase G₀ del ciclo cellulare facilita lo sviluppo preimpianto, aumentando il numero di blastocisti ottenute.

Quali sono i meccanismi molecolari ad oggi conosciuti in grado di regolare l'espressione del genoma negli embrioni preimpianto di Mammifero?

Modificazioni epigenetiche: regole e vincoli alle potenzialità del genoma

Sebbene nella maggior parte delle cellule il contenuto in DNA (le dimensioni del genoma) e le sequenze del DNA rimangano invariate col procedere dello sviluppo embrionale, il repertorio di geni che viene espresso in un dato tipo cellulare e in un dato momento del ciclo cellulare è limitato e specifico per ogni tipo cellulare. L'espressione del genoma embrionale viene regolata e limitata da una serie di meccanismi di tipo epigenetico quali la metilazione del DNA, l'organizzazione della cromatina e l'architettura nucleare. Questi meccanismi, attivi durante la gametogenesi e le prime fasi dello sviluppo embrionale preimpianto, sono coinvolti nel modellare e modulare le funzioni del genoma. Cambiamenti in uno o più di questi regolatori epigenetici determinano modificazioni nell'espressione genica.

La metilazione del DNA

La regolazione dell'espressione di molti geni è dipendente dalla presenza/assenza di citosine metilate lungo la sequenza del DNA del gene. La metilazione è associata ad importanti eventi nello sviluppo embrionale quali l'inattivazione del cromosoma X nelle femmine di Mammifero e nel fenomeno dell'*imprinting*, processo che consiste in una marcatura differenziale dei genomi paterno e materno durante la gametogenesi così che l'espressione di alcuni geni dipende dalla loro origine parentale. Il gamete maschile e quello femminile, differenzialmente metilati al momento della fecondazione, hanno una diversa organizzazione della cromatina.

I geni costitutivi (quelli che si esprimono in tutti i tessuti) sono demetilati in entrambi i gameti e si mantengono demetilati durante tutte le fasi dello sviluppo preimpianto; al contrario, i geni tessuto specifici sono fortemente metilati nello spermatozoo e meno metilati nell'ovocita e vanno incontro ad una generale demetilazione durante lo sviluppo preimpianto, per poi essere nuovamente metilati successivamente all'impianto. Questo processo di demetilazione pare necessario per ristabilire uno stato di pluripotenzialità prima dell'inizio della determinazione e differenziazione cellulare che prende il via con la gastrulazione, subito dopo l'impianto, ed è contemporaneo ad una estesa *de novo* metilazione. La presenza di citosine metilate è in grado di modificare la conformazione della cromatina così da facilitare o impedire il legame con fattori o inibitori della trascrizione.

L'organizzazione della cromatina nello spermatozoo, nell'ovocita e nell'embrione preimpianto

L'organizzazione della cromatina cambia durante le gametogenesi maschile e femminile e nel corso delle prime fasi dello sviluppo dell'embrione. Nel gamete maschile gli istoni vengono sostituiti dalle protamine (necessarie a garantire l'alta condensazione della cromatina nella testa dello spermatozoo) durante la sper-

mioistogenesi; queste ultime vengono sostituite a loro volta con proteine istoniche quando lo spermatozoo è penetrato all'interno del gamete femminile durante la decondensazione della cromatina e la formazione del pronucleo.

Durante l'oogenesi, la cromatina si organizza secondo un'architettura ben precisa che permette di identificare due tipi di oociti presenti nel compartimento antrale dell'ovario. Questi oociti sono stati denominati SN (Surrounded Nucleolus) ed NSN (Not Surrounded Nucleolus) per la presenza o assenza rispettivamente di un anello di cromatina attorno al nucleolo e per una cromatina fortemente condensata o dispersa nel nucleo. La differenza tra i due tipi di oociti non è solo morfologica ma è anche funzionale poiché correlata ad una diversa attività genica ed alla possibilità di proseguire (SN) o meno (NSN) nello sviluppo embrionale dopo la fecondazione: solo il tipo SN è in grado di completare lo sviluppo preimpianto.

Dopo la fecondazione, l'organizzazione della cromatina dei gameti maschile e femminile va incontro ad importanti fenomeni di rimodellamento. Nell'embrione preimpianto, la nuova organizzazione della cromatina regola l'espressione genica consentendo una prima ondata di attivazione di geni embrionali a partire dalla fase terminale (G_2) del primo ciclo cellulare ed una espressione genica qualitativamente e quantitativamente più consistente nella fase G_2 del secondo ciclo cellulare, nell'embrione a 2 cellule.

L'architettura del genoma

I cromosomi all'interno del nucleo non sono disposti in maniera casuale, ma occupano precise regioni che variano con il ciclo cellulare così da definire un contesto dinamico che si ripete ad ogni ciclo cellulare. Ciò è stato dimostrato utilizzando una tecnica di ibridazione *in situ* chiamata "chromosome painting", che permette di evidenziare tutto un singolo cromosoma con sonde fluorescenti. Se un cromosoma o una sua porzione viene ad essere spostata dal proprio dominio spaziale (ad esempio in presenza di traslocazioni cromosomiche), allora anche l'espressione dei geni di quella porzione può cambiare.

Cosa accade ad un nucleo di una cellula somatica quando viene trasferito all'interno dell'ooplasma? Le caratteristiche particolari di metilazione, organizzazione della cromatina e architettura del genoma vengono mantenute o variate? La comparazione tra lo status epigenetico del genoma di uno zigote ottenuto normalmente dalla fecondazione di uno spermatozoo e di un oocita con quello di uno zigote ricostituito (ottenuto in seguito al trasferimento nucleare) permette di cogliere quali siano le condizioni necessarie per il proseguimento dello sviluppo embrionale. In questo modo è possibile definire con precisione quali siano i requisiti di metilazione, organizzazione della cromatina e architettura nucleare necessari al corretto sviluppo dell'embrione ed anche quali siano le modificazioni "tollerate" o "tollerabili". Sarà proprio la comprensione di questi "confini" epigenetici entro i quali il genoma si esprime correttamente a definire l'ambito di possibili interventi sperimentali (nella ricerca di base) e terapeutici (nelle applicazioni biomediche).

Riprogrammazione terapeutica delle funzioni del genoma

La comprensione dei meccanismi che intervengono nel differenziamento cellulare e nei processi che lo rendono reversibile apre non solo vasti scenari di conoscenza, ma ancor più vaste possibilità applicative in ambito biomedico e farmacologico. È così possibile prevedere la possibilità di ottenere *in vitro* la de-differenziazione di una cellula somatica prelevata da un individuo adulto e poi di guidarne la re-differenziazione per ottenere un tipo cellulare nuovo in grande quantità, ritrasferibile nel corpo dell'individuo oppure coltivabile fino all'ottenimento di una popolazione omogenea e potenzialmente in grado di progredire nelle fasi successive dell'istogenesi e dell'organogenesi. O ancora, la possibilità di indurre cellule quiescenti a riacquisire funzioni utili in un organismo differenziato o di modificare i meccanismi della progressione neoplastica fino alla completa reversione del tumore ed alla riprogrammazione delle attività normali della cellula.

La più promettente applicazione in ambito biomedico delle tecniche di riprogrammazione delle funzioni del genoma è certamente quella della produzione di popolazioni cellulari o di veri e propri tessuti da trapianto differenziati *ad hoc*. Per le diverse patologie si può prevedere di differenziare *in vitro* i tipi cellulari necessari per la terapia da attuare. Questa via, sebbene ancora non praticabile in tutte le sue tappe, sicuramente offre una prospettiva per i milioni di pazienti affetti da patologie degenerative o croniche la cui incidenza nella popolazione è estremamente elevata.

Le cellule staminali ES e quelle EG sono in grado, in specifiche condizioni di coltura, di generare nuovi tipi cellulari differenziati. L'impiego terapeutico di questi tipi cellulari è però ostacolato da almeno due grandi difficoltà. La prima è costituita dalla difficile reperibilità di cellule staminali dall'adulto e dal fatto che le cellule ES possono essere isolate solo da embrioni, con conseguenti problemi di natura etica. La seconda è legata ad eventuali incompatibilità immunologiche nel trapianto di questi nuovi tessuti. Questo secondo problema può essere risolto impiegando cellule staminali del paziente da curare, quando si riescano ad ottenere, oppure utilizzando campioni di cellule del cordone ombelicale congelate alla nascita.

Una strategia completamente diversa è quella di associare le tecniche del trasferimento nucleare con le metodiche impiegate per il differenziamento delle cellule staminali. È chiaro che anche questa strategia richiede l'uso di oociti, con ciò incontrando sia i problemi di natura etica legati all'impiego ed alla donazione di gameti sia quelli relativi alla salute della donna donatrice di oociti. L'impiego di cellule uovo di altre specie risultata incoraggiante; Tanja Dominko ha dimostrato che il citoplasma dell'oocita di bovino è in grado di determinare la proliferazione cellulare del nucleo di cellule somatiche di ratto, maiale, ariete e scimmia sino alla formazione della cavità del blastocoele. I risultati di questi lavori rendono chiaro che i meccanismi e le molecole che regolano i primi stadi dello sviluppo embrionale e la precoce differenziazione cellulare sono evolutivamente conservati.

In questa prospettiva è quindi prioritario il proseguimento della ricerca in modelli animali sui meccanismi e sulle molecole che governano i fenomeni di de-programmazione e ri-programmazione. Ad oggi, i fattori che più efficacemente stimolano la riprogrammazione del nucleo somatico e che specificano funzionalmente le cellule staminali sono scarsamente conosciuti. Tra i pochi noti, l'espressione della fosfatasi alcalina, del fattore di crescita GDF-3, di trascrizione OCT-4, di repressione *Genesis*, la comparsa delle proteine del gruppo Polycomb e di quelle capaci di legare le isole CpG metilate. Lo scopo di queste ricerche è quello di giungere a riprogrammare *in vitro* i nuclei delle cellule somatiche in assenza del gamete femminile impiegando citoplasti artificiali. Questa strategia di ricerca è fortemente auspicata nel rapporto della commissione di studio sull'uso delle cellule staminali per finalità terapeutiche, presieduta dal Nobel Renato Dulbecco, di recente istituita dal Ministro della Sanità Prof. Umberto Veronesi. Nel *rapporto Dulbecco*, la commissione, recepiti i più recenti avanzamenti delle conoscenze scientifiche nel settore della biologia delle cellule staminali e dopo aver valutato le proposte del rapporto Donaldson (www.doh.gov.uk) per la ricerca sulle cellule staminali, ha sottolineato il fatto che il sostegno alla ricerca sul differenziamento cellulare al fine di ottenere cellule e tessuti è centrale per lo sviluppo delle politiche sanitarie basate sulla medicina ricostruttiva. Si pensi che solo negli USA circa 60 milioni di persone presentano patologie del sistema cardiovascolare (9,5 in Italia), più di 15 sono affette da diabete (2,1), 10 dalla osteoporosi (2,2), più di 4 dall'Alzheimer (0,5) e più di 2 dal Parkinson (0,04).

La ricerca sulle vie di produzione delle cellule staminali ed in particolare il loro impiego nella terapia (altri se ne potrebbero indicare, impiego per saggi di ecotossicologia, di dinamica farmacologica, etc.) costituirà inoltre un vero e proprio Eldorado per le imprese mercantili considerando la loro potenziale efficacia in un contesto di terapia cellulare/tissutale per la sostituzione di cellule o tessuti danneggiati o non funzionanti nella prospettiva di superare il tradizionale trapianto di organo da cadavere. Si pensi alla ricostruzione del midollo spinale danneggiato da traumi fisici o del tessuto cardiaco dopo infarto, alle malattie infiammatorie di natura sistemica (sindrome di Sjögren), grazie alla sostituzione delle cellule delle ghiandole salivari atrofiche o a quelle muscolo-scheletriche (displasia ossea, malattie progressive delle giunzioni ossee, osteogenesis imperfecta, miopatie primitive) ed ancora alle malattie degenerative della retina, della cornea e dell'apparato uditivo, i cui tessuti siano danneggiati per cause genetiche o traumatiche ed infine alle malattie degenerative del sistema nervoso (Alzheimer, morbo di Parkinson, malattia di Huntington, sclerosi laterale amiotrofica). Fattore cruciale per il successo di tutte queste terapie è la quantità di cellule necessarie per trattare un paziente: il materiale embryo/fetale di 5-6 aborti permette la raccolta di un numero di staminali neuronali utili al recupero funzionale (dai 2 ai 5-6 anni) di un solo paziente parkinsoniano. Questi numeri dicono chiaramente che altre fonti di staminali sono necessarie, in attesa di giungere a riprogrammare *in vitro* i nuclei somatici: è dovere della ricerca accademica e della impresa chimico-farmaceutica trovarle.

Lecture consigliate

1. Dominko T., Mitalipova M., Haley B., Neyhan Z., Memili E., Mckusik B., E First N. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species in "Biology of Reproduction", 60, 1496-1502, 1999.
2. Garagna S., Redi C.A., Zuccotti M. Clonazione: storia e tecniche in "Le Scienze", 377, 46-52, 2000.
3. Kikyo N. E Wolffe A.P. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons in "Journal of Cell Science", 113, 11-20, 2000.
4. Lake J.A., Rathjen J., Remiszewski J. E Rathjen P.D. Reversible programming of pluripotent cell differentiation in "Journal of Cell Science", 113, 555-566, 2000.
5. Thomson J.A. e Odorico J.S., Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines in "Trends in Biotechnology", 18, 53-57, 2000.
6. Futuro Bionico. Le Scienze Dossier 4, 2000.
7. Stem cell research and ethics. Science 287, 1417-1446, 2000.

Caratterizzazione biologica delle cellule del cordone ombelicale: Cellule staminali somatiche di origine fetale

Francesco Bertolini

Divisione di Emato-Oncologia, Dipartimento di Medicina,
Istituto Europeo di Oncologia, Milano

Il trapianto allogenico (o da donatore) di cellule staminali (CS) derivate da midollo osseo (MO), sangue periferico (SP) o cordone ombelicale (CO) è attualmente utilizzato per la terapia di pazienti con emopatie maligne, aplasie, alcune immunodeficienze congenite ed alcune malattie metaboliche. Uno dei maggiori limiti all'utilizzo delle CS allogeniche è costituito dalla necessità di reperire un donatore idoneo. Anche se allo stato attuale quasi due milioni di donatori di CS da MO o SP sono iscritti ai Registri Internazionali, il 50% dei candidati al trapianto non riesce a trovare un donatore pienamente compatibile per i diversi loci del sistema maggiore di istocompatibilità HLA. Inoltre, molti gruppi etnici sono scarsamente rappresentati nei registri dei donatori.

In questo contesto, nella prima metà degli anni '90 sono sorti contemporaneamente a New York, Dusseldorf e Milano tre programmi di raccolta di CS da CO (da qui in poi denominate CS-CO) tipizzate per il sistema HLA e disponibili per il trapianto.

Il razionale biologico di questa iniziativa risiedeva in una serie di studi condotti alla fine degli anni '80 che avevano dimostrato la presenza di CS nel CO (Broxmeyer et al., PNAS 1989) e la loro capacità di rigenerare una ematopoiesi completa nei riceventi pediatrici sottoposti a mieloablazione. Il primo paziente trapiantato con CS-CO, affetto da anemia di fanconi, venne trapiantato il 6 ottobre 1988 da una equipe mista franco-statunitense (Gluckman et al., NEJM 1989). Il successo clinico di questo caso fu la prova di principio della possibilità di usare le CS-CO per la terapia dei pazienti pediatrici.

Lo sviluppo delle banche di CS-CO ha quindi permesso negli anni '90 e all'inizio del nuovo secolo di intensificare l'uso di questa risorsa, e recenti review indicano in oltre 3500 i riceventi di trapianti di CS-CO, in larga maggioranza pazienti pediatrici (Cohen e Nagler, Blood Rev 2004) ed in oltre 70,000 le unità di CS-CO tipizzate e disponibili per l'uso clinico (Benito et al., Bone Marrow Transpl 2004).

L'intenso uso clinico delle CS-CO ha permesso di identificare una finestra di opportunità cliniche differente rispetto alle CS da MO o SP. La natura "naive" dei

linfociti presenti nel CO ha infatti consentito l'utilizzo delle CS-CO con una incompatibilità HLA più ampia (1-2 antigeni) rispetto alle CS da MO o SP, senza incorrere in incidenze di malattie da trapianto contro ospite (GVHD) più significative. Studi immunologici hanno inoltre evidenziato come questi stessi linfociti presenti nel CO possano essere attivati nel corso del trapianto in modo da indurre una significativa attività di trapianto contro leucemia (GVL).

Il rovescio della medaglia, emerso soprattutto nella valutazione degli oltre 500 trapianti *sjn* qui effettuati nei pazienti adulti, è dovuto all'esiguo numero di CS presenti in una singola unità di CS-CO. I tempi di attecchimento delle filiere mieloidi, eritroidi e soprattutto megacariocitaria risultano infatti significativamente dilazionati rispetto a quanto osservato nei pazienti adulti trapiantati con CS da MO o SP (Takahashi et al, Blood 2004).

Allo stato attuale, dunque, la ricerca clinica sull'utilizzo delle CS-CO si incentra sulla necessità di superare la barriera costituita dal limitato numero di CS. Due sono le principali strategie in atto: da una parte si cerca di espandere *ex vivo* le CS mediante esposizione a fattori di crescita (SCF, FL, TPO, etc.) e/o linee cellulari (principalmente endoteliali o mesenchimali) con funzione di sostegno alla proliferazione delle CS. Dall'altra si considera la possibilità di utilizzare contemporaneamente più unità di CS-CO.

Gli studi preclinici e clinici delle procedure di espansione *ex vivo* delle CS-CO hanno fin qui dato risultati non conclusivi, soprattutto perchè non è chiaro il potenziale di attecchimento a lungo termine delle cellule poste in coltura (Mazurier et al., Ann NY Acad Sci 2003). Allo stesso modo, alla luce dei primi studi clinici, non è ancora chiaro se l'utilizzo di più unità di CS-CO sia associato ad un beneficio in termini di velocità di attecchimento delle diverse filiere emopoietiche o attività GVL (Barker e Wagner, Nat Rev Cancer 2003). Di particolare interesse appare dunque la recente osservazione dell'aumento del potenziale di attecchimento delle CS emopoietiche conseguente alla modulazione della peptidasi CD26 (Christopherson et al., Science 2004).

La particolare natura delle CS-CO, che le pone in qualche modo a cavaliere tra le CS di derivazione embrionale e le CS dell'adulto, lascia anche intravedere degli utilizzi clinici in grado di sfruttarne le capacità proliferative e di plasticità. Poiché su base mondiale appare chiara la necessità di accedere a nuove sorgenti di cellule mature del sangue per uso trasfusionale, diversi gruppi hanno studiato la possibilità di usare le CS-CO per la produzione *ex vivo* di globuli rossi. Popolazioni di cellule CD34+ del CO sono state espanse *in vitro* verso la filiera eritroide ottenendo una espansione quasi uni-linea di eritroblasti. Queste cellule, iniettate in diversi modelli di topi immunodeficienti, hanno permesso la proliferazione e la differenziazione terminale in globuli rossi maturi e funzionali (Neidez-Nguyen et al., Nat Biotechnol 2002). Resta ancora da valutare la fattibilità su larga scala di questo approccio potenzialmente molto interessante dal punto di vista clinico.

Un altro campo di particolare interesse è rappresentato dalle malattie neurologiche ed in particolare da quelle su base ischemica. Le CS-CO possiedono una particolare plasticità che le rende capaci di generare (sia *ex vivo* che *in vivo*) cellule mature del sistema emopoietico, endoteliale e nervoso (McGukin et al., Exp Cell

Res 2004). In questo contesto, si è recentemente osservato che l'inoculo di cellule CD34+ del CO può portare al recupero funzionale in un modello murino pre-clinico di ictus. In questo modello, infatti, le CS-CO hanno indotto una significativa vasculogenesi e neurogenesi e permesso la ricostituzione di diversi tessuti corticali (Peterson, *J Clin Invest* 2004). Risultati similmente interessanti sono stati ottenuti utilizzando le CS-CO per la terapia delle ischemie indotte agli arti di diversi modelli preclinici (Kawamoto et al *Cardiovasc Radiat Med* 2002) e per la terapia di alcune patologie oculari, dove le cellule CD34+ del CO hanno contribuito alla rivascolarizzazione corneale (Cogle et al., *Blood* 2004). Resta tuttavia da valutare . a livello clinico - quanto possa essere superata la barriera costituita dal sistema di istocompatibilità HLA.

Un aspetto invece ancora controverso è la presenza nel CO di CS capaci di differenziarsi in senso mesenchimale. Alcuni autori hanno escluso la capacità differenziativa in tal senso delle CS-CO, ma un gruppo è recentemente riuscito ad ottenere una proliferazione di in senso osteogenico e condrogenico (Bieback et al., *Stem Cells*, 2004) delle CS da CO.

Linee di cellule staminali derivate da villi corionici umani e liquido amniotico: una nuova prospettiva di terapia cellulare

Paolo De Coppi

Laboratorio Cellule Staminali, Oncoematologia Pediatrica e Chirurgia Pediatrica, Università di Padova

Nell'adulto è chiara la possibilità di ricavare le cellule staminali dal midollo osseo, ma chiare dimostrazioni fanno pensare che in realtà queste cellule siano ubiquitarie e siano alla base della riparazione nei singoli tessuti [A. Atala, R.P.Lanza, in "Methods of Tissue Engineering" Academic Press 2001, Gussoni E et al. Nature. 1999 Sep 23; 401(6751): 390-4, Pittenger MF et al. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". Science. 1999 Apr 2; 284 (5411): 143-7]. Fonte alternativa alle cellule staminali di tipo adulto è rappresentata dalle cellule staminali embrionali, caratterizzate da una elevatissima capacità di replicazione mantenendo inalterata la loro potenzialità differenziativa [Weissman Science 287: 1442, 2000]. Diversi ordini di problemi impediscono l'uso di queste cellule nella pratica clinica. Tali cellule infatti, per poter essere coltivate in vitro necessitano di "feeder layer" da cui nutrirsi; proliferano indefinitamente in vitro e formano teratomi una volta iniettate in vivo; inoltre una volta indotte alla differenziazione solo una parte delle cellule forma il tessuto richiesto, mentre vengono formate in percentuali diverse anche altri tipi di tessuto [Thompson T. "What is the promise of embryonic stem cell research?" J Natl Cancer Inst. 2001 Oct 3; 93(19): 1445-7.]. Da ultimo, limitazioni di carattere etico ne impediscono l'utilizzo clinico in Europa. Recentemente, sangue del cordone ombelicale, già utilizzato nel trapianto allogenico come alternativa alla donazione di midollo osseo da parte di volontari [Broxmeyer et al., Proc Natl Acad Sci USA 86: 3828, 1989], è stato visto che potrebbe rappresentare una valida fonte di cellule staminali. Studi di Broxmeyer, Gluckman et al. (1989) riportano che il sangue ottenuto da cordone ombelicale (UCB) è una ricca fonte di cellule staminali e progenitori ematopoietici (HSPC) e che, inoltre, UCB può essere utilizzato nella pratica clinica per i trapianti di cellule ematopoietiche. Fino ad ora centinaia di trapianti sono stati eseguiti nel mondo, in pazienti - per la maggior parte bambini - con differenti patologie ematologiche e genetiche, quali leucemia linfoide e mieloide, anemia di Fanconi, anemia aplastica, sindrome di Hunter, talassemia tipo beta e neuroblastoma. Inoltre è stato progettato un registro internazionale per il trapianto di UCB, mentre il banking di UCB è già in corso.

Il prelievo dei villi coriali (villocentesi) e del liquido amniotico (amniocentesi) sono state usate per più di vent'anni per la diagnosi prenatale di anomalie cromosomiche. Si tratta di tecniche sicure, utilizzate in periodi diversi della gravidanza, accompagnate comunemente da una bassa morbilità e mortalità. Tra la 10 e la 14 settimana nella diagnosi prenatale precoce si usufruisce oramai da molti anni del prelievo dei Villi Coriali. Tecnica in realtà non priva di rischi, ma comunque in grado di fornire cellule di tipo embrionale (fino alla dodicesima settimana il prodotto del concepimento viene definito appunto embrione per le caratteristiche peculiari che ne caratterizzano il suo sviluppo). Il liquido amniotico che può essere teoricamente prelevato a partire dalla 12 settimana fino al termine della gravidanza, viene normalmente prelevato tra la 14 e la 18 settimana, periodo nel quale il feto subisce un importante rimodellamento che ne segna i tratti finali esterni, liberando un enorme quantità di cellule nel liquido che lo circonda; inoltre altre cellule vengono continuamente liberate da organi e apparati in continuo contatto con il liquido amniotico, quali tratto gastro-intestinale, respiratorio e urinario. Tali cellule, perdendo il contatto con gli stimoli differenziativi provenienti dal tessuto di origine, potrebbero mantenere caratteristiche di pluripotenza. È noto, infatti, che la matrice gioca un ruolo attivo e complesso nella regolazione del comportamento delle cellule con cui entra in contatto, influenzandone lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione, la forma e la funzione metabolica. Le cellule derivate dal prelievo dei Villi Coriali e del liquido amniotico rappresentano l'indubbio vantaggio rispetto alle cellule cordonali di rappresentare uno stadio notevolmente più precoce di differenziazione e pertanto poter essere una fonte di cellule staminali notevolmente più efficace. Inoltre tali cellule, rappresentando uno stadio più precoce, hanno molto probabilmente una più bassa immunogenicità e quindi rappresentare un vantaggio nell'uso del trapianto di tipo allogenico. Partendo da queste considerazioni campioni di fluido amniotico e di villi coriali umani prelevati in epoche diverse durante la gestazione sono stati utilizzati: le cellule sono state isolate, clonate ed espanse in cultura. Per esplorare la loro pluripotenzialità le stesse sono state coltivate in condizioni di induzione endoteliale (EBM2 Medium e VEGF), adipogenica (Desametasone, 3-isobuti-1-metilxantina, insulina ed indometacina), miogenica (siero di cavallo, estratto di embrione di pollo e 5-AZA), osteogenica (siero bovino fetale, desametasone, beta-glicerofosfato, acido ascorbico-2-fosfato), neurogenica (NGF e BHA) ed epatocitaria (siero di bovino fetale, HGF).

Le cellule da noi selezionate avevano capacità clonogenica, mantenevano una normale lunghezza del telomero e un normale cariotipo. I diversi cloni così derivati erano in grado, nelle condizioni descritte precedentemente di andare incontro in vitro a differenziazioni in senso osteogenico, muscolare, adipogenico, endoteliale, neurogenico ed epatocitario. Inoltre, cloni derivati da topo erano in grado, se iniettati in blastocisti di dare origine a diversi tessuti.

Tale modello potrebbe rappresentare un'interessante arma terapeutica nel prossimo futuro: tali cellule infatti potrebbero migliorare i problemi proliferativi e differenziativi legati all'uso delle cellule staminali adulte e nello stesso tempo superare i problemi etici legati alle cellule embrionali.

Mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche

Laura Salvaneschi

Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

A partire dalle prime evidenze nei modelli animali della capacità delle cellule staminali di ripopolare il midollo osseo, le cellule staminali ematopoietiche (CSE) sono diventate la principale fonte di cellule per il trapianto autologo ed allogeneico (1). Al 1978 risalgono i primi trapianti autologhi (2) coronati da successo. Nei primi anni '80 vennero descritte le caratteristiche delle CSE periferiche circolanti non mobilizzate o mobilizzate con chemioterapia; solo successivamente alla disponibilità dei fattori di crescita ematopoietici è stato possibile raccogliere in numero elevato CSE dal sangue periferico ed ottenere una rapida ricostituzione delle funzioni midollari dopo trapianto autologo. Il parallelo sviluppo della terapia di supporto post-trapianto ha permesso di dimostrare che l'uso delle CSE era correlato con riduzione della tossicità e della mortalità trapianto-correlata. Ma il vantaggio principale delle CSE ottenute mediante mobilizzazione è probabilmente rappresentato dalla possibilità di raccolta di un numero così elevato di cellule da permettere di procedere agevolmente a manipolazione, purging ed espansione. Le CSE del sangue periferico sono state rapidamente impiegate, dopo l'autologo, anche nel trapianto allogeneico. Poiché una raccolta di CSE contiene un numero di T-linfociti superiore di dieci volte rispetto al prelievo midollare, il rischio maggiore è rappresentato dall'incremento di incidenza e gravità di GvHD. Di fatto, la comparsa di GvHD acuta non appare aumentata, mentre la GvHD cronica, se si somministrano CSE non selezionate, compare con frequenza significativamente maggiore in caso di trapianto di CSE raccolta dal sangue periferico.

Al midollo osseo ed alle CSE periferiche si affianca come fonte di cellule staminali ematopoietiche da impiegare per il trapianto il sangue del cordone ombelicale, la cui maggiore limitazione per l'utilizzo nel paziente adulto è, almeno allo stato, il numero relativamente limitato di cellule CD34+ presenti.

Mobilizzazione e raccolta delle CSE dal sangue periferico

Le CSE possono essere ottenute anche senza mobilizzazione dal sangue periferico, ma una raccolta efficace avviene solo dopo mobilizzazione del pool delle CSE

mediante trattamento con farmaci citotossici, con fattori di crescita ematopoietici o con la combinazione di entrambi.

I vantaggi derivanti dalla raccolta delle CSE dal sangue periferico sono rappresentati:

- a) per il donatore, dalla raccolta eseguita senza ricorrere ad anestesia generale;
- b) per il ricevente, la possibilità di raccogliere un numero di progenitori ematopoietici più di dieci volte superiore a quello ottenibile con prelievo midollare. Un elevato numero di CSE assicura il successo dell'attecchimento e riduce il rischio di fallimento del graft in caso di trapianto da donatore non correlato o "mismatched". Il problema della maggiore incidenza di GvHD cronica è superabile mediante l'adozione dei purgino dei linfociti contaminanti.

A) Mobilizzazione delle CSE con terapia citotossica

La mobilizzazione delle CSE chemioterapia-mediata fu descritta per la prima volta nel 1976 nella fase del recupero ematologico in pazienti sottoposti a terapia mieloablattiva (3).

E' stato dimostrato che sia dosi singole di ciclofosfamide (3-7 g/m²) sia regimi chemioterapici con differenti combinazioni di farmaci citotossici sono in grado di ottenere la mobilizzazione, che è la diretta conseguenza di una mielodepressione di grado elevato tale da indurre per alcuni giorni una neutropenia severa. Le CSE aumentano di numero nel sangue periferico durante la fase del recupero ematopoietico: la raccolta mediante leucaferesi si inizia non appena la conta leucocitaria supera il valore di $1 \times 10^9/L$.

Gli svantaggi dell'impiego della sola chemioterapia sono rappresentati da:

- limitata efficacia di mobilizzazione, con conseguente aumento del numero delle sedute di leucaferesi,
- rischi e tossicità chemioterapia-correlati,
- difficoltà di predizione del "timing" per la raccolta.

Attualmente, per le motivazioni sopra elencate, questa modalità di mobilizzazione è praticata solo raramente.

B) Mobilizzazione delle CSE con sole citochine

L'effetto mobilizzante del Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) e del Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) è stato descritto per la prima volta nel 1988 (4).

Entrambe le citochine possono essere impiegate, senza stimolazione addizionale con farmaci citotossici, per l'espansione del pool di CSE circolanti, sia in pazienti sia in donatori sani.

G-CSF è impiegato di routine sia da solo sia associato a farmaci citotossici, in quanto, rispetto a GM-CSF, offre i seguenti vantaggi:

- maggiore efficacia di mobilizzazione;
- maggiore sicurezza e tollerabilità per i donatori/pazienti trattati.

Gli effetti indesiderati, secondari alla somministrazione di questi fattori di crescita, sono rappresentati fundamentalmente dai dolori ossei, che compaiono invariabilmente quando le dosi di G-CSF somministrate superano i 10 mg/Kg/die. Con

frequenza minore possono comparire: cefalea, astenia, febbre, nausea. GM-CSF comporta, in aggiunta, il rischio elevato di indurre eventi avversi sistemici.

In Letteratura sono riportati anche casi di rottura spontanea di milza in pazienti/donatori dopo mobilitazione con G-CSF (5).

Altri fattori di crescita sono stati utilizzati in trials clinici controllati: Interleuchina-3 (IL-3), Interleuchina-8 (IL-8), Trombopoietina (TPO), Fit-3 ligand (Fit-3), ecc., che non hanno dimostrato di essere superiori a G-CSF quanto ad efficacia e sicurezza (6, 7).

L'associazione di G-CSF e GM-CSF non comporta un incremento di efficacia statisticamente significativo e, d'altra parte, sottopone il paziente alla tossicità di entrambe le citochine.

Le cellule CD34+ del sangue periferico aumentano solo in terza giornata dalla prima dose di G-CSF e raggiungono i valori massimi usualmente in quinta giornata. Pertanto la raccolta deve essere iniziata non prima del terzo giorno e non deve essere protratta oltre il settimo dall'inizio della somministrazione.

Le dosi di G-CSF somministrate tengono conto della necessità di conciliare una efficiente mobilitazione con minimi livelli di tossicità. Usualmente si somministrano 8-16 mg/Kg suddivise in due somministrazioni ogni 12 ore. Le leucaferesi di norma iniziano in quarta o quinta giornata dall'inizio del trattamento con fattore di crescita e non proseguono oltre il settimo giorno. In caso di donazione allogenica si utilizzano dosi ridotte per evitare un incremento eccessivo di leucociti (superiore a $70 \times 10^9/L$).

C) Mobilizzazione delle CSE con citochine e chemioterapia

La mobilizzazione combinata G-CSF (oppure G-CSF + GM-CSF) + chemioterapia è associata ad un'efficacia significativamente aumentata della mobilizzazione delle CSE e ad una riduzione del numero di cellule neoplastiche contaminanti il graft.

Gli svantaggi della mobilizzazione combinata sono rappresentati da:

- aumento di tossicità e morbilità;
- maggiori difficoltà di pianificazione della raccolta.

Il momento ottimale per la raccolta coincide in genere con valori di conta leucocitaria di $5 \times 10^9/L$ e con l'inizio del recupero piastrinico. Tuttavia solo il monitoraggio delle cellule CD34+ nel sangue periferico offre informazioni utili per dare inizio alla leucaferesi e programmare il numero di sedute.

L'impiego di G-CSF si è dimostrato associato ad una bassa incidenza di effetti indesiderati e ad un più precoci picco delle cellule CD 34+. Nonostante l'efficacia della mobilizzazione dipenda dalla dose di citochine somministrate, di fatto i dosaggi sono relativamente bassi (8-16 mg/Kg/die): la somministrazione ha inizio il giorno successivo al completamento della chemioterapia e continua fino al completamento della raccolta di CSE.

D) Controindicazioni alla somministrazione di G-CSF nei donatori sani

I donatori allogenici possono presentare problemi legati al peso (pazienti pediatrici) o all'età. Le principali controindicazioni alla mobilizzazione sono:

- positività dei markers infettivologici (HbsAg, HIV, HCV);
- trombosi venose;
- malattia aterosclerotica;
- malattie neoplastiche ed autoimmuni.

Effetti indesiderati a lungo termine (insorgenza di mielodisplasie, leucemie) non sono ad oggi dimostrati.

E) La raccolta delle CSE dal sangue periferico

Le procedure di aferesi, grazie all'elevato livello tecnologico raggiunto dai separatori cellulari, permettono di raccogliere una vasta gamma di prodotti da impiegare in terapia e/o di trattare un numero sempre maggiore di pazienti, anche in situazioni cliniche critiche.

Perché la raccolta delle CSE dal paziente/donatore avvenga in modo corretto ed efficiente è indispensabile seguire le linee guida emanate dal Servizio di Medicina Trasfusionale di riferimento. In particolare:

- La responsabilità dell'uso dei separatori cellulari è del medico responsabile di settore, coadiuvato dai Medici del settore e dallo staff infermieristico.
- Il consenso informato deve essere sottoscritto sia dai pazienti sia dai donatori.
- Il Medico dell'Aferesi è responsabile della selezione di pazienti e donatori. Per questi ultimi devono essere seguite le disposizioni legislative vigenti.
- I pazienti pediatrici richiedono una particolare attenzione e la stretta collaborazione con i medici dello staff pediatrico.

Le procedure di aferesi non sono esenti da rischi sia per i donatori sia per i pazienti:

- tutto lo staff medico – infermieristico deve essere in grado di riconoscere le più comuni complicanze e preparato ad intervenire per correggerle.
- Lo staff deve essere addestrato a risolvere i problemi più comuni, che riguardano: gli accessi venosi, le reazioni da citrato, le reazioni secondarie al rimpiazzo dei liquidi, le reazioni trasfusionali emolitiche e non emolitiche.
- I pazienti pediatrici e quelli con malattie renali, epatiche, immunosoppressione, ecc. sono i più esposti alle reazioni avverse.
- L'abilità nell'uso dei separatori e nell'assistenza a pazienti e donatori è assicurata solo dall'uso regolare delle apparecchiature e dalla permanenza nel settore di aferesi.

Particolare rilevanza assume la valutazione clinica. La selezione del candidato ad eseguire la leucaferesi per la raccolta di cellule staminali deve riguardare sia il paziente candidato all'autotrapianto che il donatore sano individuato per la donazione di cellule staminali allogeniche.

In caso di autotrapianto, il paziente considerato eleggibile per il trapianto deve essere valutato attentamente in due tempi diversi dal medico del servizio di immunoematologia sia per quanto riguarda le condizioni cliniche che i parametri di laboratorio e l'idoneità degli accessi vascolari. La prima valutazione dovrà essere effettuata circa 15 giorni prima del presunto momento della raccolta per

l' idoneità alla leucaferesi e la seconda volta immediatamente prima della raccolta (24 ore prima) con l'intento di individuare eventuali controindicazioni alla procedura presentatesi nel frattempo. Entrambe le valutazioni devono essere documentate.

La valutazione clinica deve comprendere anamnesi ed esame obiettivo. I parametri di laboratorio indispensabili di cui disporre comprendono gli esami di funzionalità epatica, renale, elettrolitemia, coagulazione. Inoltre devono essere disponibili un esame Rx del torace, ECG ed un'eventuale indagine ecocardiografica eseguita da non oltre 30 giorni. La presenza di febbre intercorrente nei giorni immediatamente precedenti la leucaferesi e non ascrivibile all'uso del fattore di crescita deve essere attentamente studiata.

Controindicazioni assolute alla raccolta sono rappresentate da:

- insufficienza cardiaca con frazione di eiezione ventricolare inferiore al 40%;
- gravi alterazioni del ritmo cardiaco;
- grave insufficienza renale;
- insufficienza epatica ingravescente;
- IMA recente; TIA recente;
- ipertensione arteriosa non controllabile con i comuni presidi terapeutici;
- diabete mellito insulino-dipendente non controllabile con terapia insulinica;
- importanti deficit coagulativi;
- infezioni in atto.

La presenza di febbre > 38°C di origine infettiva batterica, virale, fungina emersa nei giorni che precedono la raccolta impone o la temporanea sospensione della raccolta o la programmazione di accertamenti aggiuntivi.

La terapia con ACE inibitori (fatta eccezione per il losartan) deve essere prontamente sospesa e sostituita con un Ca antagonista o un b-bloccante.

Il posizionamento di un catetere venoso centrale (CVC) si impone qualora il paziente non disponga di almeno 3 accessi venosi periferici sicuramente praticabili. Due di questi accessi venosi periferici devono essere reperibili alla piega del gomito bilateralmente e di calibro adeguato (deve essere possibile posizionare un ago fistola da 17 G). Il CVC deve essere posizionato preferibilmente a livello della vena succlavia e avere le seguenti caratteristiche: bilume da dialisi con calibro 12 French, lunghezza 16 cm (paziente adulto); bilume da dialisi con calibro 8 French, lunghezza 12 cm (paziente pediatrico o adulto di basso peso).

I cateteri venosi centrali devono essere posizionati da un medico qualificato per eseguire questa procedura.

In caso di allo trapianto, il donatore sano compatibile deve essere studiato con le stesse modalità sopra riportate per il paziente; è indispensabile un accurato screening infettivologico, comprendente la sierologia per epatite B, C, per HIV1-2, per HTLV1-II e per la lue, eseguiti entro 30 giorni dalla raccolta. Particolare attenzione deve essere posta alla storia trasfusionale del donatore, all'intervallo tra vaccinazioni e donazione, alla somministrazione di Immunoglobuline. Nei limiti del possibile devono essere utilizzati accessi venosi periferici. Il posizionamento

di un CVC va considerata procedura eccezionale e deve incontrare il pieno consenso informato riguardo ai rischi che tale pratica comporta.

Per il trattamento degli effetti indesiderati devono essere disponibili farmaci e strumentazioni adeguati nella sede di aferesi e deve essere predisposta una specifica procedura di intervento in caso di insorgenza di una delle reazioni indesiderate di più frequente riscontro o di maggiore gravità.

La complicanza di più comune riscontro durante la procedura è l'ipocalcemia transitoria indotta dall'impiego di ACD-A quale anticoagulante, facilmente evitabile mediante la somministrazione profilattica di calcio gluconato; dopo la procedura l'evento più frequente è la riduzione critica del numero delle piastrine, conseguenza della processazione di due volumi ematici nei separatori a flusso continuo. È prassi consolidata reinfondere al donatore/paziente (se il numero delle piastrine è inferiore a $50 \times 10^9/L$) il plasma autologo ricco di piastrine ottenuto per centrifugazione dall'unità di cellule staminali raccolte.

Le complicanze associate al posizionamento del catetere venoso centrale sono evitabili se l'accesso venoso centrale è affidato a mani esperte. Lo scompenso emodinamico nei pazienti pediatrici è evitato dall'impiego di separatori cellulari a flusso continuo e con bassa extracorporea e dalla disponibilità di uno staff medico-infermieristico preparato, in grado di programmare il priming del separatore con globuli rossi in questi pazienti ed un attento bilanciamento dei liquidi.

F) La dose di CSE necessaria per il trapianto

Il numero totale di cellule esprimenti l'antigene CD34 correla con la conta delle CFC e con la velocità di ripopolazione midollare, in caso di trapianto autologo, anche se non permette di predire con precisione il tempo necessario per la ricostituzione del midollo, soprattutto quando il numero di CD34+ è molto elevato. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che, per un numero di cellule CD34+ superiore a $2-2,5 \times 10^6/Kg$, un ulteriore incremento dei progenitori non ha come effetto un decremento lineare del tempo necessario per il recupero piastrinico. Vi è accordo sul fatto che una buona ripopolazione midollare, nella stragrande maggioranza dei trapiantati, si ottiene quando è superata la soglia di $2 \times 10^6/Kg$ (i valori delle piastrine risalgono, nel 90% dei casi, nel giro di quattro settimane). $3,5-5 \times 10^6/Kg$ sono considerati valori ottimali; un incremento ulteriore non si traduce in una riduzione sostanziale del tempo necessario per l'attecchimento.

Nella definizione della dose non deve essere mai dimenticato il paziente candidato al trapianto con le caratteristiche peculiarità (tipo di malattia, stadio, età, patologia associata, storia della malattia, ecc.).

La qualità di una raccolta di CSE si può testare con la conta delle CFU-GM, che correla con quella delle cellule CD34+. La dose target di CFU-GM è stimata di $1-5 \times 10^5/Kg$ (a seconda del metodo impiegato). In pratica si ricorre alla sola conta delle cellule CD34+, che ha il vantaggio di una maggiore rapidità di esecuzione ed attendibilità, se eseguita da mani esperte.

Si deve infine segnalare che mobilitazione e raccolta sono negativamente influenzati da (8):

- precedente radioterapia (dosaggi, estensione);
- chemioterapia pregressa:
 - durata
 - dosaggi
 - tipo di farmaci impiegati (BCNU, Melphalan, Fludarabina)
- presenza di metastasi a livello midollare (?).

Meccanismi della mobilizzazione delle CSE

Localizzazione, proliferazione, differenziazione e sopravvivenza delle CSE nel midollo osseo devono essere inquadrare in un contesto generale di relazioni dinamiche con il microambiente midollare e la matrice extracellulare.

In condizioni basali le CSE nei vari stadi di differenziazione sono confinate in specifiche nicchie del midollo osseo, dalle quali le cellule differenziate e mature migrano nel sangue periferico. Un piccolo numero di cellule primitive esce dal comparto midollare e migra nel sangue. Il meccanismo di rilascio dal midollo non è ancora del tutto chiarito.

Il pool delle CSE circolanti può aumentare notevolmente sotto l'effetto di svariate stimolazioni; questo evento, che viene definito "mobilizzazione", è stato dimostrato nelle numerose specie animali studiate, confermando la convinzione che si tratti di un meccanismo altamente conservato.

In studi recenti condotti sia su modelli murini sia nell'uomo si è evidenziato che il midollo osseo rappresenta la sede di complesse interazioni fra citochine/chemochine, proteasi e molecole di adesione. La complessità di questi meccanismi è dovuta alla possibilità che i singoli fattori agiscano indipendentemente oppure interagiscano fra loro configurando un vero e proprio processo a cascata (9).

Le proteasi

La mobilizzazione ottenuta con G-CSF è il risultato di una complessa cascata di eventi, difficilmente isolabili.

Studi condotti su modelli murini con deficit dei recettori per IL-8 o G-CSF hanno dimostrato che per la mobilizzazione è indispensabile la presenza di un pool sufficientemente ampio di neutrofili con normale funzionalità, in particolare con normale risposta a IL-8 o a G-CSF (10-12);

Perché la mobilizzazione si attui, dopo somministrazione di G-CSF, è necessaria anche la presenza di un fattore solubile;

I neutrofili attivati dopo trattamento con G-CSF liberano il contenuto dei granuli specifici (matrice metalloproteinasi - 9 [MMP-9], lactoferrina) e dei granuli azzurrofilo (elastasi, catepsina G, proteinasi 3) e incrementano la liberazione di L-selectina.

Anche se le modalità d'interazione di queste proteasi, i loro specifici substrati in vivo e l'interazione con altre molecole sono ancora materia di studio, è stato dimostrato che, dopo somministrazione di G-CSF, serin-proteasi (soprattutto elastasi neutrofila) si accumulano nell'ambiente midollare; i loro substrati comprendono numerose molecole, tra le quali: molecole di adesione dell'endotelio vasale

(VCAM-1), c-kit, il recettore 4 per la chemochina CXC (CXCR4) e SDF-1 (ligando per il fattore 1 di derivazione stromale). Tra gli altri substrati, non ancora identificati, vi sarebbe lo stesso G-CSF: ciò spiegherebbe il declino dell'efficienza di mobilitazione dopo la sesta giornata di trattamento, nonostante la prosecuzione della somministrazione (13, 14).

Metalloproteasi o dipeptil peptidasi IV (DPPIV/CD26) operano il clivaggio delle stesse molecole che sono attaccate da serin-peptidasi (15).

Oggi si ritiene che il contributo di ogni singola proteasi non sia critico, ma che sia richiesta una coalizione di proteasi all'interno del midollo osseo, perché la mobilitazione abbia luogo.

Le chemochine

La mobilitazione delle CSE si ottiene con numerose chemochine: IL-8, Proteina infiammatoria macrofagica 1α o 1β , Gro β , SDF-1, ecc.

L'effetto mobilizzante si manifesta molto rapidamente (dopo 30 minuti, fino ad alcune ore).

Dal punto di vista funzionale sono state studiate IL-8, Gro β , SDF-1. La risposta alla somministrazione di IL-8 e Gro β è dipendente dalla presenza di un numero adeguato di neutrofili circolanti funzionalmente normali ed è accompagnata dall'incremento di MMP-9, rilasciata dai neutrofili stessi (16).

SDF-1 è la chemochina più attiva: essa induce "down regulation" del recettore di CXCR4 e ne cancella il segnale sulle CSE.

Le integrine

Le CSE circolanti sono cellule non-ciclianti: si è dimostrato che escono preferibilmente dal midollo osseo le cellule quiescenti, che presentano anche riduzione funzionale dei recettori di VLA-4.

La risposta migratoria a G-CSF è mediata dalla partecipazione delle integrine: infatti la "down regulation" della funzione integrinica è un passaggio obbligato per gli stadi finali di tras migrazione attraverso l'endotelio dei sinusoidi.

Un altro evento obbligatorio è la "down regulation" dei recettori di CXCR4 e l'iporesponsività a SDF-1.

Tutto ciò comporta che la tras migrazione avvenga in maniera efficiente solo in cellule che presentano iporegolazione sia di integrine alfa 4 sia della funzione di CXCR4/SDF-1 (17).

Quesiti irrisolti

Gli studi eseguiti sulla mobilitazione non hanno ancora chiarito l'intero meccanismo e lasciano aperti numerosi quesiti:

- Alla base del rilascio fisiologico in circolo delle CSE e della mobilitazione con fattori di crescita ematopoietici sta lo stesso meccanismo? In altri termini, la mobilitazione indotta sarebbe un'esaltazione del processo normalmente presente? Va rimarcato che alcune molecole sono coinvolte solo nell'ematopoiesi stressata e non in condizioni basali.

- Le CSE sono dimostrabili anche in svariati tessuti, fuori dal midollo osseo; le CSE circolanti sarebbero in equilibrio dinamico con quelle dei tessuti. Queste ultime vengono modificate dopo mobilizzazione?
- Solo una piccola percentuale di cellule è mobilizzata rispetto al pool che rimane nel midollo osseo. Le cellule che fuoriescono presentano un particolare fenotipo?
- Le CSE sono rilasciate insieme ad un elevato numero di cellule mature (18). Vi sono influenze transcellulari o umorali che inducono questo comportamento? Vi sono variazioni rispetto ai vari agenti mobilizzanti?

Bibliografia essenziale

1. Dreger P., Gluckman E., Schmitz N. Source of haemopoietic stem cells. In "Blood and Marrow Transplantation" 2000, 69-90. Apperley JF., Gluckman E., Gratwohl A. Eds.
2. Apperbaum FR, Herzig GP, Ziegler JL, et al. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978; 52: 85-95.
3. Richman CM., Weiner RS., Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976; 47: 1031-9.
4. Duhrsen U., Villeval JL., Boyd J., et al. Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988; 72: 2074-81.
5. Balaguer H., Galmes A., Ventayol G. Splenic rupture after granulocyte-colony-stimulating factor mobilization in a peripheral blood progenitor cell donor. *Transfusion* 2004; 44: 1260-1.
6. Rosenfield CS., Bolwell B., Lefever A., et al. Comparison of four cytokine regimens for mobilization of peripheral blood stem cells: IL-3 alone and combined with GM-CSF or G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 179-83.
7. Laterveer L., Lindley IJ., Heemskerk DP., et al. Rapid mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by a single intravenous injection of Interleukin-8. *Blood* 1996; 87: 71-8.
8. Dreger P., Kloss M., Petersen B., et al. Autologous progenitor cell transplantation: Prior exposure to stem cell-toxic drugs determines yield and engraftment of peripheral blood progenitor cells but not of bone marrow grafts. *Blood* 1995; 86: 3970-8.
9. Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 2004; 103: 1580-5.
10. Link DC. Mechanisms of granulocyte colony-stimulating factor-induced hematopoietic progenitor-cell mobilization. *Semin Hematol* 2000; 30: 973-81.
11. Thomas J., Liu F., Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 183-9.

12. Pruijt JFM., Verzaal P., Van Os R., et al. Neutrophils are indispensable for hematopoietic stem cell mobilization by interleukin-8 in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6228-33.
13. Lévesque JP., Takamatsu Y., Nilsson SK., et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 2001; 98: 1289-97.
14. Lévesque JP., Hendy J., Takamatsu T., et al. Disruption of the CXCR4/CXCR4 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 2003; 110: 187-96.
15. Proost P., Struyf S., Schols D., et al. Processing by CD26/dipeptidyl-dipeptidase IV reduces the chemotactic and anti-HIV-1 activity of stromal-cell derived factor 1 alpha. *FEBS Lett* 1998; 432: 73-6.
16. Pruijt JFM., Fibbe WE., Laterveer L., et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10863-8.
17. To LB., Haylock DN., Simmons PJ., Jultner CA. The biology and clinical use of blood stem cells. *Blood* 1997; 89: 2233-58.
18. Abkowitz JL., Robinson AE., Kale S., et al. The mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood* 2003; 102: 1249-53.

Allestimento di colture di cellule staminali somatiche

Tui Neri

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia

I tessuti sono sottoposti a continui fenomeni di depletamento cellulare, sia per l'usura dovuta allo svolgimento delle normali funzioni fisiologiche, sia per eventuali insulti chimici, fisici o biologici che possono danneggiare gli organi di un individuo.

La capacità di riparare un danno (plasticità) è una caratteristica espressa in modo eterogeneo dai diversi tessuti e può non essere presente, se non in minima parte, in quelli perenni. Infatti, i tessuti che sono sottoposti ad un continuo turnover fisiologico come l'intestino tenue, l'epidermide e il sistema emopoietico possono più facilmente riparare lesioni anche molto estese, mentre tessuti più "statici", come quello muscolare, non mostrano di possedere simili potenzialità.

Nei mammiferi si riscontrano due sistemi di rinnovo o sostituzione di cellule: in un caso (epatociti, cellule endoteliali) l'omeostasi cellulare viene mantenuta attraverso la divisione delle cellule differenziate a dare cellule figlie con le stesse caratteristiche funzionali e lo stesso fenotipo (duplicazione semplice); nell'altro caso è prevista l'esistenza di un compartimento di cellule indifferenziate e multipotenti (cellule staminali somatiche, SCs) che hanno la duplice capacità di replicare se stesse e generare cellule progenitrici. È da queste ultime che si generano tutti i tipi di cellule mature appartenenti ad un dato tessuto.

Le SCs sono spesso quiescenti o proliferano molto lentamente, ma hanno la capacità di iniziare a dividersi rapidamente per rimpiazzare cellule morte o danneggiate.

Cellule staminali somatiche: definizione

La definizione di cellula staminale non è immediata. Essa si basa su caratteristiche funzionali, ma perché queste vengano indagate e stabilite è necessario che la cellula staminale sia manipolata sperimentalmente, procedura che ne altera le proprietà fisiologiche di base.

Esiste comunque una definizione formulata da Potten e Loeffler nel 1997, e attualmente accettata, che prende come riferimento le staminali che popolano l'e-

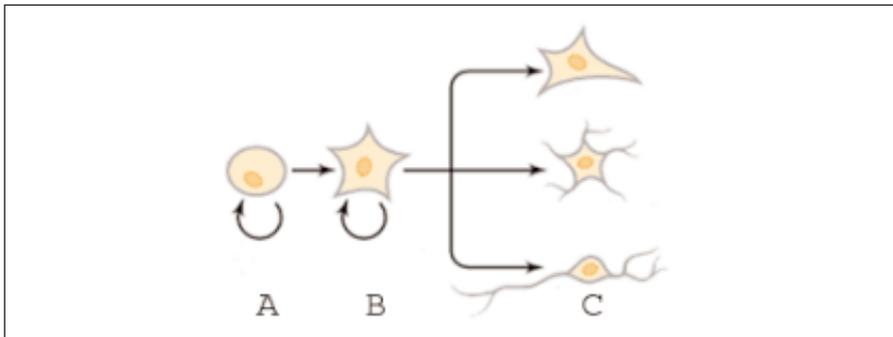
pitelio delle cripte intestinali, ma che può essere allargata alle SCs presenti nei diversi tessuti. Queste vengono considerate tali se:

- sono indifferenziate;
- sono in grado di proliferare estesamente;
- sono in grado di generare cellule uguali a se stesse per periodi di tempo molto estesi, in genere per tutta la vita dell'organismo, e possono utilizzare questa capacità in modo da mantenere costante il numero di elementi appartenenti ad un determinato compartimento staminale (automantenimento);
- sono capaci di generare un ampio spettro di cellule differenziate e funzionali (multipotenzialità);
- infine, come conseguenza delle caratteristiche elencate, sono in grado di rigenerare un tessuto che è stato danneggiato.

Le popolazioni staminali presenti nei diversi tessuti esprimono però in modo eterogeneo queste proprietà e talvolta solo in particolari situazioni. Idealmente questi criteri dovrebbero essere soddisfatti in toto; in pratica, anche per limitazioni sperimentali, ciò non avviene. Una ulteriore complicazione deriva dal fatto che non tutte queste funzioni hanno lo stesso peso. Non è sufficiente per esempio definire una cellula come staminale solo in virtù della sua capacità di proliferare, come si è fatto in passato. In generale si può affermare che popolazioni di cellule che soddisfano tutti questi criteri sono “vere cellule staminali”, mentre quelle che non esprimono momentaneamente queste caratteristiche, pur essendone in possesso (quiescenza), sono “cellule staminali potenziali” (Potten e Loffler, 1990).

Le cellule staminali somatiche si trovano localizzate in nicchie ristrette e piuttosto profonde dei tessuti. Al loro interno (il midollo osseo, la base della cripta intestinale, lo strato germinativo dell'epidermide) risiede la popolazione di SCs e avvengono i fenomeni alla base dell'automantenimento. Tra il compartimento staminale somatico e le cellule mature di un tessuto esiste poi un compartimento intermedio, quello dei progenitori di transito. In queste cellule la capacità di proliferare si mantiene per un numero limitato di cicli e si esaurisce con il differenziamento delle stesse in un elevato numero di cellule mature (Fig. 1)

Fig. 1 - A cellula staminale, B progenitore proliferante, C cellule differenziate



In alcuni tessuti non esiste un compartimento staminale chiaramente distinguibile a livello morfologico (muscolo scheletrico). In questi casi la popolazione staminale viene individuata sulla base di marcatori biochimici e molecolari. Le nicchie in cui risiedono le SCs possono quindi essere considerate delle entità biochimiche più che anatomiche, dei microambienti in cui le cellule sono in contatto con i corretti segnali che consentono loro di mantenere le caratteristiche fondamentali che le caratterizzano.

Isolamento e coltura di SCs

Come abbiamo visto le cellule staminali somatiche risiedono nei diversi tessuti al cui rinnovamento partecipano, in misura più o meno rilevante, nell'arco della vita di un individuo. È necessario quindi isolarle per poter allestire una coltura, si procede cioè alla preparazione di una coltura primaria (considereremo qui il modello animale murino come rappresentante della classe dei Mammiferi), nome con il quale viene indicato l'espianto primario di tessuto e la conseguente prima popolazione di cellule che si ottiene tramite un procedimento diverso di volta in volta, a seconda del tipo di cellule che si vogliono ottenere.

Se vogliamo ottenere ad esempio cellule staminali ematopoietiche preleveremo dall'animale i femori e lo sterno, dai quali, con un vero e proprio lavaggio (flushing) faremo fuoriuscire l'intero contenuto, il midollo osseo.

Se vogliamo isolare cellule staminali neurali andremo a prelevare dall'animale una ben precisa area dell'encefalo, la zona subventricolare (SVZ), nella quale sappiamo risiedere gli elementi cellulari cui siamo interessati.

Il primo problema che si presenta durante una coltura primaria è la quantità di cellule che riusciamo a isolare e dalle quali far partire la nostra linea cellulare. Spesso infatti gli elementi di partenza sono molto pochi e frammisti ad un enorme numero di cellule (milioni), detriti e matrice che ritroviamo nella "soluzione" che abbiamo ottenuto dall'animale.

A questo punto inizia una serie di procedure, comprendenti normalmente centrifugazioni successive e lavaggi, che ci permette di liberarci da questa enorme quantità di materiale che altrimenti disturberebbe la crescita delle cellule che abbiamo voluto isolare.

Una volta terminato questo processo, che potremmo chiamare di purificazione, porremo gli elementi ottenuti (a volte difficilmente inquadrabili ad un primo esame al microscopio ottico) nel terreno di coltura nel quale verranno espansi.

I terreni di coltura sono soluzioni contenenti le sostanze chimiche necessarie per il mantenimento in coltura di ciascun tipo di cellula. Le SCs hanno esigenze diverse a seconda della classe cui appartengono. La difficoltà che si incontra nel coltivare le SCs, di qualunque tipo, è primariamente quella di mantenerle in uno stato indifferenziato; se trascurate, tendono molto presto a differenziare, andando normalmente a formare i lineage cellulari propri del tessuto da cui provengono. Nei terreni di coltura sono presenti, oltre ad aminoacidi essenziali e non, soluzioni tampone, antibiotici, beta-mercaptoetanolo, uno o più fattori di crescita. Questi ultimi danno uno "stimolo artificiale", non fornito ovviamente dalle nor-

mali condizioni *in vitro*, che permette di mantenere le cellule in uno stato indifferenziato.

Viene in genere anche aggiunto del siero fetale, il bovino (FBS) è il più comune, che contiene una serie di sostanze che favoriscono notevolmente la proliferazione cellulare; sono ormoni, fattori di crescita (PDGF, FGF?), lipidi, proteine di trasporto dei lipidi, carboidrati, inibitori delle proteasi, minerali e aminoacidi. L'utilizzo di qualunque tipo di siero introduce un elemento di variabilità nella coltura: non solo non ne conosciamo esattamente la composizione, ma spesso sussistono differenze tra i diversi lotti in commercio. Le condizioni di coltura devono essere monitorate costantemente; grande attenzione deve destare un cambiamento nel colore del terreno di coltura (nella maggior parte dei media di crescita è presente una minima quantità di rosso fenolo, un indicatore di PH che vira al variare di quest'ultimo) indice di un cambiamento di PH. Le cellule non devono essere sottoposte a sbalzi di temperatura improvvisi, o almeno è consigliabile limitare lo stress termico al periodo trascorso fuori dall'incubatore, nel quale l'atmosfera è di solito mantenuta ad una pCO₂ del 5% e ad una temperatura di 37°C, per l'analisi morfologica e per l'attuazione delle procedure che permettono l'espansione in coltura delle SCs.

Le cellule staminali somatiche infatti presentano di norma un tasso di crescita molto elevato: tendono a moltiplicarsi indefinitamente fino a consumare tutto il medium di crescita e occupare lo spazio che trovano a disposizione. Le SCs possono crescere adese, come le staminali mesenchimali, o in sospensione, come le cellule staminali nervose. Nel primo caso la procedura di espansione e di subcoltivazione seriale della linea cellulare prevede il distacco delle stesse dalla piastra nella quale sono coltivate, tramite enzimi proteolitici come la tripsina, e la risospensione in terreno fresco. La stessa procedura viene attuata anche nel secondo caso, omettendo l'uso di enzimi, non necessari proprio per il fatto che queste cellule crescono in sospensione.

Tutti i processi che permettono la crescita e l'espansione di queste cellule vanno eseguiti in perfetta sterilità, tramite l'uso di una cappa a flusso laminare verticale. È infatti estremamente ricorrente la contaminazione da batteri, subito evidenti allo sguardo dell'operatore, e soprattutto da micoplasma, non visibile a occhio nudo né rilevabile ad una seppur attenta analisi al microscopio ottico; l'unico effetto evidente di questo microrganismo può essere un eventuale rallentamento della crescita delle cellule in coltura che possono presentare in alcuni casi un aspetto non sano. Esistono in commercio kit completi per la detezione di questo contaminante estremamente dannoso. Esso infatti una volta presente nella coltura non è eliminabile; la sua presenza però va ad alterare le condizioni di vita delle SCs e a minare la conseguente riproducibilità degli esperimenti.

Le colture di cellule staminali somatiche umane vengono allestite di norma in maniera simile a quelle murine e le modalità di subcoltivazione seriale sono in genere molto simili. Deve essere prestata molta attenzione nel manipolare materiale umano: il rischio di trasmissione di patologie (soprattutto dovute a forme virali latenti presenti nei tessuti del "donatore") e soprattutto la necessità di mantenere condizioni di assoluta sterilità se si prevede la possibilità di un trapianto di

cellule in un paziente, rendono la manipolazione di SCs umane un processo più delicato e difficile.

Credo sia opportuno a questo punto ricordare che la condizione di “staminalità” è una condizione intrinseca di una determinata popolazione cellulare; normalmente cioè le SCs, una volta poste nelle condizioni adatte, mostrano di possedere un ampio potere replicativo e una vasto potenziale differenziativo. Queste cellule cioè non vengono immortalizzate, come spesso accade in colture di cellule somatiche, e mantengono le loro caratteristiche per un grande numero di passaggi *in vitro*.

Una volta ottenuta una linea cellulare stabile (sono necessari alcuni passaggi di amplificazione dalla coltura primaria) si procede alla caratterizzazione degli elementi che la compongono. Non tutte le linee infatti mostrano gli stessi tassi di crescita e produzione delle tipologie cellulari proprie del tessuto di origine. Le proprietà di automantenimento e multipotenzialità vengono indagate per mezzo di curve di crescita (Fig. 2) e reazioni di immunofluorescenza (Fig.3).

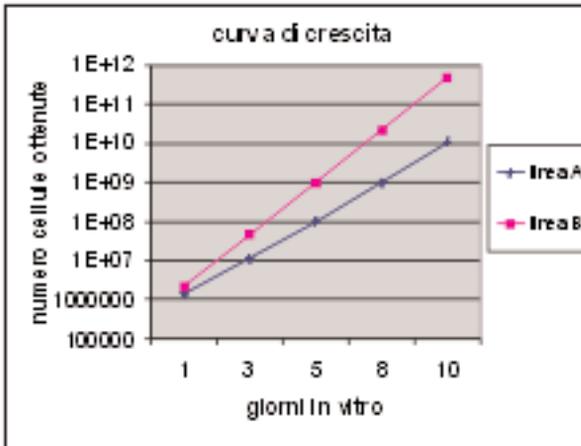


Fig. 2 - Esempio di curva di crescita: la linea cellulare B mostra un tasso di crescita maggiore rispetto alla A.

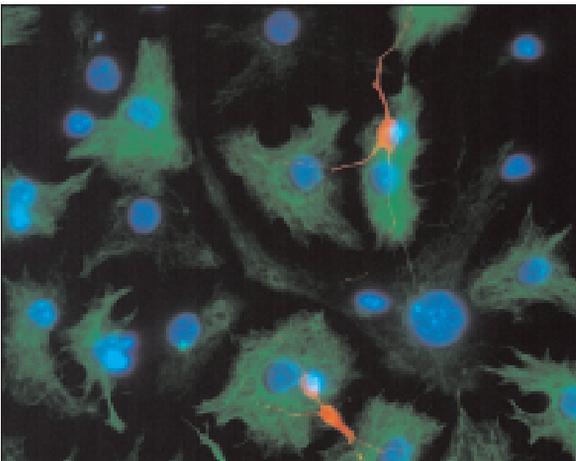


Fig. 3 - Immunofluorescenza: sono evidenti neuroni (in rosso) e astrociti (in verde). Nuclei in blu (Dapi).

Per portare a termine la prima analisi viene contato e registrato per un certo periodo il numero di cellule prodotte a ciascun passaggio di amplificazione a partire da elementi che vengono piastrati regolarmente nello stesso numero; si riportano questi valori su grafico e si ottiene, utilizzando una scala logaritmica, una retta la cui maggiore o minore pendenza indica un maggiore o minore tasso di crescita. La multipotenzialità, ovvero la capacità di dare origine ai diversi fenotipi cellulari caratteristici del tessuto di provenienza, non cambia nel tempo: prendendo come esempio le cellule staminali nervose adulte si è visto che, sia che questa popolazione sia stata appena prelevata dal topo, sia dopo mesi di passaggi di subcoltivazione, la quantità di neuroni (10-15%), astrociti (70-80%) e oligodendrociti (5%) prodotta rimane pressoché invariata. Il metodo più rapido ed efficace per questo secondo tipo di analisi, almeno per un primo esame al microscopio, è l'immunofluorescenza: vengono utilizzati anticorpi primari coniugati o primari e secondari coniugati con fluorocromi: l'anticorpo primario si lega alla proteina di interesse, in questo caso quella propria della tipologia cellulare che stiamo analizzando, rivelando la presenza o assenza di quel particolare antigene e quindi la presenza o assenza di quel particolare lineage cellulare nella nostra coltura. Quest'analisi viene anche effettuata tramite PCR, andando a estrarre, purificare e amplificare il DNA delle cellule presenti in coltura per mezzo di primers specifici per i geni espressi da una particolare classe cellulare.

Brevi accenni all'isolamento e alla coltura di cellule staminali embrionali

Riporto qui, per completezza del quadro, le modalità di isolamento e coltivazione di cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells, ESC).

Vengono ottenute da embrioni allo stadio di blastocisti (Fig. 4); viene isolata manualmente la ICM (Inner Cell Mass), composta da un piccolo numero di cellule, che darà origine all'embrione vero e proprio, e viene posta in coltura in condizioni tali da indurre la moltiplicazione degli elementi che la compongono. Si genera così una linea cellulare, proveniente quindi da un solo embrione, una



Fig. 4 - Blastocisti

popolazione di cellule che contengono lo stesso patrimonio genetico. Le ES hanno un enorme potenziale proliferativo (e purtroppo una elevata tumorigenicità), possono moltiplicare il loro numero in pochissime ore formando colonie che contengono migliaia di elementi. Hanno altresì il più vasto potenziale differenziativo attribuibile ad un singolo tipo cellulare: essendo deputate alla formazione di tutti i tessuti e gli organi dell'individuo adulto devono essere in grado di "trasformarsi" nelle diverse classi cellulari presenti nell'organismo; devono cioè essere in grado di acquisire la morfologia e le caratteristiche funzionali, come l'espressione di un particolare set di geni, proprio di ciascun tipo di cellula presente nei diversi distretti corporei.

L'allestimento di questo tipo di colture è un processo delicato: è molto forte la tendenza al differenziamento, non reversibile, indotta molto facilmente da condizioni di coltura stressanti come una variazione di PH, uno sbalzo termico o una crescita non controllata (crescono più velocemente delle SCs, i passaggi di subcoltivazione avvengono in genere ogni 2 giorni).

Crescono in terreni cui viene aggiunto LIF (Leukemia Inhibitory Factor), coadiuvante nel mantenimento di uno stato indifferenziato, e/o su monostrati di fibroblasti mitomicinizzati, che oltre a fare da supporto trofico se opportunamente ingegnerizzati forniscono anch'essi LIF.

Lo studio dei meccanismi di differenziamento delle cellule staminali embrionali è ancora agli inizi e appare più complesso rispetto allo studio delle SCs, proprio per la grande quantità di fenotipi che è possibile ottenere da queste cellule.

Una delle principali applicazioni future (attualmente in una fase preliminare) che immaginiamo per le cellule staminali sia embrionali che adulte sarà il trapianto. In vista di questo scopo si dovranno migliorare le conoscenze dei fenomeni che regolano, *in vitro*, la proliferazione ed il differenziamento, lavorando allo scopo di ottenere protocolli sempre più precisi, che permettano una accurata manipolazione e un forte controllo sul comportamento delle cellule coltivate.

Caratterizzazione e manipolazione ex-vivo delle cellule staminali emopoietiche

Wanda Piacibello

Istituto per la Ricerca e la Terapia dei Tumori, Torino

La cellula staminale emopoietica (HPSC) è per definizione una cellula capace di una enorme capacità di automantenimento ed in grado di generare cellule mature di tutte le linee differenziate. Quest'ultimo fenomeno avviene tramite la generazione di cellule intermedie, commissionate verso una o più linee maturative, per cui possiedono un grande potenziale proliferativo-differenziativo e, talora, un piccolo grado di automantenimento. Caratterizzazione e quantificazione di questi progenitori e delle HPSC sono fondamentali per la comprensione dei meccanismi e delle sequenze di automantenimento, proliferazione e differenziazione per il trapianto, l'espansione ex-vivo e la terapia genica. Fino a poco tempo fa l'analisi quantitativa delle cellule emopoietiche primitive umane era limitata a saggi in vitro, come i test clonogenici per cellule formanti colonie (le diverse CFC) o colture a lungo termine (LTC). Le CFC identificavano soltanto progenitori commissionati uni o multipotenti. Le LTC permettono di identificare cellule più primitive (LTC-IC), capaci di generare colonie mieloidi per almeno 5-12 settimane di coltura su idonei tappeti stromali. Il saggio trapiantologico del topo è stato fondamentale per caratterizzare e definire le cellule staminali emopoietiche più primitive.

Recentemente, un saggio analogo è stato reso possibile anche per l'uomo. Diversi gruppi hanno provato a trapiantare cellule staminali emopoietiche in diversi ceppi murini mutanti, nel tentativo di trovare un modello di trapianto uomo-topo riproducibile. Ne è risultato che l'iniezione endovenosa di progenitori emopoietici umani in topi Non Obesi Diabetici con Immunodeficienza Severa Combinata (NOD/SCID) irradiati subletalmente determina l'attecchimento, nei tessuti emopoietici (midollo osseo, milza e timo), di cellule primitive umane, che proliferano e differenziano, producendo numerosi LTC-IC, CFCSs, precursori e cellule più immature o mature mieloidi, eritroidi, megacariocitarie e linfocitarie anche senza l'impiego di fattori di crescita esogeni. Le cellule emopoietiche che hanno determinato l'attecchimento di cellule umane sono state denominate SRC (Cellule Ripopolanti gli SCID). Le SRC sono biologicamente distinte e molto più primitive della maggior parte delle LTC-IC e di tutte le CFC.

Questo saggio sperimentale è molto importante per definire e comprendere molti aspetti biologici delle cellule staminali emopoietiche umane sia in campo clinico che sperimentale. Inoltre un concetto è evidente: simbolo della cellula staminale emopoietica è la sua capacità di ricostituzione emopoietica completa e duratura. Un altro punto molto importante è l'identificazione di condizioni di coltura in vitro (o "ex-vivo"), che permettano alle cellule staminali emopoietiche umane di autorinnovarsi e di espandersi. In particolare il sangue di cordone ombelicale (CB) ha attratto particolare attenzione come fonte alternativa di cellule emopoietiche per trapianto e terapia genica. Tuttavia, poiché il suo volume è fisiologicamente limitato e perciò non sufficiente per trapiantare pazienti adulti, molto interesse è stato concentrato sui tentativi di espandere le HPSC di sangue cordonale in vitro.

Abbiamo messo a punto un metodo di colture "serum-free" che permette la crescita per lungo termine di cellule emopoietiche appartenenti a tutte le linee cellulari ed anche di quelle più "immature" (CD34⁺ CD38⁻ Lineage⁻). Queste cellule non solo si mantengono fino ad oltre 20 settimane, ma soprattutto si espandono milioni di volte.

Saggi in vitro (CFU-BI, CFU-GEMM ed LTC-IC) per "cellule staminali putative" hanno confermato l'espansione di cellule più immature; ma soprattutto il saggio di ripopolamento in vivo nei topi NOD/SCID, le cosiddette SRC (SCID Repopulating Cells) ha permesso di quantizzare l'entità dell'espansione delle cellule staminali emopoietiche ripopolanti a lungo termine. Tali cellule sono espanse di 70 volte dopo 9-10 settimane di coltura e di migliaia di volte dopo 16 settimane.

L'applicazione in vivo risulterebbe molto importante per il trapianto con sangue di cordone i soggetti adulti e per la terapia genica.

Modificazione Genetica delle Cellule Staminali

Fulvio Mavilio

Ordinario di Biologia Molecolare, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena

Il trapianto di cellule staminali geneticamente modificate costituisce un nuovo approccio terapeutico per numerose malattie del sangue, sia genetiche (immunodeficienze, talassemia), che acquisite (AIDS). La modificazione genetica delle cellule staminali del sangue viene realizzata attraverso l'utilizzo di vettori virali, virus modificati i cui geni vengono sostituiti da quelli terapeutici. Con questa tecnologia, due gruppi in Francia, all'Ospedale Necker di Parigi, e in Italia, Al San Raffaele di Milano, hanno curato con successo più di quindici bambini affetti da due diverse forme di immunodeficienza grave combinata, una malattia fatale nei primi anni di vita. Dopo i primi successi, sono emersi tuttavia anche i limiti della tecnologia, il più grave dei quali è la possibilità di generare tumori nelle cellule del sangue a causa di attivazione fortuita di oncogeni da parte del vettore terapeutico.

Lo scopo delle ricerche in corso è quindi il miglioramento dei sistemi di trasferimento genico, attraverso l'utilizzo di vettori di nuova generazione dotati di profili di efficacia e di sicurezza superiore a quelli attualmente utilizzati. Le nuove tecnologie saranno probabilmente disponibili per l'utilizzo clinico nell'arco dei prossimi tre anni. Va tuttavia sottolineato che, pur con i limiti attuali, la terapia genica è, nelle applicazioni attuali, una terapia salvavita, che offre in ogni caso uno standard di sicurezza e un rapporto rischio-beneficio per il paziente di gran lunga superiori alle alternative terapeutiche esistenti.

**PLASTICITÀ DELLE CELLULE
STAMINALI SOMATICHE**

Basi molecolari della plasticità differenziativa delle cellule staminali emopoietiche

Sergio Ferrari

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

La disponibilità della tecnologia dei DNA microarrays ha fornito uno strumento importante di indagine per lo studio del profilo di espressione di migliaia di geni contemporaneamente, permettendo quindi di valutare quanti e quali geni sono accessi in uno specifico contesto cellulare (1). L'analisi comparativa fatta con questa metodologia in contesti cellulari diversi ha permesso inoltre:

- a) di affrontare il problema della complessità di programmi genetici quali quello proliferativo (2);
- b) di studiare i meccanismi molecolari che stanno alla base della trasformazione e progressione tumorale (3);
- c) di fare una classificazione molecolare di diversi tumori (4);
- d) di correlare l'espressione genica con la prognosi di diverse neoplasie (5);
- e) di identificare i geni espressi nel processo di differenziamento (6);
- d) di identificare i geni espressi in seguito a trattamenti farmacologici (7), aspetto rilevante per la terapia di numerose malattie neoplastiche e non;
- e) di studiare meccanismi di regolazione genica non ancora conosciuti (8).

Da anni il nostro laboratorio si occupa dello studio, a livello molecolare, della mielopoiesi normale e leucemica con particolare interesse alla monocitopoiesi e granulocitopoiesi (9). Nello studio dell'emopoiesi normale uno dei problemi irrisolti riguarda i meccanismi molecolari che stanno alla base del differenziamento della cellula staminale emopoietica multipotente. In particolare i meccanismi di selezione di linea (lineage commitment) a cellule precursori e la regolazione dei programmi differenziativi che portano a cellule terminalmente differenziate profondamente diverse fra loro per morfologia e funzione (processo di maturazione). L'emopoiesi infatti avviene nel contesto microambientale midollare dove sono presenti, oltre alle cellule ematiche, anche numerose cellule accessorie responsabili della secrezione di numerose citochine e fattori di crescita emopoietici. Le cellule staminali emopoietiche dell'adulto (midollari e periferiche) e quelle fetali derivate dal sangue del cordone ombelicale hanno caratteristiche biologiche particolari quali l'autorinnovamento (self-renewal), la capacità di dare origine ai

precursori delle linee differenziative mieloidi e linfoidi (lineage commitment) e quella di ripopolare il midollo di topi irradiati (engraftment). Più recentemente numerosi studi hanno evidenziato la capacità della cellula staminale emopoietica di trans-differenziare, di dare origine cioè a cellule non emopoietiche quali epatociti, cheratinociti, neuroni (developmental plasticity) (10).

Una delle problematiche aperte è se questi segnali extracellulari siano in grado di influenzare le cellule staminali nel passaggio a precursori cellulari di specifiche linee (modello istruttivo) o se permettano semplicemente la sopravvivenza e la proliferazione di predeterminate cellule staminali (modello permissivo) (11). Anche se questo secondo modello sembra quello prevalente, la notevole plasticità delle cellule staminali non permette di chiarire questo dubbio. Inoltre recentemente è stato proposto un modello in cui la fase di transizione da cellula staminale a precursore multilineare e/o monolineare sarebbe determinato dall'antagonismo fra diversi regolatori trascrizionali dell'ematopoiesi (12). Recenti pubblicazioni hanno permesso di caratterizzare mediante lo studio del profilo di espressione genica, il fenotipo molecolare della cellula staminale emopoietica di topo (13) e umana (14). Una ulteriore problematica aperta è legata ai meccanismi molecolari che stanno alla base della maturazione terminale delle cellule emopoietiche.

In questo studio abbiamo applicato la tecnologia dei DNA microarrays alla caratterizzazione molecolare di diverse popolazioni di cellule staminali emopoietiche anche di recente isolamento come le CD34-/Lin- (15). Mediante l'analisi della variabilità del trascrittoma abbiamo cercato di correlare le proprietà biologiche di tali sottopopolazioni di cellule staminali emopoietiche con l'espressione differenziale di numerose famiglie geniche funzionalmente rilevanti quali fattori trascrizionali, trasduttori del segnale, molecole di adesione, marcatori di superficie, marcatori del differenziamento e geni ciclo relati. I risultati da noi ottenuti hanno chiaramente evidenziato che le cellule staminali emopoietiche CD34-/Lin- sono cellule quiescenti, fuori ciclo, hanno attivato delle vie di trasduzione inibitorie della proliferazione come quella dell'IL-10 e dell'IL-17. Le cellule staminali CD34+ sia Lin- che Lin+ sono cellule in ciclo, prevalentemente nella fase G1, con una attività trascrizionale notevolmente più permissiva in grado di esprimere geni rilevanti per l'autorinnovamento, il differenziamento e molecole di adesione importanti per l'engraftment. A conferma di questi dati di espressione, il saggio clonogenico ha evidenziato che le cellule staminali CD34+ sono sensibili, a differenza delle cellule staminali CD34-/Lin-, all'attività mitogenica della trombopoietina. Inoltre sono trascritti geni associati alla Fase G1 del ciclo e funzionalmente coinvolti nella sintesi proteica, nel processamento del RNA, nel rimodellamento della cromatina, ecc. Anche se non sono ancora noti gli stimoli microambientali che permettono l'entrata in ciclo delle cellule staminali CD34-/Lin- possiamo ipotizzare che il modello di emopoiesi più coerente con i nostri dati sia quello dell'espansione simmetrica della cellula staminale emopoietica e non necessariamente il modello di divisione asimmetrica. Inoltre riteniamo che il modello dell'emopoiesi non sia così strettamente gerarchico come molti autori sostengono, ma che le proprietà biologiche dipendano dallo stato cinetico di tali

cellule e che la fase G1 sia la più coinvolta nella modulazione dell'espressione genica alla base dell'attornamento, differenziamento o engrafment e quindi anche della plasticità differenziativa (16) in accordo con il modello di emopoiesi proposto da Quesenberry (17).

Altri studi condotti nel nostro laboratorio hanno riguardato le variazioni del trascrittoma nella fase di commitment (plasticità differenziativa) che porta la cellula staminale CD34+ a precursori mieloblastici, monoblastici, eritroblastici e megacarioblastici. Il modello sperimentale da noi utilizzato è stato quello della coltura in vitro di cellule staminali emopoietiche derivate da sangue di cordone ombelicale, coltivate in presenza di un cocktail di citochine e fattori di crescita tali da sostenere la loro attività proliferativa e da specifici fattori di crescita per condizionarne il passaggio a precursori. Inoltre sempre utilizzando tale modello in vitro abbiamo studiato l'importanza della forma attiva della Vit. D3 nel commitment monocitario. I risultati da noi ottenuti hanno messo in evidenza che dosi fisiologiche di Vit. D3 attivano, mediante la via genomica, cioè attraverso il recettore VDR, il commitment della cellula staminale alla mono-macrofagopoiesi come dimostrato dal saggio clonogenico in metil-cellulosa e come confermato dalle variazioni del trascrittoma (18). La purificazione, fatta mediante biglie immunomagnetiche, di precursori monoblastici CD14+ e mieloblastici CD14- e lo studio in vitro del loro potenziale proliferativo e differenziativo, studiato mediante citometria flusso, ha evidenziato che i monoblasti CD14+ hanno una capacità ciclante molto limitata, 2-3 cicli replicativi, e quindi si arrestano nella fase G1 del ciclo e differenziano spontaneamente, senza necessità di trattamento con agenti inducenti quali Vit. D3, TGF β , M-CSF, a macrofagi. I mieloblasti CD14- conservano invece una notevole capacità ciclante, sono in grado di completare 12-15 cicli replicativi, e una bipotenzialità differenziativa a mono-macrofagi inducibile sia da Vit. D3 e M-CSF per la monocitopoiesi, che ATRA e G-CSF per la granulocitopoiesi. Lo studio in citometria della coespressione di due marcatori di linea come la MPO per la granulocitopoiesi e il CD14 per la mono-macrofagopoiesi, hanno inoltre dimostrato una transizione continua di precursori mieloblastici, MPO positivi e CD14-, verso i precursori monoblastici CD14+ e MPO-. Infatti si osserva la coespressione dei due marcatori in una rilevante percentuale di cellule. Questa è una evidenza importante di "lineage switching" o "intra hematopoietic plasticity" che si realizza a livello di precursori e non di progenitori (19). La comparazione dei profili di espressione genica dei monoblasti e dei mieloblasti ha permesso lo studio di una lista notevole di geni differenzialmente espressi appartenenti a diverse famiglie funzionali come modellatori della cromatina, fattori trascrizionali, recettori per fattori di crescita, marcatori di superficie, proteine dei granuli, molecole di adesione ecc. In particolare fra i fattori trascrizione evidenziati, l'espressione differenziale di MafB, ICSBP1, CEBP β nei monoblasti colpisce per l'entità della loro espressione differenziale. La rilevanza funzionale di Maf B nella monocitopoiesi umana è stata dimostrata da esperimenti di over-espressione mediata da vettori retrovirali, di tale fattore trascrizionale nel contesto staminale fetale CD34+. Tali esperimenti hanno messo in evidenza che il programma genetico attivato da MafB nel contesto dei proge-

nitori CD34+ è specifico dei monoblasti e non dei mieloblasti e questo è confermato anche dal saggio clonogenico in metil-cellulosa (20).

In conclusione possiamo dire che:

- 1) gli studi delle variazioni del trascrittoma nell'emoipoesi normale umana associati a studi funzionali hanno dato informazioni rilevanti riguardo ai meccanismi molecolari che stanno alla base delle proprietà biologiche delle diverse sottopopolazioni di cellule staminali emopoietiche;
- 2) il modello cinetico sembra che sia alla base delle variazioni del profilo di espressione genica che si ha nelle diverse sottopopolazioni di cellule staminali emopoietiche, e che l'espansione di tali cellule è probabilmente più riducibile al modello di espansione simmetrica più che asimmetrica. Il modello cinetico può coesistere con l'ipotesi del modello strettamente gerarchico dell'emoipoesi;
- 3) la plasticità differenziativa delle cellule staminali emopoietiche dipende dagli stimoli microambientali e dalla capacità cicliante di queste cellule e l'induzione di fattori trascrizionali è alla base della scelta delle diverse linee differenziali;
- 4) il lineage switching è possibile anche a livello di precursori e non solo di progenitori emopoietici.

Bibliografia

- 1) Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P. & Trent J.M. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Gen.* 21: 10, 1999.
- 2) Cho R.J., Campbell M.J., Winzler E.A., Steinmetz L., Conway A., Wodicka L., Wolfsberg T.G., Gabrielian A.E., Landsman D., Lockhart D.J., & Davis R.W. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Molecular Cell* 2: 65, 1998.
- 3) Alon U., Barkai D., Notterman D.A., Gish K., Ybarra S., Mack D., & Levine A.J.. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *PNAS* 96: 6745, 1999.
- 4) Bullinger L., Dohner K., Bair E., Frohling S., Schlenk R.F., Tibshirani R., Dohner H., Pollack J.R. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia: *N.E.J.M.* 350: 1605-1616, 2004.
- 5) Valk P.J.M., Verhaak G.W., Beijen M.A., Erpelinck C.A.J., van Doorn-Khosrovani S.B., Boer J.M., Beverloo H.B., Moorhouse M.J., van der Spek P.J., Lowenberg B., Delwel R. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia: *N.E.J.M.* 350: 1617-1628, 2004.
- 6) Tagliafico E., Tenedini E., Bergamaschi A., Manfredini R., Percudani R., Siena M., Zanocco-Marani T., Grande A., Montanari M., Gemelli C., Torelli U., Ferrari S. Gene expression profile of Vitamin D3 treated HL-60 cells shows a phenotypic but not a complete functional conversion to monocytes.

- Cell Death Diff. 9: 1185-1195, 2002.
- 7) Der S.D., Zhou A., Bryan R., Williams G., & Silverman R.H. Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. PNAS 95: 15623, 1998.
 - 8) Young R.A. Biomedical discovery with DNA arrays. Cell 102: 9, 2000.
 - 9) S. Ferrari, R. Manfredini, A. Grande, G. Torelli, U. Torelli. Proliferation, differentiation arrest and survival in leukemic blast cells. Ann. NY Acad. Sci USA 663: 204-214, 1992.
 - 10) Herzog E.L., Chai L., Krause D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood 102: 3483-3493, 2003.
 - 11) Morrison S.J., Nirao M., Shah M., Anderson D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell 88: 287-298, 1997.
 - 12) Orkin S.H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. Nature Rev. Genetics 1: 57-64, 2000.
 - 13) Phillips R.L., Ernst R.E., Brunk B., Ivanova N., Mahan M.A., Deanehan J.K., Moore K.A., Overton G.C., Lemischka I.R. The genetic program of hematopoietic stem cells. Science 288: 1635-1640, 2000.
 - 14) Ng YY, van Kessel B, Lokhorst HM et al. Gene-expression profiling of CD34+ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. J Leukoc Biol 2004;75:314-323.
 - 15) Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. Nat Med 4:1038-1045, 1998.
 - 16) Manfredini R., Zini R., Salati S., Siena M., Tenedini E., Tagliafico E., Montanari M., Zanocco-Marani T., Gemelli C., Vignudelli T., Fogli M., Rossi L., Fagioli M.E., Catani L., Lemoli R.M., Ferrari S. The kinetic status of Hemopoietic Stem Cell (HSC) subpopulations underlies a differential expression of genes involved in self-renewal, commitment and engraftment. Submitted.
 - 17) Quesenberry PJ, Colvin GA, Abedi M et al. The marrow stem cell: the continuum. Bone Marrow Transplant 32 Suppl 1: S19-S22, 2003.
 - 18) Grande A., Montanari M., Tagliafico E., Manfredini R., Zanocco-Marani T., Siena M., Tenedini E., Gallinelli A., Ferrari S. Physiological levels of $1\alpha, 25$ dihydroxyvitamin D₃ induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors. Journal of Leukocyte Biology 71: 641-651, 2002.
 - 19) Montanari M., Gemelli C., Tenedini E., Zanocco Marani T, Vignudelli T., Siena M., Zini R., Salati S., Chiossi G., Tagliafico E., Grande A., Ferrari S. Correlation between differentiation capacity and mRNA expression profiling of CD34+ derived CD14- and CD14+ myeloid precursors. Submitted
 - 20) Gemelli C., Montanari M., Tenedini E., Zanocco Marani T., Vignudelli T., Siena M., Zini R., Salati S., Manfredini R., Grande A., Ferrari S. Retrovirally mediated MafB over-expression induces the monocyte differentiation of monoblastic cell lines and CD34+ hematopoietic progenitors. Submitted.

Rigenerazione dell'endotelio vascolare da cellule staminali somatiche

Francesco Bertolini

Divisione di Emato-Oncologia, Dipartimento di Medicina, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

Fino ad alcuni anni or sono si riteneva che la vasculogenesi (generazione di nuovo endotelio dalle cellule progenitrici) fosse limitata al periodo di sviluppo embrionale, mentre nell'adulto la generazione di nuovi vasi (limitata peraltro alla riparazione delle ferite e al ciclo mestruale femminile) fosse ad esclusiva partenza da cellule endoteliali (CE) mature in un processo denominato angiogenesi. Vi è ora invece evidenza della presenza di cellule progenitriche endoteliali (CPE) presenti nel midollo osseo (MO) e nel sangue periferico (SP) durante la vita adulta.

La presenza di CPE capaci di partecipare alla vasculogenesi è stata dimostrata per la prima volta da Shi et al (Blood 1998) in un modello canino sottoposto a trapianto di MO. In questi animali l'impianto di una protesi vascolare 6-8 mesi dopo il trapianto portava alla generazione di nuovo endotelio da parte di cellule del donatore (identificate grazie a tecniche di biologia molecolare). In un modello di topo transgenico esprime un gene marcatore sotto il controllo di un promoter endotelio-specifico (Flk-1 o Tie-2), CPE derivanti dal MO sono state osservate nella generazione di nuovi vasi nell'endometrio dopo l'ovulazione, nei vasi tumori del colon, nelle ferite cutanee e nei foci di neovascolarizzazione marginali agli infarti del miocardio indotti deliberatamente mediante clamping delle coronarie (Asahara et al., Circ Res 1999).

Un aumento delle CPE circolanti nel SP (valutate mediante citofluorimetria e/o tecniche di coltura cellulare) è stato osservato dopo insulto vascolare, malattie ischemiche, ustioni e nei pazienti neoplastici (Rafii e Lyden, Nat Med 2003; Mancuso et al., Blood 2001). Queste condizioni sono infatti spesso associate al rilascio di chemochine o fattori di crescita endoteliali come VEGF, in un complesso meccanismo di mobilitazione delle CPE dove fattori come le metallo-proteinasi, le molecole di adesione, i macrofagi e le piastrine giocano un ruolo rilevante (Heissing et al., Cell 2002).

Le CPE umane possono essere identificate all'interno della più larga popolazione delle CE circolanti nel SP mediante l'espressione dell'antigene CD133, condiviso peraltro dalle CP del sistema emopoietico. Recenti osservazioni sperimentali hanno peraltro confermato la presenza nel modello murino di CP con poten-

ziale sia endoteliale che emopoietico (Bailey et al., Blood 2004), ma queste cellule sono state identificate come Kit+Sca-1+ Lin- in quanto l'antigene CD133 non è ancora stato sufficientemente studiato nel topo. Oltre che nel MO, sembra possibile che le CPE risiedano nel parenchima dei vasi sistemici ed in alcuni organi. Cellule muscolare isolate con il sistema dell'estruzione del colorante Hoechst (side population cells), infatti, possono generare CE mature (Majka et al., J Clin Invest 2003).

Il ruolo delle CPE nella rivascolarizzazione

a) Retina e sistema nervoso centrale (SNC)

Il diabete, la nascita pre-termine e la degenerazione maculare sono patologie associate ad una rivascolarizzazione abnorme a livello retinico. Questa condizione si può a sua volta associare ad una retinopatia proliferativa. Studi nel topo hanno dimostrato che la progenie di una singola CPE Sca1⁺c-Kit⁺Lin⁻ trasdotta per la green fluorescent protein (GFP), iniettata in un animale letalmente irradiato, può dare origine, dopo ischemia indotta da laser, a nuovi vasi GFP positivi all'interno della retina (Otani et al., Nat Med 2002). Altri studi hanno inoltre dimostrato l'incorporazione nei vasi di CPE Lin⁻ iniettate nel vitreo di topi neonati o adulti con retina deliberatamente fotocoagulata. Sorprendentemente, queste cellule si localizzano in prossimità degli astrociti. Queste osservazioni suggeriscono dunque un ruolo centrale degli astrociti nella formazione dei vasi della retina (Grant et al., Nat Med 2002).

La rivascolarizzazione della zona confinante con la lesione è osservata spesso nei pazienti affetti da ischemia cerebrale. Il trapianto di CPE da donatore maschio in riceventi femminili, sottoposti successivamente a occlusione delle arterie cerebrali, ha dato origine ad una predominanza di cellule del donatore nei siti di rivascolarizzazione studiati 3 giorni dopo l'occlusione (Hess et al, Stroke 2002; Zhang et al., Circ Res 2002).

b) Rivascolarizzazione delle protesi vascolari

Le protesi vascolari autologhe (o, in alternativa protesi costituite da matrici acellulari) vengono utilizzate per sostituire le arterie coronarie. La trombosi è una delle complicanze più temute di questa terapia. Le CPE possono generare delle EC mature (ad attività anti-trombotica) capaci di ricoprire la superficie delle protesi. Dopo lo studio pilota di She et al. (Blood 1998), cellule di MO sono state poste in coltura sulle protesi sintetiche prima dell'innesto, generando una superficie funzionale e ad elevata attività anti-trombotica (Kaushal et al., Nat Med 2001). Questo approccio può quindi facilitare il rimodellamento in vivo della superficie vascolare.

c) Ischemia degli arti

In una serie di studi preclinici, sospensioni cellulari autologhe derivate dal MO, iniettate nel muscolo gastrocnemio reso deliberatamente ischemico, hanno ripristinato la funzione vascolare (Takahashi et al., Nat Med 1999; Kalka et al., PNAS 2000). Una serie di osservazioni cliniche ha confermato la capacità di sospensioni

cellulari del MO di ripristinare la vascolarizzazione nei pazienti affetti da ischemia degli arti (Tateishi-Yuyama, Lancet 2002). Poiché le cellule utilizzate non erano state in alcun modo purificate, resta tuttavia incerto il contributo relativo delle diverse popolazioni (emopoietiche, endoteliali, mesenchimali) presenti nel MO. Va comunque notato che la rivascularizzazione degli arti dipende da una neoformazione bilanciata di vasi arteriosi, venosi e del sistema linfatico, in quanto un deficit di quest'ultimo sistema porta alla formazione di edemi e/o ulcere. L'utilizzo del fattore di crescita VEGF-C sembra di particolare interesse nel promuovere la adeguata proliferazione dei vasi linfatici (Yoon et al., J Clin Invest 2003).

d) Rivascularizzazione del miocardio

Anche se questo argomento viene trattato in maggior dettaglio altrove (Treatment of ischemic heart disease with adult stem cell infusion, C. Stamm), sembra opportuno segnalare una serie di studi preclinici e clinici sull'utilizzo delle CPE nella terapia della malattia ischemica del miocardio. Mentre la presenza di cellule progenitrici miocardio-specifiche - recentemente ipotizzata da Oh et al. (PNAS 2003) - è ancora fonte di controversie, diversi modelli sperimentali hanno permesso di osservare una rigenerazione del miocardio e soprattutto del suo sistema vascolare a partire da cellule progenitrici del MO (Orlic et al., Nature 2001; Kocher et al., Nat Med 2001). Queste osservazioni hanno promosso una serie di studi clinici dove CPE prelevate dal MO (e talvolta purificate come cellule CD133+) sono state utilizzate come supporto all'angioplastica coronaria nei pazienti affetti da ischemia. (Kawamoto et al., Circulation 2001; Strauer et al., Circulation 2002; Assmus et al., Circulation 2002; Kawamoto et al., Circulation 2003; Perin et al., Circulation 2003; Tse et al., Lancet 2003; Stamm et al., Lancet 2003). Nel modello murino, infine, CPE mobilizzate nel SP dalla somministrazione di G-CSF sembrano in grado di riparare una serie di danni al tessuto miocardio indotti dall'ischemia (Orlic et al., PNAS 2001). Anche questa ipotesi è in corso di validazione clinica in una serie di trials internazionali. È inoltre stato recentemente osservato che l'eritropoietina svolge un importante ruolo di mobilitazione delle CPE nel SP (Heeschen et al., Blood 2003).

Il ruolo delle CPE nelle malattie neoplastiche

La prima prova di principio del ruolo delle CPE nella progressione neoplastica è stata ottenuta nel modello murino del topo $Id1^{+/-} Id3^{-/-}$. In questi animali, la maggior parte dei tumori xeno-trapiantati non progrediva a causa di una insufficiente vascolarizzazione. Dopo un trapianto di midollo da donatore $Id1^{+/+} Id3^{+/+}$, invece, diversi tipi di tumore potevano crescere con una normale vascolarizzazione, evidentemente promossa da CPE derivanti dal MO (Lyden et al., Nat Med 2001). Studi successivi in questo stesso ed in altri modelli hanno permesso di definire meglio il ruolo delle CPE nella vasculogenesi tumorale, indicando tra l'altro che le CPE giocano un ruolo più rilevante nei tumori poco differenziati rispetto a quelli più differenziati e che progenitori provenienti dal MO sono responsabili della stabilizzazione dei vasi tumorali mediata dai periciti (Salven et al., Blood 2004).

Differenziazione e determinazione dei progenitori neurali

Lorenzo Magrassi

Sezione di Neurochirurgia, Dipartimento di Chirurgia, Università di Pavia, IRCCS Policlinico S. Matteo, e I.G.M CNR

Una definizione operativa di determinazione che ci deriva dall'embriologia classica intende una cellula o un insieme di cellule come determinato quando avendo separato dalla loro sede naturale prima della definitiva differenziazione le cellule di cui si vuole testare la determinazione, le si trapianta ectopicamente o eterocronicamente e queste, a dispetto di condizioni diverse del microambiente, sono egualmente capaci di completare la loro differenziazione fino ad assumere lo stesso fenotipo e ad esprimere gli stessi antigeni che avrebbero espresso se lasciate nella loro sede d'origine.

Questa definizione si applica male ai progenitori neuronali il cui fenotipo caratteristico comprende di norma anche le connessioni sinaptiche stabilite reciprocamente con altri neuroni. Lo stabilirsi delle connessioni appropriate è, infatti, a volte forzatamente impossibile, se i precursori neuronali sono trapiantati ectopicamente in una sede separata da quella ove risiedono i neuroni pre e post-sinaptici che normalmente stabiliscono connessioni con i neuroni derivati dai progenitori trapiantati. Nonostante questo l'albero dendritico e la morfologia dell'assone d'alcune classi di neuroni mantengono caratteristiche topologiche e geometriche che ne permettono la riconoscibilità anche in assenza di connessioni appropriate. Seppur con queste limitazioni possiamo dunque estendere anche ai neuroni e ai loro progenitori la definizione operativa di determinazione basata sul trapianto, chiedendoci se i progenitori neuronali proliferanti presenti nel sistema nervoso dei mammiferi hanno un destino completamente determinato e non modificabile dal microambiente in cui avviene il differenziamento

Per rispondere a questa domanda *in vivo* è necessario poter operare sul sistema nervoso durante lo sviluppo senza interferire con la gravidanza. Questo è possibile nel ratto e nel topo adottando la tecnica dell'iniezione transuterina sotto controllo visivo (1). Questa tecnica sfrutta la possibilità di transilluminare, una volta che la decidua si è assottigliata e retratta dal polo opposto a quello placentare, le strutture del feto attraverso la parete uterina e le membrane extrauterine con una fibra ottica appoggiata alla parete dell'utero. Nel ratto la retrazione della decidua è sufficiente a permettere la transilluminazione a partire dal 14.5 giorno di gesta-

zione (E14.5) mentre nel topo questo avviene a partire da E13. La tecnica È stata impiegata soprattutto per studiare lo sviluppo del sistema nervoso centrale ma puÓ essere adattata a qualsiasi organo o tessuto dell'embrione come il fegato, gli abbozzi degli arti, il cuore che sia direttamente visualizzabile.

La metodica prevede una volta identificato visivamente il bersaglio (per esempio gli emisferi cerebrali) il suo raggiungimento tramite puntura della parete uterina, delle membrane e dei tessuti embrionali che lo circondano con un microelettrodo di vetro il cui diametro esterno non deve superare i 50 micrometri. In questo modo è possibile iniettare volumi fino a 2 microlitri, volumi maggiori, infatti, si perderebbero al di fuori del tessuto spandendosi oltre il bersaglio voluto.

Con questa tecnica a partire dai primi anni novanta è stato possibile effettuare in tutto il sistema nervoso centrale (CNS) durante lo sviluppo trapianti di progenitori neuroepiteliali dissociati da regioni neurogenetiche attive prima e/o dopo la nascita. La produzione di topi (2) e ratti (3) transgenici esprimenti costitutivamente in tutti i tessuti una variante (eGFP) intensamente fluorescente della proteina fluorescente in verde della medusa *Aequorea victoria* ha grandemente semplificato il problema della distinzione delle cellule trapiantate e dei loro eventuali discendenti da quelle dell'ospite. Infatti, trapiantando cellule esprimenti il transgene codificante per l'eGFP in embrioni di ratto non transgenico si possono distinguere facilmente per la loro fluorescenza le cellule trapiantate. Queste cellule sono inoltre perfettamente visualizzate nella loro complessa morfologia permettendo per esempio di studiare appieno le arborizzazioni dendritiche e assonali dei neuroni eventualmente derivati.

Negli ultimi anni abbiamo pertanto applicato sistematicamente questa tecnica di trapianto intrauterino al sistema nervoso centrale inoculando ectopicamente e/o eterocronicamente progenitori neurali ottenuti da diverse regioni del sistema nervoso al fine di ottenere informazioni riguardanti il loro stato di determinazione.

I neuroni dello strato granulare interno del cervelletto sono generati nel topo nelle prime 3 settimane della vita post natale dalla migrazione di neuroni immaturi dallo strato granulare esterno. I neuroni che migrano sono generati dalla proliferazione all'interno dello strato granulare esterno di progenitori esprimenti il gene *Math1*, che a loro volta sono generati durante la vita embrionale (E12-E15) nello strato germinativo della fossa romboidale per migrare poi sulla superficie del cervelletto in sviluppo a formare lo strato granulare esterno (4).

Se si disseziona lo strato granulare esterno dal cervelletto dagli strati più profondi sia nell'embrione, sia nell'animale postnatale, si può preparare una sospensione di precursori dei granuli cerebellari relativamente pura. Adottando quindi la tecnica del trapianto in embrione di ratto sotto controllo visivo si possono inoculare queste cellule in qualsiasi posizione del CNS. Inoculando nel CNS d'embrioni di ratto E15 una sospensione di 10 (5) cellule isolate dallo strato granulare esterno del cervelletto di topo transgenico esprimente eGFP in tutte le cellule dell'organismo e sacrificando l'animale ospite dopo la nascita a tempi diversi fino all'età adulta si nota che le cellule tendono a disperdersi nel tessuto nervoso dell'ospite senza particolare preferenza per il tessuto cerebellare formando in alcuni casi aggregati (cluster) dove le cellule si mantengono mitoticamente attive per

almeno qualche settimana dopo il trapianto. Riguardo al fenotipo acquisito dalle cellule trapiantate esso è prevalentemente quello di un granulo cerebellare maturo e questo indipendentemente dalla regione extracerebellare dell'encefalo in cui si è integrato (5). La conferma del raggiungimento di una differenziazione in senso appropriato alla regione di provenienza delle cellule indipendentemente dal microambiente ectopico cui sono continuamente sottoposto *in vivo* è venuta dalla dimostrazione del mRNA codificante per la proteina RU49 tipico dei neuroni granulari e della subunità 6 del recettore per il GABA.

Risultati diversi si sono ottenuti trapiantando nel CNS precursori neuronali isolati dalla superficie cerebellare d'embrioni E12 degli stessi transgenici di topo usati come donatori per le cellule post-natali. Anche in questo caso le cellule trapiantate si sono integrate facilmente in sedi extracerebellari ma non sono stati trovati granuli in localizzazioni extracerebellari con l'eccezione delle cellule integrate nella porzione dorsale del tronco una regione con caratteristiche di sviluppo e neuroanatomiche molto simili a quelle del cervelletto (6). Quando però la stessa sospensione di cellule prelevate dalla superficie del cervelletto embrionale fosse invece impiantata in vitro in colture organotipiche di strutture telencefaliche con lo stesso grado di differenziazione di quelle presenti nei ratti ospiti al momento del trapianto intra-utero si notava la differenziazione di granuli cerebellari anche in assenza di qualsiasi struttura cerebellare nelle sezioni ospite (5). In conclusione questi esperimenti indicano la possibilità che precursori dei granuli siano determinati a dare origine ad un fenotipo granulare ben prima di andare incontro all'ultima divisione mitotica anche se almeno in vivo sono necessari fattori permissivi presenti in sufficiente quantità solo in regioni derivate embriologicamente dalla porzione dorsale del tronco dell'encefalo (cervelletto, nucleo cocleare dorsale) perchè possano sopravvivere.

La presenza di precursori neuronali proliferanti ma il cui fato è già determinato ed insensibile alle manipolazioni del microambiente è dimostrabile anche in strutture del CNS esterne al romboencefalo. Durante lo sviluppo del telencefalo i neuroni che andranno a comporre i nuclei dei gangli della base derivano dalla proliferazione di cellule contenute nelle eminenze gangliari mediale e laterale. I neuroni gabaergici di dimensioni medie ricchi di spine dendritiche (MSN, medium spiny neurons) costituiscono circa il 95% dei neuroni dello striato e sono generati nel ratto a partire da E14 fino al 1 giorno della vita post-natale. Se i precursori neuronali contenuti nell'eminenza gangliare laterale di un embrione di ratto E14 vengono dissociati e trapiantati come sospensione di singole cellule nel CNS di feti di ratto E15-E16 queste cellule sono capaci di integrarsi e sopravvivere anche al di fuori di strutture di origine telencefalica quali per esempio il midollo oblungato ed il ponte (7). Come nel caso dei progenitori dei granuli cerebellari, anche i progenitori striatali possono integrarsi come cellule isolate o come aggregati (clusters) composti da centinaia - migliaia di cellule derivate dal donatore. Studiando la presenza di marcatori striatali tipici dei MSN come le fosfoproteine ARPP-21 e DARP-32 si nota che una quota preponderante delle cellule presenti negli aggregati, anche se al di fuori del telencefalo, esprimono questi marcatori (7).

Questo suggerisce che i progenitori striatali, benché ancora proliferanti, siano già determinati in quanto una volta trapiantati ed esposti ad un microambiente diverso da quello telencefalico sono in grado di riaggregarsi in strutture ectopiche con caratteristiche anatomiche ed immunofenotipiche del tutto analoghe a quelle trovate nei gangli della base.

Lo stesso comportamento e cioè, differenziazione in senso appropriato per l'origine e non la sede del trapianto, è stato recentemente dimostrato per precursori neuronali derivati dalla neocorteccia⁸. Anche queste cellule d'origine telencefalica, sempre trapiantate come sospensione di singole cellule possono integrarsi singolarmente o formare aggregati nel tessuto ospite, invariabilmente le cellule contenute negli aggregati si differenziano in accordo con il loro comportamento nella sede d'origine e non con quello della regione ectopica in cui sono state trapiantate (8).

Anche trapiantando precursori neuronali che provengono da strutture originatesi da placodi al di fuori della placca neurale, quali i precursori neuronali presenti nella mucosa olfattiva dell'embrione e dell'adulto, si possono trovare esempi di progenitori neuronali proliferanti ma già determinati. Infatti, è stato dimostrato che quando queste cellule sono trapiantate all'interno del CNS embrionale di ratto E15 le cellule trapiantate possono sopravvivere integrandosi nel tessuto sia come cellule singole, che apparentemente acquisiscono caratteristiche peculiari al tessuto dell'ospite in cui si sono localizzate, sia riunendosi a formare aggregati all'interno dei quali le stesse cellule si differenziano con caratteristiche tipiche dei neuroni olfattivi quali lo sviluppo di cilia recettoriali, l'espressione di proteina marcatore delle cellule olfattive (olfactory marker protein, OMP) tanto da formare un epitelio con caratteristiche simili a quelle della mucosa olfattiva (9).

Queste conclusioni comuni a precursori neuronali proliferanti non hanno solo importanza per la biologia dello sviluppo ma hanno implicazioni per l'avanzamento delle terapie cellulari del sistema nervoso centrale. Infatti, la tendenza dei precursori neuronali ad aggregarsi spontaneamente dopo il trapianto e a differenziare in accordo con la loro origine invece che con la sede in cui sono stati trapiantati, è vera sia nel caso dei trapianti in embrione che in adulti. Per questo anche nelle applicazioni cliniche la diffusione delle cellule trapiantate a coprire completamente il territorio afflitto dalla malattia rappresenta ancora un importante problema che si accentua nell'uomo per le elevate dimensioni delle strutture bersaglio e per il limite nel numero di tracce effettuabili con le canule per l'impianto stereotassico senza aumentare troppo il rischio ulteriore di danno meccanico al tessuto cerebrale o il rischio di sanguinamento (10).

Bibliografia essenziale

1. Magrassi L. Vision-guided technique for cell transplantation and injection of active molecules into rat and mouse embryos. *Methods Mol Biol.* 2002; 198: 327-40.
2. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997; 407: 313-9.

3. Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 2625-35.
4. Ben-Arie N, Bellen HJ, Armstrong DL, McCall AE, Gordadze PR, Guo Q, Matzuk MM, Zoghbi HY. Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature.* 1997; 390: 169-72.
5. Carletti B, Grimaldi P, Magrassi L, Rossi F. Specification of cerebellar progenitors after heterotopic-heterochronic transplantation to the embryonic CNS in vivo and in vitro. *J Neurosci.* 2002; 22: 7132-46.
6. Mugnaini E. GABA neurons in the superficial layers of the rat dorsal cochlear nucleus: light and electron microscopic immunocytochemistry. *J Comp Neurol.* 1985; 235: 61-81.
7. Magrassi L, Ehrlich ME, Butti G, Pezzotta S, Govoni S, Cattaneo E. Basal ganglia precursors found in aggregates following embryonic transplantation adopt a striatal phenotype in heterotopic locations. *Development.* 1998; 125: 2847-55.
8. Carletti B, Grimaldi P, Magrassi L, Rossi F. Engraftment and differentiation of neocortical progenitor cells transplanted to the embryonic brain in utero. *J Neurocytol.* 2004; 33: 309-19.
9. Magrassi L, Graziadei PP. Lineage specification of olfactory neural precursor cells depends on continuous cell interactions. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996; 96: 11-27.
10. Magrassi L. Multipotent neuroepithelial stem cell differentiation: some caveats for future clinical applications. *Funct Neurol.* 2001; 16: 29-34.

Plasticità delle cellule staminali neurali

Angelo Vescovi

Istituto Scientifico Universitario San Raffaele, Milano

Che cosa sono

Sembra incredibile che l'enorme varietà di forme, dimensioni e competenze che si ritrova tra le cellule dei vari tessuti di un organismo derivi da un unico tipo cellulare "primordiale", una sorta di "antenato cellulare comune". Stiamo parlando delle cellule staminali embrionali, cioè di quelle cellule che, pur contenendo tutte le informazioni genetiche necessarie per dar origine a qualunque cellula dell'organismo adulto e per dirigere il loro organizzarsi in tessuti, organi ed apparati, sono assolutamente indifferenziate, prive di qualunque "specializzazione" di tipo strutturale o funzionale.

«Le cellule staminali embrionali, presenti solo nell'embrione di pochi giorni sono le uniche cellule veramente "totipotenti", capaci cioè di dare effettivamente origine a tutti i tipi di cellule presenti nell'organismo. Le cellule staminali embrionali degli animali e dell'uomo possono essere isolate e coltivate in laboratorio. In opportune condizioni di coltura, possono proliferare per diversi anni e produrre un gran numero di cellule sempre uguali tra loro, e sempre assolutamente indifferenziate e totipotenti. Se, ad un certo punto si vuole ottenere una cellula della pelle, del cuore o del sangue, "basta" esporre un gruppetto di cellule staminali embrionali a particolari sostanze in grado di dirigerne il differenziamento nella direzione desiderata e attendere che le cellule inizino a dividersi. Ogni cellula staminale iniziale allora, dividendosi, darà origine a due cellule figlie, una ancora staminale totipotente, l'altra indirizzata verso una particolare via di differenziamento.

Ma le cellule staminali non sono solo queste. Ne esistono, infatti, almeno altri due tipi di cellule staminali: le staminali fetali e le staminali somatiche adulte.

«Le prime si trovano sempre nell'embrione, ma uno stadio di sviluppo più avanzato delle staminali embrionali vere e proprie. Queste cellule sono ancora in grado di moltiplicarsi rapidamente, ma sono un pò più specializzate rispetto alle staminali embrionali e non possono dar origine proprio a tutti i tipi di cellule presenti nell'organismo. Si dice, quindi, che sono "pluripotenti", ma non "totipotenti". Anche queste cellule, isolate dall'embrione e poste in coltura possono essere

mantenute in laboratorio per alcuni anni e, se necessario, indotte a differenziarsi. Le cellule staminali somatiche adulte, invece, come dice il nome, sono presenti nei tessuti degli animali adulti, uomo compreso. Queste cellule sono ad un livello di differenziamento decisamente più avanzato rispetto alle cellule staminali embrionali e alle staminali somatiche embrionali, ma non sono completamente specializzate per svolgere una certa funzione e mantengono ancora una certa capacità di dar origine a tipi cellulari differenti. I ricercatori, però, non sono ancora riusciti a stabilire i limiti di questa potenzialità residua». Per esempio, si sa da tempo che nel midollo osseo, esistono cellule staminali somatiche adulte capaci di dar origine ai globuli rossi, ai linfociti, alle piastrine, alle cellule della cartilagine e delle ossa, o che negli strati più profondi della pelle esistono altre cellule staminali adulte capaci di differenziarsi in cellule dell'epidermide. Si sa, cioè, che le cellule staminali adulte presenti in un certo tessuto sono in grado di differenziarsi in tutti i tipi cellulari tipici di quel tessuto. Negli ultimi anni, però, ci sono sempre maggiori evidenze che una cellula staminale adulta di un certo tessuto, isolata e coltivata in laboratorio in opportune condizioni, può essere indirizzata verso vie di differenziamento diverse». Il che significa, per esempio, che una cellula staminale presente nel cervello adulto può essere indotta a svilupparsi in una cellula muscolare o in una cellula del sangue, anziché in una cellula nervosa. I ricercatori hanno chiamato questo fenomeno "transdifferenziamento". Quindi, finché le cellule staminali adulte sono confinate all'interno del loro tessuto originario, la loro unica possibilità è di differenziarsi in cellule di quel tessuto. Ma se vengono prelevate e coltivate in laboratorio, il loro destino sarà dettato non tanto dalla loro origine embrionale, quanto dai segnali biochimici che si ritrovano nell'ambiente.

A cosa servono

Le cellule staminali adulte possono essere considerate "cellule di riserva", serbatoi da cui i tessuti del nostro corpo possono attingere per sostituire le cellule troppo vecchie, o troppo usurate per continuare a svolgere la loro funzione. Su queste cellule si basano, quindi, il rinnovamento fisiologico dell'organismo e la possibilità di riparare danni che determinano una perdita di materiale organico, come un'abrasione o un'ulcera.

Fino ad una decina di anni fa, si riteneva che la possibilità di rinnovarsi non fosse una caratteristica comune a tutti i tessuti dell'organismo. Il tessuto nervoso, per esempio, era considerato un tessuto non rinnovabile. In pratica, si riteneva che i neuroni presenti alla nascita potessero crescere, svilupparsi, invecchiare e morire, ma mai, in nessun caso, essere sostituiti. Questo perché nel cervello non erano mai state trovate cellule staminali. Adesso, però, sappiamo che non è così. Nel 1992, infatti, sono stati trovati piccoli serbatoi di cellule staminali anche in alcune zone molto profonde e ben delimitate, in corrispondenza dei ventricoli cerebrali. Quindi, anche se raramente e solo in alcune parti del cervello, il processo di sostituzione e rinnovamento può avvenire. Ed è una scoperta di non poco conto perché apre la strada a nuove, straordinarie possibilità terapeutiche.

Prospettive terapeutiche e difficoltà attuali

Se si considerano contemporaneamente la possibilità del cervello di rinnovare i propri neuroni a partire dalle cellule staminali e quella di produrre queste cellule staminali in laboratorio, viene spontaneo pensare di poter utilizzare le cellule staminali coltivate in laboratorio per riparare i danni indotti da malattie degenerative del sistema nervoso, come il morbo di Parkinson, l'Alzheimer, la sclerosi multipla o la sclerosi laterale amiotrofica. Ma le potenzialità delle cellule staminali sono ancora più ampie, perché lo stesso approccio potrebbe essere utilizzato anche per sostituire cellule in altri organi e, quindi, anche per curare patologie come il diabete, dovuto alla morte delle cellule delle isole pancreatiche che producono l'insulina, o riparare i danni apportati al tessuto cardiaco da un'ischemia o da un infarto. Questo nel caso si isolassero cellule staminali da questi tessuti/organi.

Con le cellule staminali cerebrali si aprirebbe anche la possibilità del trapianto autologo, o autotrapianto, eliminando molti dei problemi di compatibilità immunologica o di rigetto. Di conseguenza non sarebbe più necessaria la terapia immunosoppressiva, indispensabile invece nel caso di trapianto di cellule da un donatore estraneo. Il problema è che, per esempio, per curare le malattie degenerative del sistema nervoso bisogna prelevare le cellule staminali dal cervello, farle crescere in coltura e reimpiantarle nel cervello del paziente nella zona giusta. È un lavoro che si sta già facendo negli animali, a livello sperimentale, ma è tutt'altro che semplice e l'esito è ancora da verificare. A maggior ragione questo è vero per l'uomo, che dovrà attendere ancora qualche anno, probabilmente non pochissimi, prima di poter usufruire di queste tecniche.

Lo studio delle cellule staminali offre anche l'occasione di approfondire la conoscenza dei meccanismi di differenziamento cellulare, aprendo la strada allo sviluppo di strategie terapeutiche di "riparazione minimamente invasiva" estremamente interessanti. «Le cellule staminali adulte potrebbero, infatti, essere indotte a differenziarsi somministrando *in situ* i segnali biochimici capaci di indirizzarle verso la forma desiderata. Le sostanze in questione verrebbero, cioè, iniettate direttamente in un serbatoio di cellule staminali presente in un certo tessuto del paziente, senza il bisogno di prelevarle, trattarle in laboratorio e poi reinserirle nel "posto" giusto. Questo approccio potrebbe essere molto utile per curare malattie come il morbo di Parkinson, la sclerosi multipla ed altre ancora. Nel caso del Parkinson, per esempio, le cellule staminali già presenti nel cervello della persona malata potrebbero essere indotte a differenziarsi e a rimpiazzare quelle degenerate della *substantia nigra*, con una semplice iniezione. È bene ribadire, però, che oggi queste sono solo tecniche in fase sperimentale. Per poterle applicare in ambito clinico è necessario capire tutti i passaggi del processo di differenziamento e individuare tutti i fattori capaci di influenzarlo».

Comunque, in questo contesto, sono stati recentemente fatti passi da gigante. In particolare, nell'Aprile del 2003, il nostro gruppo, in collaborazione con quello diretto da Gianvito Martino, sempre del San Raffaele, ha dimostrato l'enorme potenziale terapeutico delle staminali cerebrali nel contesto dello sviluppo di cure innovative per la sclerosi multipla. Nel dettaglio:

La sclerosi multipla è una malattia neurologica altamente invalidante che colpisce milioni di persone in tutto il mondo.

Attualmente, in Italia, i pazienti con sclerosi multipla sono circa 50 mila, a cui si aggiungono ogni anno circa 1.800 nuovi casi. L'esordio si registra preferenzialmente nella fascia d'età che va dai trenta ai 50 anni. La causa esatta della sclerosi multipla è tutt'ora sconosciuta. Si sa che dipende dall'instaurarsi di eventi infiammatori che portano alla distruzione della guaina mielinica, il materiale gelatinoso che riveste i nervi e che è essenziale per la corretta trasmissione degli stimoli nervosi. La mielina funziona da isolante, più o meno come il rivestimento dei cavi elettrici, e quando viene distrutta dalla malattia le cellule nervose non riescono più a comunicare tra loro né con gli organi periferici, in particolare con i muscoli. Nei pazienti affetti da sclerosi multipla, la progressiva distruzione della mielina in varie aree del cervello e del midollo spinale determina l'accumularsi di handicap psico-fisici gravi e permanenti.

Le uniche terapie sviluppate fin'ora sono indirizzate a contrastare la reazione infiammatoria e si basano principalmente sulla somministrazione di farmaci immunosoppressori e immunomodulanti. Questo approccio ha, però, un'utilità e un'efficacia limitate e può rallentare l'evoluzione nella malattia solo se questa viene colta nelle fasi precoci. Poco o nulla può fare, invece, negli stadi più avanzati né per riparare i danni già presenti. Inoltre, non andando ad agire sulla causa del disturbo, non è una terapia risolutiva.

La nostra sperimentazione, condotta in roditori affetti dalla forma sperimentale di sclerosi multipla, ha dimostrato come le cellule staminali cerebrali, una volta iniettate per via endovenosa o intracerebrale, sono in grado di raggiungere selettivamente le aree del cervello e del midollo spinale colpite dal processo infiammatorio-demielinizzante e di ricostruire la mielina che in queste aree è danneggiata. Per di più la ricostruzione è rapida (richiede circa un mese dall'iniezione di cellule) e si esplica soprattutto quando le staminali vengono iniettate dopo l'insorgenza della malattia. La nuova mielina riesce a riavvolgere in maniera appropriata i nervi denudati dalla sclerosi, determinando il ripristino della normale conduzione degli impulsi da parte dei nervi danneggiati.

Il risultato è stato che i topi paralizzati dalla malattia dopo un mese dal trattamento hanno ricominciato a camminare.

L'elemento innovativo dello studio è stata la dimostrazione che semplicemente iniettando in un vaso sanguigno periferico, nel nostro caso a livello della coda del topo, le cellule staminali cerebrali adulte si ottiene una ricostruzione, sia anatomica sia funzionale, della guaina mielinica in più aree danneggiate del sistema nervoso. E, soprattutto, che in poco tempo si assiste ad un significativo miglioramento della malattia, sia dal punto di vista clinico sia neurofisiologico. La ragione per cui le cellule staminali cerebrali adulte si comportano in questo modo sembra essere legata alla loro particolare natura. Infatti, normalmente queste cellule risiedono nel cervello adulto dove svolgono funzione di mantenimento dell'integrità del tessuto cerebrale. Non è chiaro il motivo per cui le cellule staminali che già si trovano nel cervello dei topi malati non riescano di per sé a riparare le lesioni. L'ipotesi più probabile è che la cronicità dell'evento infiammatorio, tipico

della sclerosi multipla, possa esaurire con il tempo la riserva naturale di staminali cerebrali.

Inoltre, il meccanismo con cui queste cellule raggiungono le aree danneggiate del sistema nervoso e le riparano, dopo iniezione in vena, è legato alla presenza sulla loro superficie di molecole di adesione. Queste ultime funzionano da “sensori del danno”: percepiscono i segnali di pericolo inviati dalle cellule nervose lesionate dalla sclerosi multipla e indirizzano le staminali nelle zone da riparare. Ciò significa che le cellule staminali iniettate si localizzano e si attivano solo su richiesta, cioè solo quando è presente la reazione infiammatoria indotta dalla malattia. In condizioni di scarsa infiammazione le cellule staminali non fanno nulla, come se sapessero che non c'è bisogno di loro. Non è un dettaglio da trascurare: in questo modo, il nuovo approccio terapeutico è potenzialmente in grado di agire in modo mirato nelle fasi avanzate della malattia, per le quali oggi non si hanno rimedi a disposizione.

Infine, le cellule staminali iniettate hanno dimostrato di essere in grado, non solo di determinare una riparazione diretta del danno, creando nuova mielina, ma anche di influenzare le capacità autoriparative del tessuto malato in cui si integrano. Normalmente, il tessuto cerebrale danneggiato reagisce ai trattamenti cicatrizzando la zona colpita: ciò significa che la parte di cervello interessata viene irrimediabilmente persa. Quando si iniettano le cellule staminali, invece, la cicatrizzazione viene inibita in favore dell'attivazione delle cellule ancora vitali presenti nel cervello dell'animale malato. Queste ultime iniziano così a produrre mielina e moltiplicarsi, contribuendo alla riparazione del danno.

Non sappiamo ancora se la cura, per ora sperimentata solo su topi da laboratorio, darà risposte paragonabili anche nell'uomo. È interessante, però, notare che per la prima volta abbiamo a che fare con una terapia che ripara anziché danneggiare, come invece avviene nel caso delle terapie immunosoppressive attualmente utilizzate, indirizzate a indebolire la reattività del sistema immunitario. Inoltre è un approccio terapeutico che, contrariamente ai farmaci, agisce in modo naturale perché sfrutta le normali capacità riparative delle cellule staminali, limitando così gli effetti collaterali. Anche se i presupposti ci sono tutti, la strada da percorrere è lunga. La prossima tappa sarà la sperimentazione sulle scimmie sulle quali verranno utilizzate cellule staminali prelevate dal tessuto cerebrale umano, che fortunatamente sono già disponibili. Se questa fase ci porterà ai risultati sperati, potremo passare alle prime sperimentazioni sull'uomo, ma sarà necessario attendere non meno di altri cinque anni. Non resta che avere pazienza, dunque, e un pizzico di ragionevole speranza.

Le cellule staminali, per ora, ci stanno facendo intravedere soluzioni terapeutiche impensabili fino a qualche anno fa, ma non danno ancora solide garanzie di affidabilità. Al di là dell'entusiasmo per le nuove scoperte, quindi, ci si deve sempre ricordare che serve tempo per passare dai laboratori di biologia ai reparti di un ospedale.

Differenziazione di midollo osseo umano adulto in cellule muscolari scheletriche

Davide Soligo, Patrizia Bossolasco

Centro Trapianti di Midollo Osseo, IRCCS Ospedale Maggiore, Milano

Base di partenza scientifica

Numerosi lavori riportano dati riguardanti la plasticità delle cellule staminali da midollo osseo (capacità di differenziare in tipi cellulari diversi dal tessuto d'origine) sia *in vitro* che *in vivo*. In particolare, il trapianto di midollo *in toto* per via sistemica in animali letalmente irradiati o l'iniezione di cellule direttamente nel muscolo danneggiato portano all'attecchimento di cellule muscolari di origine ematopoietica. Oltre al midollo *in toto*, per questi esperimenti sono state utilizzate popolazioni selezionate per markers di superficie o caratteristiche funzionali. I tipi cellulari utilizzati si possono suddividere in due principali categorie:

← cellule mesenchimali (MSCs) ottenute per aderenza su plastica:

Nel 1976, Friedenstein (1) dimostra che una piccola frazione di cellule presenti nel midollo osseo che aderisce sul fondo di una piastra di coltura, possiede caratteristiche di multipotenzialità essendo in grado di differenziare in osteoblasti, condrociti e adipociti. Nel 1995 Wakitani (2) differenzia, benché sporadicamente e con bassa efficienza, MSCs di ratto in muscolo scheletrico *in vitro* usando la 5-azacitidina, un analogo della citidina noto per indurre ipometilazione del DNA e quindi probabilmente in grado di attivare geni specifici. La 5-azacitidina è stata recentemente utilizzata con buoni risultati anche su particolari precursori multipotenti (MAPCs) da Reyes et al. (3). Nel 1999, Phinney et al. (4) ottengono sempre *in vitro*, cellule muscolari da MSCs dopo trattamento con amfotericina-B. Il potenziale miogenico delle MSCs è stato parzialmente dimostrato anche *in vivo* (5, 66).

← cellule emopoietiche CD45+:

Cellule muscolari scheletriche possono essere ottenute *in vivo* anche dalla frazione non aderente del midollo. Ferrari et al. (5-7) dimostrano la rigenerazione muscolare di fibre galattosidasi positive derivanti da topi donatori transgenici MLC3F-lacZ dopo il trapianto direttamente in muscolo sia di midollo *in toto* che della sua frazione non aderente. Il muscolo danneggiato è inoltre in grado di

richiamare cellule a potenziale miogenico dal circolo sanguigno. Infatti, se il midollo di topi MLC3F-lacZ viene trapiantato in topi letalmente irradiati, si osservano nel muscolo del topo ricevente fibre galattosidasi positive. Il potenziale miogenico delle cellule CD45+ è stato riconfermato da diversi autori (8) utilizzando anche sottopopolazioni di cellule emopoietiche selezionate per caratteristiche di staminalità. Una popolazione di cellule staminali emopoietiche dette “side population” (SP) fenotipicamente Sca-1+, c-Kit+, CD45+ e caratterizzate da un’elevata capacità di estrarre il colorante vitale Hoechst 3042 (9) se trapiantata in topi irradiati contribuisce alla rigenerazione muscolare (10) anche a livello di singola cellula (11). Diversi studi riportano inoltre, dopo trapianto sia di midollo in toto (5, 12, 13) che di cellule da SP (12) in topi mdx, la formazione di fibre muscolari da donatore distrofina positive.

Tuttavia, rimangono ancora molti punti da elucidare nello studio della plasticità delle cellule emopoietiche in senso muscolare:

o L’individuazione di una cellula midollare multipotente rimane controversa. Non è stato identificato nessun marcatore che caratterizzi in modo inequivocabile un precursore miogenico nel midollo osseo.

o La maggioranza dei dati pubblicati riguardano studi *in vivo* eseguiti nel topo. Un solo lavoro riporta dati riguardanti la presenza di fibre distrofina positive da donatore in biopsie muscolari di un paziente affetto da distrofia muscolare dopo trapianto di midollo (14).

o Esistono pochi dati *in vitro* e che prevedono essenzialmente l’utilizzo di una sostanza demetilante, la 5-azacitidina per il differenziamento miogenico.

o Mediamente, l’efficienza del trapianto di cellule emopoietiche è bassa con una percentuale di fibre muscolari tra 0.1% e 1%.

o La conversione miogenica di cellule emopoietiche potrebbe essere spiegata attraverso un meccanismo di fusione come ipotizzato per molti tessuti (15, 16). Questo fenomeno sembra avvenire solo a basse frequenze tra cellule emopoietiche e muscolari (18) (fatta eccezione per le MSCs) (17).

Scopo del lavoro

Ci si propone di

- identificare nel midollo osseo umano adulto una popolazione di cellule capaci di differenziare in senso miogenico (cellule muscolari scheletriche).
- mettere a punto una metodica di differenziamento miogenico *in vitro*.

Materiali e metodi

- Sono state utilizzate cellule midollari *in toto* ottenute da frammenti costali prelevati da 36 pazienti sottoposti a chirurgia toracica o cellule mononucleate da midollo osseo di 29 donatori per trapianti allogenici previo consenso informato.

I frammenti costali sono stati ripuliti mediante “flushing” e le cellule così ottenute seminate in fiasca. Cellule mononucleate sono state ottenute per separazio-

ne su gradiente da campioni di midollo osseo da aspirati midollari da cresta iliaca. Un numero variabile da 1 a 3×10^6 cellule per cm^2 sono state coltivate in terreno DMEM con l'aggiunta di 10% di siero fetale bovino (FCS). Settimanalmente, il surnatante delle colture è stato riseminato in una nuova fiasca e terreno fresco aggiunto alla fiasca originale. Le frazioni aderenti (A1, A2, A3) e i surnatanti (NA1, NA2, NA3) di queste colture sono stati quindi osservati al microscopio per la presenza di miotubi e analizzati, *in situ* o dopo tripsinizzazione, con metodiche immunocitochimiche, di Western Blot e Real-time RT-PCR per la presenza di marcatori muscolo specifici.

Risultati

Dall'**osservazione morfologica** al microscopio ottico rovesciato delle cellule coltivate è emerso che nella maggior parte delle colture, le cellule mostrano una morfologia tipicamente stromale con presenza di sporadiche cellule binucleate. In nessuno dei casi analizzati sono stati osservati miotubi nelle colture derivate dall'adesione di cellule della prima e della seconda settimana di coltura. Nelle frazioni A3 e A4 da costa e cresta iliaca sono state osservate numerose strutture multinucleate simili a miotubi nel 19.4% (7 su 36) delle coste e 3.4% (1 su 29) delle creste ilache. Quando presenti, ricoprono il 50-80% della superficie delle fiasche (Fig. 1) e risultano fortemente positive in immunocitochimica per desmin, α -sarcomeric-(α -SR) actin, M-cadherin, slow myosin heavy chain, dystrophin, N-CAM, and myogenin. L'espressione di CD90 osservata nelle cellule mononucleate è invece assente nei miotubi (Fig. 2).

Lo studio mediante **immunocitochimica** dei campioni al tempo zero e delle varie frazioni aderenti ha evidenziato i seguenti risultati:

Le cellule midollari al T0 mostravano una negatività per la presenza di marcatori specifici di cellule muscolari quali la desmina. Dall'analisi sia delle frazioni

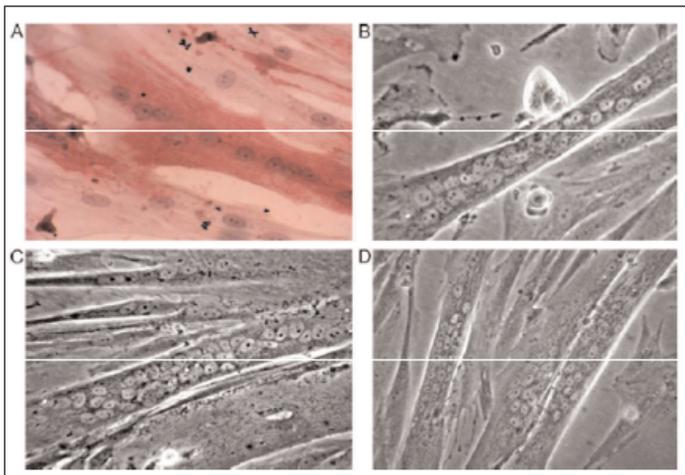


Fig. 1

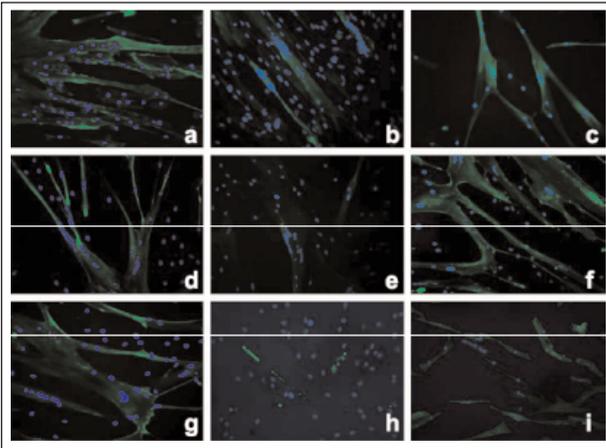


Fig. 2

aderenti che dei surnatanti si è invece riscontrata una percentuale di cellule desmina positive tra lo 0 e il 6.5% (Tab. 1 e Fig. 3).

Tab. 1

	T0	A1	NA1	A2	NA2	A3	NA3
Costa	0	6.3	0.5	6.4	0.1	0	0.2
Cresta Iliaca	0	0.5	0.05	2.2	0.025	6.5	-

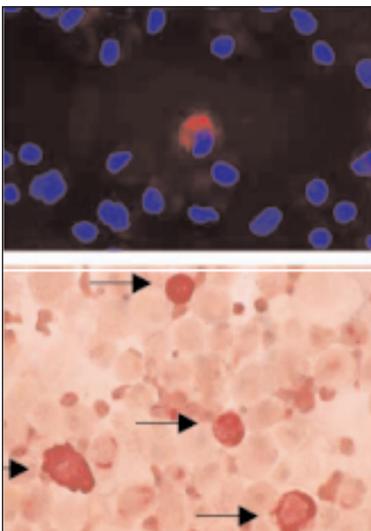
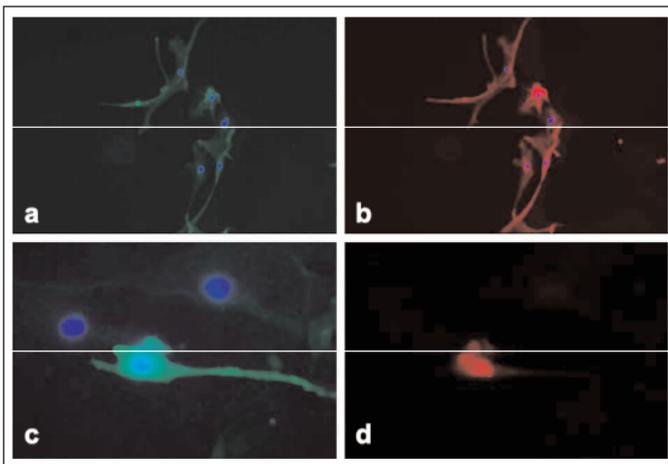


Fig. 3

L'analisi in **citofluorimetria a flusso** mostra la presenza di una piccola percentuale di cellule positive per marcatori i miogenici desmina e N-CAM al T0 co-esprimenti il CD45 e un leggero aumento di queste popolazioni nella la frazione NA1 rispetto al T0 (Tab. 2).

Tab. 2

Cresta Iliaca	T0	NA1	Costa	T0	NA1
CD45	85.37±7	60.27±7	CD45	71.48±24	34.34±16
CD133	1.60±0.5	0.38±0.28	CD133	1.35±0.99	0.46±0.6
CD34	1.75±0.7	0.48±0.1	CD34	1±0.43	0.18±0.18
CD14	12.46±1	17.60±5.6	CD14	5.41±1.44	3.6±1.7
N-CAM	2.3±1.64	2.62±2	N-CAM	1.45±0.9	1.03±1.3
Desmina	0.81±0.4	1.46±1.2	Desmina	0.65±0.25	1.41±1.9

**Fig. 4**

Cellule mononucleate da midollo osseo adulto separate immunomagneticamente per la presenza del marcatore N-CAM hanno mostrato una doppia positività anche per desmin e Myf5 (Fig. 4).

I campioni al T0 e le frazioni NA1 sono inoltre stati analizzati mediante **Western Blot** per l'espressione dei seguenti marcatori: desmin, slow myosin heavy chain (MyHC), α -sarcomeric- (α -SR) actin (Novocastra) mostrando una certa variabilità per l'espressioni di questi marcatori tra i vari campioni analizzati (Tab. 3).

Tab. 3

		Desmina	MyHC	α -SR-actin
BM da Cresta iliaca e Costa	T0	-	-	75%
	NA1	43%	-	100%

I campioni a T0 e le frazioni non aderenti sono invece stati analizzati mediante **Real-time RT-PCR** per la presenza di Myf5, MyoD, myogenin, and desmin.

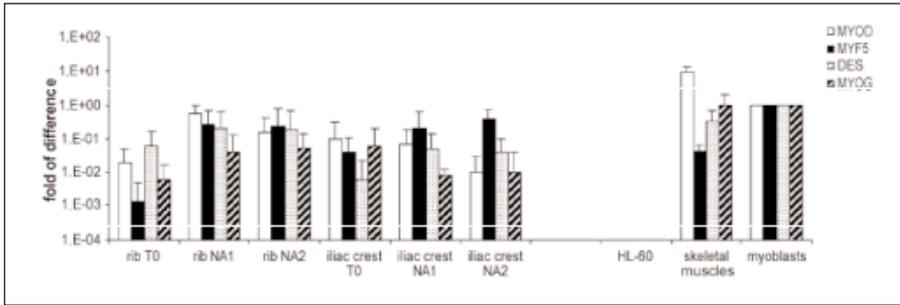


Fig. 5

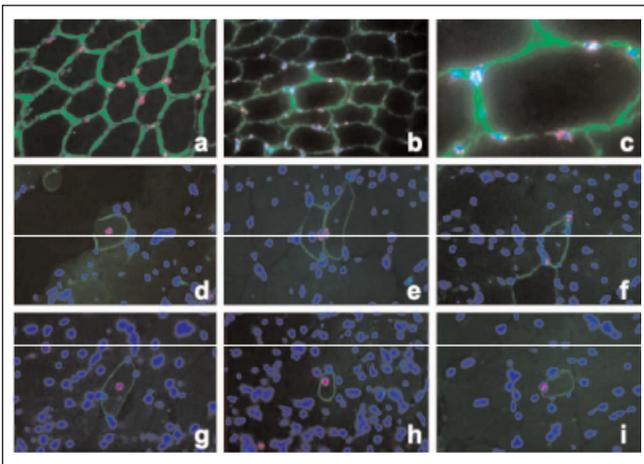


Fig. 6

Tutti campioni analizzati risultano positivi per tutti i marcatori analizzati con un aumento di 10 volte dell'espressione nelle NA rispetto al T0 (Fig. 5).

Il trapianto nella zampa tibiale anteriore di cellule midollari umane *in toto* in topi immunodeficienti (10 NOD-SCID e 12 NOD/RAG) previamente trattati con cardiotossina per indurre degenerazione muscolare ha evidenziato, a due mesi dal trapianto, la presenza di cellule muscolari derivanti da midollo osseo umano anche se in bassa percentuale (da 0.06 \pm 0.06 a 0.19 \pm 0.1) esprimenti distrofina umana e positive in FISH per la presenza di centromeri umani.

Conclusioni

Si dimostra la pre-esistenza nel midollo osseo di cellule a potenziale miogenico in grado di differenziare *in vitro* sporadicamente, ma con alta efficienza, in miotubi positivi per la maggior parte dei marcatori muscolo specifici. Da queste cellule si è ottenuta differenziazione in senso miogenico nel 20% degli esperimenti con una metodica culturale semplice e senza l'utilizzo di sostanze differenzianti (5 azacitidina, amfotericina-B, ecc...). Questa metodica di preplating, uti-

lizzata anche per la coltura di mioblasti da muscolo scheletrico, consiste nel “purificare” le cellule facendo aderire la frazione mesenchimale del midollo nei primi passaggi di coltura. Si è inoltre osservato un aumento del numero di cellule desmina e N-CAM positive co-esprimenti il CD45 nelle varie frazioni che potrebbero, per le loro caratteristiche fenotipiche, essere quelle che danno miotubi *in vitro*. I nostri dati confermano quindi l’ipotesi che le cellule a potenziale miogenico sembrano risiedere nella frazione CD45+ del midollo, in quanto viene utilizzata la popolazione cellulare che viene eliminata in una normale aderenza su plastica.

Punti ancora da chiarire

- Data l’eterogeneità delle popolazioni analizzate, non è stato possibile caratterizzare in modo preciso la popolazione a potenziale miogenico.
- Non è possibile escludere totalmente la possibilità di una contaminazione dei campioni da cellule miogeniche in particolare per quanto riguarda i campioni da costa.
- Per chiarire ulteriormente la differenziazione osservata *in vitro*, il trapianto nel topo verrà effettuato con le cellule delle varie frazioni aderenti e non aderenti. In questo modo, sarà possibile verificare se queste consentono di ottenere un’augmentata percentuale di fibre umane distrofina positive rispetto al trapianto di cellule di midollo *in toto*.

Bibliografia

1. A.J. Friedenstein, J.F. Gorskaja, N.N. Kulagina. *Exp. Hematol.* 4 (1976) 267–274.
2. S. Wakitani, T. Saito, A.I. Caplan. *Muscle Nerve* 18 (1995) 1417–1426.
3. M. Reyes, T. Lund, T. Lenvik, D. Aguiar, L. Koodie, C.M. Verfaillie. *Blood* 98 (2001) 2615–2625.
4. D. G. Phinney, G. Kopen, R.L. Isaacson, D.J. Prockop. *J. Cell Biochem.* 72(1999) 570–585.
5. G. Ferrari, G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, F. Mavilio. *Science* 279 (1998) 1528–1530.
6. G. Ferrari, F. Mavilio. *Neuromuscul. Disord.* 12 (2002) 7–10.
7. G. Ferrari, A. Stornaiuolo, F. Mavilio. *Nature* 441 (6841) (2001) 1014–1015.
8. S. Corti, S. Strazzer, R. Del Bo, S. Salani, P. Bossolasco, F. Fortunato, F. Locatelli, D. Soligo, M. Moggio, P. Ciscato, A. Prella, C. Borsotti, N. Bresolin, G. Scarlato, G.P. Comi. *Exp. Cell Res.* 277 (2002) 74–85.
9. M.A. Goodell, K. Brose, G. Paradis, A.S. Conner, R.C. Mulligan. *J. Exp. Med.* 183 (1996) 1797–1806.
10. S.Y. Corbel, A. Lee, L. Yi, J. Duenas, T.R. Brazelton, H.M. Blau, F.M. Rossi. *Nat. Med.* 9 (2003) 1528–1532.
11. F.D. Camargo, R. Green, Y. Capetenaki, K.A. Jackson, M.A. Goodell. *Nat. Med* 12 (2003) 1520–1527.

12. E. Gussoni, Y. Soneoka, C.D. Strickland, E.A. Buzney, M.K. Khan, A.F. Flint, L.M. Kunkel, R.C. Mulligan. *Nature* 401 (1999) 390-394.
13. R.E. Bittner, C. Schofer, K. Weipoltshammer, S. Ivanova, B. Streubel, E. Hauser, M. Freilinger, H. Hoger, A. Elbe-Burger, F. Wachtler. *Anat Embryol (Berl)* 199(5) (1999) 391-396.
14. E. Gussoni, R.R. Bennett, K. R. Muskiewicz, T. Meyerrose, J.A. Nolta, I. Gilgoff, J. Stein, Y.M. Chan, H.G. Lidov, C.G. Bonnemann, A. Von Moers, G.E. Morris, J.T. Den Dunnen, J.S. Chamberlain, L.M. Kunkel, K. Weinberg. *J Clin Invest* 110 (6) (2002) 807-814.
15. N. Terada, T. Hamazaki, M. Oka, M. Hoki, D.M. Mastalerz, Y. Nakano, E.M. Meyer, L. Morel, B.E. Petersen, E.W. Scott *Nature* 416(6880) (2002) 542-545.
16. Q.L. Ying, J. Nichols, E.P. Evans, A.G. Smith. *Nature* 416(6880) (2002) 545-548.
17. D. Shi, H. Reinecke, C.E. Murry, B. Torok-Storb. *Blood*. 104 (2004) 290-294.
18. M.A. LaBarge, H.M. Blau. *Cell* 111 (2002) 589-601.

Danno tessutale e induzione di plasticità, transdifferenziazione, fusione cellulare

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia

Plasticità della cellula staminale adulta

Le cellule staminali, ivi comprese quelle ematopoietiche, non solo generano cellule appartenenti al proprio tessuto d'origine, ma sono anche in grado di differenziarsi in cellule appartenenti ad altre linee cellulari e ad altri tessuti, persino derivanti da un altro foglietto embrionale. Le condizioni che le cellule staminali debbono soddisfare per dimostrare che si sono realmente differenziate in cellule di altro tessuto possono essere così elencate: la loro origine deve essere comprovata da studi di marcatura genica ed ibridazione in situ (FISH), nessuna o scarse manipolazioni *in vitro*, acquisizione delle caratteristiche morfologiche e funzionali proprie del tessuto in cui si trovano integrate.

Particolarmente interessanti sono i risultati delle ricerche condotte nel topo da Krause et al., 2001. Le tappe di questi esperimenti comportano il trapianto di cellule midollari murine maschili Lin- marcate con PKH26 in riceventi di sesso femminile, seguito due giorni dopo il trapianto dal recupero per sorting delle cellule PKH26 positive reperibili nel midollo del ricevente, con successivo secondo trapianto di una singola cellula PKH26 positiva in 30 riceventi di sesso femminile. I risultati ottenuti dimostrano che cellule maschili (0.19-3.39%) con positività per la citocheratina erano presenti a livello dell'esofago, stomaco, piccolo e grande intestino, dotti biliari e cute, mentre nel polmone il 20% circa delle cellule presentava il cromosoma Y ed esprimeva mRNA per il surfattante B, forse per il danno indotto dalla radioterapia.

La frequenza del ritrovamento di cellule midollari del donatore in tessuti non ematopoietici del ricevente, dopo danno tessutale di vario tipo in esperimenti condotti nel topo, è riassunta in Tab. 1:

Celluna staminale	Tessuto esaminato	Danno indotto da	Frequenza	Autore
Midollo osseo	Macro e microglia	TBI	0.5-2%	Eglitis e Mezey, 1997
Midollo osseo	Muscolare	Esercizio fisico	3.55%	LaBarge e Blau, 2002
Midollo osseo	Neuroni	TBI	0.2-0.3%	Brazelton, 2000
Midollo osseo	Neuroni	TBI	0.3-2.3%	Mezey, 2000
Midollo osseo	Epatociti	TBI	2.2%	Thiese, 2000
Kit+Thy1.1ba Lin-Lin-Kit al.	Fegato	TBI+difetto genico	30-40%	Lagasse, 2000
	Cuore/vasi	Legatura coronarie	54%	Orlic, 2001

La plasticità di cellule staminali adulte non ematopoietiche è dimostrata dai risultati di alcune interessanti ricerche sperimentali ormai non più recenti: cellule neurali murine possono ricostituire l'ematopoiesi in topi sottoposti ad irradiazione sub-letale (Bjornson et al., 1999); cellule neurali murine possono dare origine a tutti e tre i foglietti embrionali se iniettati nella morula di topo (Clarke et al., 2000); nel topo una popolazione cellulare residente nella muscolatura scheletrica possiede una potenzialità ematopoietica (Jackson et al., 1999).

Per quanto riguarda i risultati di studi condotti nell'uomo, la Tab. 3 riporta la frequenza del ritrovamento di cellule del donatore in tessuti del ricevente:

Tessuto trapiantato	Cellule del donatore ritrovate	Frequenza	Autore
Midollo osseo	Osteoblasti	1.5-2%	Horwitz, 1999
Midollo osseo	Epatociti	2.2%	Thiese, 2000
Midollo osseo	Epiteli gastro-enterici	0-4.6%	Okamoto, 2002
C. Stam. circol.	Epatociti, digerente, cute	0-7%	Korbling, 2002
Cuore	Cardiomiociti, endoteli	20%, 15%	Quaini, 2002
Cuore	Cardiomiociti, endoteli	0.04%, 25%	Laflamme, 2002
Cuore	Cardiomiociti	0.2%	Meller

Induzione di plasticità, transdifferenziazione, contaminazione, fusione cellulare

Il principale induttore della plasticità cellulare è senz'altro il danno tissutale. Le cellule staminali vengono richiamate nell'area danneggiata da citochine liberatesi nella sede stessa del danno tissutale. Lo "*stromal derived factor-1*" (SDF-1 α) e il suo recettore CXCR4 svolgono in tal senso un ruolo cruciale: intervengono in modo determinante nei meccanismi di accasamento ("*homing*") della cellula staminale nel midollo osseo; gli epatociti del fegato danneggiato esprimono SDF-

1 α ; la cellula ovale esprime CXCR4 ed il livello di espressione di SDF-1 α può funzionare da gradiente per il richiamo della cellula ovale stessa nell'area epatica danneggiata (Hatch et al., 2002).

La transdifferenziazione di cellule staminali già commissionate verso altre linee cellulari potrebbe essere un modello per spiegarne la plasticità. Tuttavia è da sottolineare che per quanto riguarda la cellula staminale ematopoietica la transdifferenziazione è un evento molto raro e certamente non fisiologico (Wang et al., 2003). La supposta plasticità della cellula staminale adulta potrebbe essere invece legata a una contaminazione cellulare oppure a una fusione cellulare.

Una contaminazione cellulare è possibile se si considera che le cellule staminali presenti nella muscolatura scheletrica esprimono marcatori della cellula staminale ematopoietica CD45 e Sca-1 e devono essere quindi considerate vere e proprie cellule staminali ematopoietiche, e che la loro presenza a livello muscolare o in altri tessuti non ematopoietici è solo occasionale (McKinney-Freeman et al., 2002).

La fusione cellulare consiste nell'unione del patrimonio genetico della cellula staminale ematopoietica del donatore con quello della cellula ospite specifica del tessuto danneggiato, con creazione di un'unica cellula fornita di nuovo fenotipo e nuove funzioni (Terada et al., 2002; Vassilopoulos et al., 2003). Il principale quesito a tale riguardo è quale cellula partecipa alla fusione. Non sembra sia la cellula staminale ematopoietica per molteplici motivi: la ricostituzione ematopoietica avviene prima della integrazione della cellula staminale in tessuti non ematopoietici, quando la cellula staminale ematopoietica viene direttamente iniettata nel fegato o nel muscolo non attecchisce, il danno tissutale necessario a richiamare la cellula staminale richiama anche molte cellule infiammatorie. Parecchie prove depongono invece a favore di un intervento dei macrofagi: partecipano attivamente ai processi infiammatori, oltrepassano le barriere vascolari, si annidano in tessuti non ematopoietici, sono capaci di fondersi fra loro e con altri tipi di cellule, alcuni marcatori genetici ne dimostrano la capacità di generare tessuto muscolare e tessuto epatico.

Uno dei quesiti biologici fondamentali riguardante le cellule staminali commissionate tessuto-specifiche è il seguente: sono esse contenute in vari organi e circolano nel sangue periferico? La risposta è probabilmente affermativa. Tali cellule sono identificate dalla proteina di membrana CXCR4 e vengono richiamate nel midollo osseo perché le cellule stromali producono la chemochina "*stromal derived factor-1*" (SDF-1), ligante specifico di questa proteina. Le cellule CXCR4 positive sono state definite nelle loro caratteristiche fenotipiche e funzionali: sono CD34+ e AC133+ (Sca+ nel topo); circolano nel sangue periferico in condizioni di *steady state* e possono essere mobilizzate dopo danno tissutale o dopo somministrazione di G-CSF; dal sangue periferico giungono nel midollo osseo dove trovano il miglior microambiente per la loro sopravvivenza; non essendo aderenti, e mancando dei marcatori di membrana specifici delle cellule mesenchimali, si ritiene siano diverse da queste. Gli eventi successivi al danno tissutale potrebbero quindi venir così riassunti: aumentata produzione di SDF-1 da parte del tessuto danneggiato, incremento del numero di cellule CXCR4+ nel sangue periferico,

richiamo di cellule staminali nel tessuto danneggiato per azione dell'asse SDF-1-CXCR4 (Ratajczak et al., 2004).

Studi preclinici e primi studi clinici

Le conoscenze sulla plasticità delle cellule staminali hanno portato ai primi tentativi di un loro impiego nella riparazione di danni di tessuti e organi. Alcuni esperimenti riguardano l'uso di cellule staminali ematopoietiche per rigenerare cardiomiociti. Esiste un razionale per tale impiego: le cellule staminali ematopoietiche nella sede del danno miocardico possono migliorare la vascolarizzazione differenziandosi in cellule endoteliali, possono riparare il danno differenziandosi in cardiomiociti, possono produrre citochine che prevengono la fibrosi. Esistono anche prove sperimentali che dimostrano la potenziale utilità di una tale procedura: l'iniezione di cellule ematopoietiche maschili lin⁺Kit⁺ nel topo femmina determina una rigenerazione di cardiomiociti ed un miglioramento dei parametri emodinamici (Orlic et al., 2001). I primi studi clinici investigativi condotti nell'uomo sembrano confermare queste premesse sperimentali. Infatti, l'iniezione di cellule staminali autologhe direttamente nell'area di miocardio danneggiata determinerebbe un miglioramento della sintomatologia, della perfusione miocardica e della funzionalità dell'area ischemica alla RMN 3 mesi dopo l'infarto (Tse et al., 2003), mentre l'iniezione di cellule staminali AC133+ ai bordi dell'area infartuata dopo bypass coronarico migliorerebbe la perfusione e la funzionalità cardiaca 3-9 mesi dopo l'infarto (Stamm et al., 2003).

Un argomento di particolare interesse riguarda l'impiego di cellule staminali ematopoietiche per rigenerare cellule neurali. Nell'animale da esperimento è stato dimostrato che cellule staminali midollari esprimenti una proteina transgenica, trapiantate in topi adulti dopo irradiazione corporea totale generano cellule neurali esprimenti i marcatori neurali NeuN e tubulina (Brazelton et al, 2000); lo stesso tipo di esperimento consente di ottenere a distanza di 10-15 mesi dal trapianto un basso livello di chimerismo (0.2%) a carico delle cellule di Purkinje (Priller et al., 2001). Per quanto riguarda gli studi condotti nell'uomo è da sottolineare che pazienti di sesso femminile trapiantate con midollo osseo ottenuto da donatore di sesso maschile presentano 0.025-0.05% di cellule maschili a livello di neocortex e ippocampo (Mezey et al., 2003); inoltre che in tale setting lo 0.1% delle cellule di Purkinje sono maschili, alcune però presentano un numero di cromosomi del sesso superiore a quello diploide, lasciando quindi supporre che si sia verificata una fusione cellulare tra cellule del donatore e quelle dell'ospite (Weimann et al., 2003).

Oltre a differenziarsi in cellule neurali, cellule staminali ottenute dal midollo osseo possono differenziare in oligodendrociti e sono quindi capaci di rimielinizzare particolari lesioni del tessuto nervoso, assumendo le caratteristiche fenotipiche e funzionali proprie degli oligodendrociti (in esperimenti murini la velocità di conduzione lungo l'assone è fortemente migliorata).

Cellule staminali ematopoietiche possono anche rigenerare epatociti funzionalmente attivi. Nell'animale da esperimento il trapianto di cellule staminali KTSL

(Lin⁻kit⁺Sca⁺Thy 1.1^{ba}), marcate con β -galattosidasi ed in grado di metabolizzare tirosina per azione dell'enzima fumarilacetoacetato idrolasi (FAH), in topi con deficit congenito di tale enzima ne consente la sopravvivenza anche se non viene somministrato NTC, farmaco che impedisce la degradazione della tirosina nei suoi metaboliti tossici; la sopravvivenza è possibile perché le cellule staminali del donatore si differenziano in epatociti FAN+ e β -gal+ (Lagasse, 2000). Per quanto riguarda l'uomo è da ricordare che pazienti di sesso femminile, trapiantate con midollo osseo da donatore di sesso maschile, presentano epatociti che contengono il cromosoma Y.

In conclusione, risulta evidente che il sistema delle cellule staminali adulte è molto più flessibile di quanto sino ad ora ritenuto, particolarmente in condizioni di stress tissutali. Abbiamo appena incominciato a capire che cellule staminali circolanti nel sangue possono agire non solo come distributrici di progenitori ematopoietici, ma anche come sistematici fornitori di progenitori staminali che partecipano all'omeostasi dei vari organi e tessuti, e quindi capaci di riparare danni tissutali non-ematopoietici. Il potenziale terapeutico di questa acquisizione è straordinariamente vasto.

Bibliografia essenziale

1. Abkowitz J.L. Can human hematopoietic stem cells become skin, gut, or liver cells? *N. Engl. J. Med.* 346, 770, 2002.
2. Anderson D.J., Gage F.H., Weissman I.L. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat. Med.*, 7, 393, 2001.
3. Camargo F.D., Chambers S.M. Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion. *Cell Prolif.* 37, 55, 2004.
4. Daley G.Q., Goodell M.A., Snyder E.I. Realistic prospect for stem cell therapeutics. *Hematology*, 398, 2003.
5. Körbling M., Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept? *N. Engl. J. Med.* , 349, 570, 2003.
6. Krause D., Theise N.D., Collector M.I. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105, 369, 2001.
7. Medvinsky A., Smith A. Fusion brings down barriers. *Nature*, 422, 823, 2003.
8. Ratajczak M.Z., Kucia M., Reza R. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells "hide out" in the bone marrow. *Leukemia*, 18, 29, 2004.
9. Rosenthal N. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N. Engl. J. Med.*, 349, 267, 2003.

**BIOLOGIA DELLE CELLULE
STAMINALI**

Clonazione: storia e tecniche. Dalle cellule staminali embrionali all'architettura funzionale dei tessuti

Carlo Alberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia

La capacità tecnica di manipolare spermatozoi, oociti e cellule dei primi stadi embrionali nei mammiferi, è giunta in anni recenti ad aprire prospettive applicative, nell'ambito della biologia della riproduzione animale ed umana, tali da porre imperative domande legate alle conseguenze del loro impiego. Queste sono fondamentalmente due: l'una rivolta a capire quale effetto avrà sulla biodiversità se la fecondazione artificiale con pochi riproduttori diverrà la sola tecnica di riproduzione impiegata per gli animali di interesse economico, l'altra legata agli aspetti bioetici. Si scontrano su questo terreno le due vocazioni della ricerca scientifica, come la storia della scienza insegna, quella applicata e quella di base. Ciò che abbiamo appena ricordato cade infatti nella sfera di applicazioni di tipo mercantile di ricerche che hanno sì contribuito enormemente all'avanzamento delle conoscenze scientifiche di base, ma che ancora necessitano di tanto tempo e molti investimenti per giungere ad avere una idea più chiara di fenomeni biologici che comunque siamo già in grado di tradurre in applicazioni commerciali. A più di 200 anni dalla prima fecondazione artificiale (1781) per opera di **Lazzaro Spallanzani** (1729-1799) ancora grande resta la nostra ignoranza degli eventi che regolano le primissime fasi dello sviluppo embrionale. La fecondazione ha inizio con la fusione tra la cellula germinale femminile (cellula uovo) e quella maschile (spermatozoo) a formare lo zigote. Lo zigote è la prima cellula del nuovo individuo che inizia a dividersi in due cellule, poi quattro, otto, sedici, trentadue e così via fino al completo sviluppo del nuovo individuo. **August Weissman** (1834-1914) per primo postulò che durante la moltiplicazione cellulare le cellule somatiche si differenziano a formare i diversi organi e strutture che compongono l'intero corpo, mentre le cellule germinali mantengono l'insieme dell'informazione ereditaria che verrà tramandata di generazione in generazione.

Studi successivi condotti da grandi embriologi quali **Hans Driesch** (1876-1941) e **Hans Spemann** (1869-1941) arrivarono a chiarire, nei modelli prediletti dalla biologia dello sviluppo e cioè il riccio di mare, la rana ed i tritoni, i momenti durante lo sviluppo embrionale in cui la via differenziativa delle diverse linee di sviluppo assumeva le caratteristiche di "non ritorno". In particolare, Hans

Spemann dimostrò con i suoi esperimenti, che la determinazione è un processo progressivo, attivo durante lo sviluppo embrionale, che porta le cellule dell'embrione a seguire una via differenziativa irreversibile da un certo stadio di sviluppo in poi. Egli intuì che i criteri per la differenziazione cellulare sono di tipo *operativo*, poiché nell'embrione iniziale, non riscontrava una evidente differenziazione morfologica cellulare. Rimaneva però aperto il quesito: *'La differenziazione cellulare è un processo terminale oppure il programma genetico di una cellula differenziata può essere riprogrammato?'*. Per rispondere a quest'ultima domanda, Spemann propose nel 1938 quello che lui stesso definì "un fantastico esperimento". Egli suggerì di prelevare il nucleo da una cellula di un embrione in avanzate fasi di sviluppo (oppure di un individuo adulto) e trasferirlo nel citoplasma di una cellula uovo enucleata, privata cioè del proprio nucleo, del proprio corredo genetico. In altre parole propose un esperimento di trasferimento nucleare per capire se il nucleo di una cellula differenziata era in grado di riprogrammare l'informazione espressa e di controllare lo sviluppo embrionale. Purtroppo l'avanzamento delle conoscenze scientifiche necessita non solo di idee brillanti, ma anche di opportunità tecniche. Spemann non fu in grado di condurre l'esperimento, per la mancanza di strumenti adatti alla manipolazione e alla dissezione delle cellule somatiche e germinali utili al trasferimento nucleare: saranno necessari 14 anni prima che gli embriologi riescano a cimentarsi con l'esperimento proposto da Spemann.

Nel 1952 due ricercatori americani, **Robert Briggs** e **Tom J. King**, utilizzando una pipetta di vetro molto sottile estrassero il nucleo da una cellula di embrione di *rana* allo stadio di blastula e lo trasferirono in una cellula uovo enucleata. L'embrione così costituito raggiunse lo stadio di girino ma non fu in grado di arrivare allo stadio di adulto.

Il lavoro di Briggs e King aveva per la prima volta posto le basi sperimentali, (definendo gli strumenti e le tecniche necessarie per eseguire l'esperimento proposto da Spemann) per giungere ad ottenere le due più importanti risposte che la comunità scientifica attendeva in quegli anni:

- 1) l'informazione genetica contenuta nel nucleo di una cellula differenziata è ancora presente nella sua totalità fisica? E se lo è, può essere di nuovo riprogrammata per lo sviluppo di un nuovo individuo?
- 2) le interazioni tra il citoplasma dell'ocita ed il nucleo trasferito sono in grado di de-differenziare il nucleo introdotto e di dirigere poi lo sviluppo di un nuovo individuo? Passarono quasi quindici anni e nel 1966 **John Gurdon**, dell'Università di Cambridge in Gran Bretagna, pubblicò un lavoro straordinario in cui, utilizzando la metodica di Briggs e King, dimostrava di aver ottenuto lo sviluppo di un embrione, generato dal trasferimento di un nucleo di una cellula differenziata prelevata dall'intestino di un girino di *Xenopus* in un'ocita enucleato, fino al completamento dello stadio larvale. Gurdon aveva dimostrato che i nuclei di cellule somatiche differenziate, trasferiti nel citoplasma di una cellula uovo enucleata sono in grado di modificare il loro programma genetico fino ad assumerne uno nuovo, di tipo embrionale e quindi capaci di iniziare e proseguire lo sviluppo larvale. Sul finire degli anni '70

quindi il “fantastico esperimento” proposto da Spemann aveva avuto luogo, sebbene nessun embriologo fosse stato ancora in grado di ottenere un individuo adulto dal trasferimento di nuclei somatici differenziati prelevati da girini oltre lo stadio differenziativo di girino in grado di alimentarsi, né tantomeno da individui adulti.

Nel 1981 un giovane ricercatore americano, **Peter Hoppe**, ed un brillante ricercatore di origine tedesca, **Karl Illmensee**, pubblicarono un articolo sostenendo di aver ottenuto dei topolini in seguito al trasferimento di nuclei di cellule embrionali allo stadio di blastocisti in oociti enucleati. Con il loro lavoro, Hoppe ed Illmensee riuscendo a micro-manipolare il gamete femminile e l'embrione preimpianto di un topolino, dimostrarono la possibilità di clonare anche i Mammiferi classe alla quale appartiene anche l'uomo. Di nuovo, l'esperimento di Hoppe ed Illmensee aveva dimostrato la pluripontezialità dei nuclei di cellule embrionali, il passo successivo, la clonazione a partire da nuclei prelevati da cellule di individui adulti, avrebbe definitivamente dimostrato la reversibilità dei processi attivi nella determinazione del differenziamento cellulare. Purtroppo, nonostante i numerosi tentativi di ripetere l'esperimento di Illmensee e Hoppe nessun ricercatore riuscì più ad ottenere il completo sviluppo di un embrione di topo, nemmeno embriologi del calibro di James McGrath e Davor Solter, i quali tentarono di clonare topi a partire da nuclei prelevati da blastomeri di embrioni a 2, 4, 8 cellule sino alla blastocisti (stadio utilizzato da Hoppe ed Illmensee) con risultati sempre negativi. Nel 1984, in un articolo pubblicato sulla rivista *Nature*, essi dichiararono che “la clonazione di topi, utilizzando tecniche di trasferimento nucleare, è biologicamente impossibile”.

Gli stessi Illmensee ed Hoppe, non furono più in grado di ripetere con successo i risultati riportati nell'articolo del 1981, e l'intero gruppo di ricerca ormai screditato dal punto di vista accademico, si sciolse. Tale fu l'impatto sulla comunità scientifica che i finanziamenti ai laboratori di embriologia impegnati in ricerche di base sui fenomeni biologici che regolano lo sviluppo embrionale e la differenziazione cellulare (e che per questi studi utilizzavano tecniche di trasferimento nucleare) vennero bloccati. In seguito, la clonazione di mammiferi perse di interesse per i biologi dello sviluppo ma continuò nell'ambiente veterinario per l'interesse applicativo in ambito zootecnico. In quest'ambito infatti, le potenziali ricadute economiche derivanti dall'opportunità di ottenere con successo animali (bovini, suini etc) identici agli individui donatori di un genoma (quindi del nucleo utilizzato nel trasferimento nucleare) ricco di tratti genetici di interesse commerciale risultano immediatamente evidenti. Due erano i laboratori impegnati in questo tipo di ricerche, quello di **Steen M. Willadsen** in Gran Bretagna e quello di **Neil First** negli Stati Uniti d'America. Nel 1986, Willadsen annunciava di aver clonato delle pecore trasferendo nuclei di embrioni preimpianto in oociti enucleati. Nel giro di pochi mesi (1987) Neil First pubblicava un articolo dimostrando di aver ottenuto nel suo laboratorio dei vitelli a partire da cellule embrionali preimpianto e più tardi ottenne un nuovo successo a partire da cellule della blastocisti, le stesse cellule del nodo embrionale utilizzate anni prima negli esperimenti di Illmensee e Hoppe sul topo. Impiegando tecniche di

trasferimento nucleare a partire dal 1986 ad oggi sono stati ottenuti migliaia di bovini, suini, ed ovini. Nel 1996, il gruppo diretto da **Ian Wilmut**, dell'Istituto Roslin di Edinburgo in Scozia, dalla disgregazione delle cellule del nodo embrionale di pecora ottenne circa 20 cellule che non saranno utilizzate come tali, ma bensì coltivate *in vitro* per alcuni giorni, così da ottenere una popolazione di migliaia di cellule identiche tra loro. Ciascuna di queste cellule era potenzialmente in grado di dare origine ad un individuo clonato, identico alle altre migliaia di individui ottenibili a partire dalle cellule embrionali della stessa popolazione.

Nonostante la clonazione di individui a partire da cellule embrionali non costituisse più una novità almeno in ambiente zootecnico, la notizia, nel febbraio del 1997, sempre ad opera del gruppo di ricerca diretto da Ian Wilmut, apparsa sulla rivista *Nature* della nascita di un agnello a partire da un oocita enucleato nel quale era stato trasferito un nucleo di una cellula somatica di pecora adulta, colse di sorpresa la comunità scientifica internazionale. Esaminiamo da vicino l'esperimento di Wilmut. Cellule della ghiandola mammaria furono disgregate e mantenute, per un periodo di due settimane, in un terreno di coltura privo di alcuni nutrienti al fine di rallentarne la divisione cellulare e bloccarle in una fase del ciclo cellulare detta G0. Le cellule furono poi incubate in un terreno contenente il virus Sendai che legandosi alla membrana plasmatica della cellula somatica facilitò, successivamente al trasferimento di quest'ultima nello spazio perivitellino dell'oocita, la sua fusione con l'oocita.

Nell'esperimento del gruppo scozzese furono trasferite 277 cellule somatiche in altrettanti oociti. Di questi oociti, 29 (10,5%) si svilupparono fino allo stadio di morula/blastocisti trasferiti poi nell'utero di 13 femmine. Di queste 29 blastocisti, 1 completò lo sviluppo fino alla nascita di un agnello, chiamato Dolly. Dall'analisi critica del lavoro del gruppo scozzese emerge un punto di estrema rilevanza concettuale: l'impossibilità di riconoscere tra le cellule disgregate della ghiandola mammaria quale abbia contribuito alla nascita di Dolly. In seguito alla disgregazione delle ghiandole mammarie si ottengono diversi tipi cellulari isolati, cellule epiteliali, fibroblasti e linfociti di cui è però molto difficile distinguere le caratteristiche morfologiche, il fenotipo, dopo essere state a lungo coltivate *in vitro*. Quindi, ad oggi, non conosciamo quale sia la cellula somatica che ha permesso la nascita di Dolly. Anche se la procedura adottata dal gruppo scozzese si è rivelata aperta a critiche, non vi è dubbio però sul fatto che questo esperimento rappresenta un *passaggio* importantissimo nella storia dell'embriologia e finalmente, a ottanta anni dagli esperimenti di Spemann, siamo in grado di dare una risposta alle domande allora poste: il genoma di una cellula somatica di mammifero adulto può essere riprogrammato all'interno del citoplasma di un oocita enucleato ed è in grado di sostenere lo sviluppo embrionale a termine fino alla nascita di un nuovo individuo.

Rimangono comunque completamente oscuri quali siano i meccanismi e le molecole coinvolte in questo processo di riprogrammazione del genoma della cellula somatica dopo il suo trasferimento all'interno dell'oocita. La pecora purtroppo non rappresenta il modello animale ideale per gli studi di base che porte-

ranno alla comprensione di questi fenomeni. Le conoscenze di biologia della riproduzione, di embriologia molecolare e più in generale di genetica di questo animale sono estremamente limitate. Al contrario, il topo rappresenta il modello sperimentale ideale perché è il mammifero di cui meglio conosciamo la genetica, insieme all'uomo, la biologia della riproduzione e dello sviluppo. Il topolino rappresenta quindi il modello animale più prezioso per la ricerca biomedica. Alla nascita di Dolly, i biologi dello sviluppo sono tornati a chiedersi quali siano i fattori che permettono ad uno zigote ottenuto dal trasferimento nucleare di terminare lo sviluppo. Un aspetto importante che distingue lo sviluppo preimpianto di pecora da quello di topo riguarda le modalità ed i tempi di attivazione dei geni embrionali. In tutti i mammiferi le prime fasi dello sviluppo embrionale a partire dallo zigote avvengono grazie agli RNA messaggeri (mRNA) e alle proteine di origine materna, ovvero presenti nel citoplasma dell'ovocita e prodotti durante l'oogenesi. Questi mRNA e queste proteine andranno, col procedere dello sviluppo embrionale, esaurendosi e quindi l'embrione dovrà sintetizzarne di nuovi. L'attivazione del genoma embrionale (in inglese detta anche *zygotic genome activation, ZGA*) avviene durante lo sviluppo preimpianto in momenti diversi nelle diverse specie di Mammiferi. Nel topo lo ZGA avviene a partire dall'embrione a 2 cellule, nell'embrione umano a partire da 4 cellule, nel coniglio e nella pecora a 16/32 cellule. L'embrione di pecora raggiunge lo stadio a 32 cellule 2,5 giorni dopo la fecondazione (o dopo il trasferimento del nucleo somatico), mentre il topo raggiunge lo stadio di 2 cellule, 15-20 ore dopo la fecondazione. Ne consegue che l'embrione di pecora, rispetto a quello di topo, dispone di una maggior quantità di tempo per modificare il programma genetico del genoma della cellula somatica. L'embrione di topo, ottenuto dopo trasferimento di un nucleo somatico, deve avere il nuovo programma genetico adatto allo sviluppo dell'embrione già pronto allo stadio di 2 cellule. Questa differenza era ritenuta da molti embriologi fondamentale nello spiegare gli insuccessi con il modello topo.

Nel luglio del 1998 la rivista scientifica *Nature* pubblica un lavoro ove si riporta la nascita di alcuni topolini da embrioni ottenuti dal trasferimento di nuclei somatici in oociti enucleati. Il gruppo di ricerca è diretto dal Prof. **Ryuzo Yanagimachi** e comprende ricercatori giapponesi, inglesi, italiani (M.Z. tra gli autori del presente articolo) ed americani.

Come ricordato, un punto critico dell'esperimento di Wilmut e collaboratori riguardava l'impossibilità di conoscere il fenotipo della cellula somatica utilizzata per il trasferimento nucleare. Il gruppo diretto da Yanagimachi ha utilizzato tre tipi cellulari di cui erano perfettamente noti l'origine ed il fenotipo. Le cellule follicolari del cumulo ooforo, le cellule del Sertoli e le cellule nervose. Tutti e tre questi tipi cellulari hanno smesso di moltiplicarsi e sono uscite dal ciclo cellulare, sono inoltre terminalmente differenziate. Al momento dell'isolamento si trovano in quella che è conosciuta come fase G_0 del ciclo cellulare. Le cellule follicolari a centinaia circondano l'ovocita ovulato a formare una corona (il cumulo ooforo). Le cellule del Sertoli rappresentano la componente somatica del tubulo seminifero e regolano l'andamento della spermatogenesi. Le cellule nervose uti-

lizzate provengono dalla corteccia cerebrale di individui adulti. Diversamente dal gruppo di Ian Wilmut, che ha scelto di trasferire la cellula somatica intera nello spazio perivitellino dell'ovocita e mediare la fusione tra le membrane plasmatiche con un virus, Yanagimachi e collaboratori hanno preferito estrarre il nucleo dalle cellule somatiche prescelte e trasferirlo direttamente all'interno del citoplasma dell'ovocita.

Nell'esperimento, l'immediata verifica del successo della clonazione avviene verificando il colore del pelo dei topolini. Sono stati infatti utilizzati tre ceppi di topolini caratterizzati dal diverso colore del pelo: un ceppo a pelo nero donatore delle cellule somatiche e quindi dei nuclei trasferiti, un ceppo a pelo grigio donatore delle cellule uovo ed un terzo ceppo a pelo albino di femmine pseudo-gravide deputato a portare a termine la gravidanza dopo il trasferimento degli embrioni allo stadio di blastocisti. La possibilità di indurre uno stato di pseudo-gravidanza nelle femmine di topo è molto utile ai ricercatori. La pseudo-gravidanza infatti viene ottenuta accoppiando la femmina di topo con un maschio sterile: la condizione ormonale che sostiene lo stato di gravidanza ha inizio con l'accoppiamento, indipendentemente dalla presenza di spermatozoi e dalla avvenuta fecondazione delle cellule uovo. I ricercatori possono così trasferire nell'utero della femmina pseudogravida degli embrioni ottenuti *in vitro*, i quali potranno impiantarsi sulle pareti di un utero già pronto ad accoglierli. Dei tre tipi cellulari impiegati, cellule follicolari, del Sertoli e cellule nervose, solo le cellule follicolari hanno dimostrato la capacità di sostenere lo sviluppo di embrioni normali ed in grado di procedere attraverso tutte le tappe dello sviluppo fetale sino alla nascita di nuovi individui. Raggiunto lo stadio di blastocisti gli embrioni sono stati trasferiti nelle femmine pseudogravide albine. Al termine della gravidanza sono nati topolini il cui pelo, dopo circa 15 giorni si è rivelato nero, così come ci si attendeva. Il primo topolino femmina così ottenuto è stato chiamato Cumulina per la sua derivazione da una cellula del cumulo ooforo, ottenuta con la tecnica ora esposta e chiamata "tecnica di Honolulu". In seguito, Cumulina è stata accoppiata con un maschio fertile e dopo 19 giorni di gravidanza ha partorito alcuni piccoli.

La maggior parte degli embrioni ottenuti con il trasferimento di nuclei di cellule del Sertoli si sono impiantati sulla parete dell'utero, ma non hanno proseguito lo sviluppo embrionale e solo in un caso un embrione si è sviluppato fino allo stadio di 8-9 giorni. I risultati peggiori in termini di sviluppo embrionale sono stati ottenuti con i nuclei delle cellule nervose i cui embrioni non si sono mai sviluppati oltre lo stadio di blastocisti e solo in rari casi si sono impiantati sull'utero delle femmine pseudogravide.

Il colore del pelo non è stato l'unico marcatore genetico impiegato per provare che i topolini nati con la tecnica di Honolulu erano cloni. Anche altri marcatori genetici sono stati utilizzati tipizzando il DNA dei tre ceppi di topoline impiegate nell'esperimento.

L'esperimento condotto da Yanagimachi e collaboratori con le cellule follicolari ha stabilito con chiarezza che il nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate, trasferito nel citoplasma di una cellula uovo, può perdere il proprio pro-

gramma genetico ed acquisirne uno nuovo in grado di iniziare e terminare lo sviluppo embrionale sino alla nascita di un nuovo individuo: dal punto di vista genetico, il nuovo individuo è un clone del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare. Diverse altre decine di topoline sono nate con il trasferimento di nuclei di cellule follicolari.

La ricostruzione storica degli esperimenti che hanno portato alla clonazione di Anfibi prima e di Mammiferi poi mostra quanto importante nella scienza sia l'idea che porta a concepire un esperimento (Spemann pensò alla clonazione nel 1938), ma quanto indispensabile sia anche lo sviluppo di nuove tecniche e strumenti necessari alla sperimentazione. È stato il miglioramento progressivo negli anni delle tecniche di micromanipolazione di gameti ed embrioni preimpianto che ha permesso sia il trasferimento nucleare da una cellula somatica alla cellula uovo enucleata con il minimo danno possibile, sia un aumento sempre maggiore del numero di embrioni manipolati così ottenuti.

La tecnica di trasferimento nucleare impiegata per l'ottenimento di Cumulina appare di estrema utilità per lo studio e la comprensione dei meccanismi molecolari che regolano le prime fasi dello sviluppo dell'embrione di mammifero. È questo infatti un modello di studio che permetterà di capire come una cellula uovo sia in grado di riprogrammare il DNA di una cellula somatica ponendolo in grado di iniziare e completare lo sviluppo embrionale.

Fenomeni simili di azzeramento parziale o completo della "memoria" genetica di una cellula sono noti nel caso della crescita neoplastica, quando una cellula perde quelle che sono le proprie caratteristiche differenziative e, non riconoscendo più alcun segnale di inibizione, continua a proliferare con caratteristiche simili a quelle delle cellule dei primi stadi embrionali. La cellula uovo è straordinaria nelle sue capacità di riprogrammare il DNA del nucleo della cellula somatica che è stata introdotta al suo interno. Essa è chiaramente in grado di *guidare* il DNA della cellula somatica verso un destino differenziativo che è quello caratteristico dello sviluppo embrionale.

La scoperta che anche nei mammiferi la differenziazione cellulare non è un processo terminale, ma può essere modificato, apre enormi possibilità sia nell'ambito della ricerca di base che in quella bio-medica e farmacologica. Quando avremo capito nei dettagli come sia possibile riprogrammare l'informazione genetica di una cellula somatica (e questo richiederà ancora molti anni di ricerca), disporremo di quelle conoscenze e di quegli strumenti concettuali che ci permetteranno di ripercorrere, passo per passo, gli eventi che portano alle trasformazioni tumorali, di individuarne i meccanismi molecolari che li presidono e guidano. Potrebbe quindi diventare possibile un intervento terapeutico in grado di riprogrammare le cellule tumorali e farle "rientrare" nel sentiero differenziativo che avevano ormai perso. La tecnica del trasferimento nucleare sviluppata dal gruppo di Yanagimachi offre ai biologi l'opportunità di impiegare un laboratorio di biologia cellulare e molecolare già confezionato dalla natura, l'oocita, o meglio il citoplasma dell'oocita, per svelare in termini di cinetica dello sviluppo quegli aspetti, e sono molti, ancora oscuri dell'interazione nucleo-citoplasmatica che presidono alle espressioni del genoma nel vivente.

Bibliografia essenziale

1. Briggs R. e King T.J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into trophoblast: studies on polyploid. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 27: 447-465, 1952.
2. Gurdon J.B., Laskey R.A. e Reeves O.R. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 34:93-112, 1975.
3. Illmensee K. e Hoppe P.C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23:9-18, 1981.
4. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-3, 1997.
5. Wakayama T., Perry A.C.F., Zuccotti M., Johnson K.R. e Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394: 369-374, 1998.

Molteplici sorgenti di cellule staminali somatiche da adulto

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia

Esistono due tipi di cellule staminali: le *cellule staminali embrionali*, isolate dalle cellule più interne della blastocisti e capaci di generare i tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma), e le *cellule staminali somatiche*, che nell'individuo adulto si trovano in vari distretti tissutali e sono preposte a generare le cellule differenziate specifiche di quel determinato tessuto.

In base alla loro potenzialità differenziativa le cellule staminali possono essere distinte in: *totipotenti* se generano cellule di tessuti embrionali ed extra-embryonali, *pluripotenti* se generano cellule di tutti i tessuti embrionali, *multipotenti* se generano sottogruppi di linee cellulari, *oligopotenti* se generano sottogruppi ristretti di linee cellulari, *unipotenti* se generano un solo tipo di cellule mature.

Secondo le conoscenze biologiche classiche la cellula staminale somatica è quella cellula capace di rinnovare le cellule del suo stesso tessuto di appartenenza, andate distrutte per il ricambio fisiologico o a seguito di un danno tissutale. Le sue caratteristiche biologiche essenziali sono:

- 1) la capacità di autorinnovarsi;
- 2) la capacità di trasferire il proprio patrimonio genetico a tutte le cellule figlie (clonogenicità);
- 3) la capacità di dare origine ad una popolazione cellulare costituita da progenitori, che sono commissionati verso una determinata linea cellulare e hanno perso la capacità di autorinnovarsi, e da cellule con vari livelli di differenziazione sino agli elementi maturi.

Le cellule staminali somatiche possono essere distinte l'una dall'altra in base ai tessuti da cui vengono raccolte. L'elenco delle cellule staminali tessuto-specifiche sinora identificate comprende cellule di origine ectodermica (cellule staminali cutanee, dei follicoli piliferi, del tessuto nervoso), mesodermica (cellule staminali ematopoietiche, mesenchimali, del cordone ombelicale, del muscolo scheletrico, del muscolo cardiaco) endodermica (cellule staminali delle isole pancreatiche, cellule ovali del fegato). Come già affermato, la loro primaria direzione di differenziazione è diretta nell'ambito del tessuto di appartenenza (Tab. 1). Recentemente, è stato però dimostrato che alcune cellule staminali somatiche

possono differenziare al di fuori del loro tessuto di origine; ad esempio cellule staminali del midollo osseo possono dar origine a cellule endoteliali, epatiche, muscolari, nervose; alternativamente, cellule staminali del fegato, del muscolo o del tessuto nervoso possono dar origine alle cellule del sangue.

Le cellule staminali adulte più studiate sono quelle che hanno sede nel midollo osseo. Nell'ambito di tale popolazione cellulare è possibile distinguere:

1) *cellule staminali ematopoietiche*, la cui esistenza è provata dalla ricostituzione ematologica dopo chemioterapia mieloablattiva, presentano fenotipo CD34+CD38- e CD34-CD38-, in coltura formano colonie e in vivo danno origine alle varie linee maturative ematiche;

2) *cellule staminali mesenchimali*, che in coltura crescono come cellule aderenti e hanno una sopravvivenza definita, in risposta ad appropriati stimoli si differenziano in osteoblasti, condroblasti e adipociti, sono sempre CD45- ma non presentano un fenotipo caratteristico.

Ultimamente ha richiamato particolare attenzione l'osservazione della possibilità che alcune cellule staminali somatiche nell'adulto possano avere proprietà simili a quelle delle cellule staminali embrionali. Mentre sino ad ora non esiste la prova sicura che queste cellule esistano nei tessuti normali, cellule staminali adulte mul-

Tab. 1 - Cellule staminali somatiche nell'uomo adulto e loro primaria direzione di differenziazione.

Tipo cellulare	Localizzazione tessuto-specifica	Cellule o tessuti prodotti
C.s. ematopoietiche	Midollo osseo, sangue periferico	C. linfemopoietiche midollari e del sangue
C.s. mesenchimali	Midollo osseo, sangue periferico	Osso, cartilagine, tendine, tessuto adiposo, muscolo, stroma midollare, c. neurali
C.s. neurali	C. ependimali, astrociti (zona sub-ventricolare) del SNC	Neuroni, astrociti, oligodendrociti
C.s. epatiche	Piccoli dotti terminali biliari (canali di Hering)	C. ovali che generano epatociti e c. duttali
C.s. pancreatiche	C. intrainsulari, c. ovali, c. duttali	C. beta
C.s. muscolo scheletrico o c. satelliti	Fibre muscolari	Fibre muscolari scheletriche
C.s. cutanee (cheratociti)	Strato basale dell'epidermide, bulbo dei follicoli piliferi	Epidermide, follicoli piliferi
C.s. epiteliali del polmone	C. basali e mucipare della trachea, C. bronchiolari di Clara, pneumociti alveolari di II tipo	C. ciliate e mucose, pneumociti di I e II tipo
C.s. epitelio intestinale	C. epiteliali localizzate attorno alla base di ogni cripta	C. di Paneth, enterociti con borbo a spazzola, c.a calice, c. eteroendocrine dei villi

tipotenti sono state trovate dopo coltura di elementi stromali del midollo osseo per un lungo periodo di tempo e in particolari condizioni; si tratterebbe quindi di un tipo particolare di cellule stromali mesenchimali (Jiang et al., 2002). È stato segnalato che queste cellule progenitrici adulte multipotenti (*multipotential adult progenitor cells*, MAPCs) sono in grado di generare molti tipi cellulari, sia in vitro che in vivo, dopo iniezione nella blastocisti embrionale del topo. MAPCs sono state isolate dal midollo osseo sia del topo che dell'uomo; in parecchi laboratori sono allo studio le condizioni per la loro differenziazione in specifici tipi cellulari, comprendenti tessuti di derivazione ecto- meso- ed endo-dermica. Se queste ricerche avranno successo, tali cellule troveranno un largo impiego nell'ambito della medicina rigenerativa, per riparare un ampio spettro di danni tissutali.

Bibliografia essenziale

1. Cai J., Weiss M. L., Rao M.S. "In search of stemness". *Exper. Hematol.*, 32, 585, 2004.
2. Daley G.Q., Goodell M.A., Snyder E.I. Realistic prospect for stem cell therapeutics. *Hematology*, 398, 2003.
3. Grompe M. Adult versus embryonic stem cells: it's still a tie? *Mol. Ther.*, 6, 303, 2002.
4. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34- hemopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells*, 18, 1, 2000.
5. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al., Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 318, 41, 2002.
6. Körbling M., Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept? *N. Engl. J. Med.*, 349, 570, 2003.
7. Kuehne I., Goodell M.A. The therapeutic potential of stem cells from adults. *Brit. Med. J.*, 325, 372, 2002.
8. Verfaillie C.M., Pera M.F., Lansdorp P.M. Stem cells: hype and reality. *Hematology*, 369, 2002.

Riprogrammazione genetica di cellule somatiche differenziate: i citoplasti naturali e artificiali. Definizione di plasticità differenziativa: i geni stemness

Carlo Alberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia

La biologia dello sviluppo vive oggi un periodo particolarmente felice. La genetica e la biologia cellulare che tanto avevano tratto dagli studi di embriologia, riportano ora a questa disciplina un bagaglio di conoscenze e tecniche che permettono agli embriologi di affrontare e, molto probabilmente, di risolvere quesiti che per decenni sono rimasti senza risposta. Tra questi, fin dal secolo scorso, il più avvincente riguarda le modalità con cui avviene il processo di differenziamento cellulare durante l'embriogenesi. In particolare:

- 1) quali sono i meccanismi e le molecole che inducono una cellula indifferenziata verso una via differenziativa piuttosto che un'altra?
- 2) il processo di differenziamento è terminale oppure la cellula può ritornare allo stato iniziale di totipotenza?

Il novecento è stato caratterizzato da grandi scoperte che hanno costituito un momento di svolta nell'ambito delle conoscenze embriologiche. Dopo quasi un secolo di ricerche conosciamo meglio le dinamiche del differenziamento cellulare anche se ci sfuggono ancora quelle dello sviluppo dell'embrione. Lo zigote, formatosi dalla fusione dello spermatozoo con la cellula uovo, è la prima cellula che costituisce il nuovo individuo. Questa cellula possiede tutte le informazioni, a livello nucleare e citoplasmatico, necessarie a dare inizio allo sviluppo dell'embrione. Con il procedere dello sviluppo, le cellule iniziano a differenziarsi, cioè ad assumere caratteristiche e funzioni diverse e parallelamente l'organizzazione dell'embrione diventa sempre più complessa. Il cambiamento nel numero e nella tipologia dei geni che si esprimono in ogni fase temporale dello sviluppo porta dapprima alla determinazione del destino differenziativo delle cellule e in momenti successivi alla loro effettiva differenziazione, ai diversi tipi cellulari che compongono l'organismo adulto. In alcuni tessuti dell'adulto per-

marranno comunque cellule che non andranno mai incontro al processo di determinazione e differenziamento, mantenendo capacità di rinnovo di tipo embrionale. Queste ultime costituiscono le cellule staminali, cellule in grado di sostituire quelle differenzianti nei tessuti caratterizzati da un alto ricambio cellulare causato da processi di continuo differenziamento (ad esempio, le cellule germinali maschili dell'epitelio seminifero o le cellule del tessuto ematopoietico) o da processi di continua morte cellulare (ad esempio nell'epidermide). Le cellule staminali sono pluripotenti, mantengono cioè capacità proliferative durante tutta la vita dell'individuo e si dividono asimmetricamente, con una delle due cellule figlie che rimane di tipo staminale e l'altra che inizia il processo differenziativo. Nei mammiferi, le cellule staminali pluripotenti sono presenti nella massa di cellule del nodo embrionale della blastocisti nelle fasi preimpianto, nell'embrione e nel feto durante lo sviluppo e si ritrovano anche nell'individuo adulto. Con il procedere dello sviluppo embrionale e fetale il numero di cellule staminali si riduce nell'individuo adulto sono presenti solo in alcuni precisi distretti tissutali.

Dall'embrione preimpianto allo stadio di blastocisti si possono isolare le cellule del nodo embrionale e coltivarle fino ad ottenerne migliaia, le cosiddette cellule embrionali staminali (ES cells, Embryonic Stem cells) la cui caratteristica principale è l'elevata capacità di differenziarsi in qualsiasi altro tipo cellulare. Cellule ES di topo sono state differenziate *in vitro* in cellule epiteliali, muscolari, nervose o pancreatiche. Di recente, un gruppo di ricercatori dell'Università di Bonn e del National Institute of Neurological Disorders and Stroke negli Stati Uniti è riuscito a differenziare delle cellule ES in cellule della glia, un tipo di cellula nervosa che produce lo strato di mielina che ricopre le fibre nervose. Queste cellule, quando trasferite nel cervello di topi deficienti per la produzione di mielina, sono state capaci di esprimere una normale attività sintetica di questa proteina. Un altro gruppo di ricercatori della Washington University School of Medicine in St. Louis ha prodotto, sempre a partire da cellule ES, delle cellule nervose immature che se trasferite nella spina dorsale danneggiata di ratti, ne ristabiliscono le normali funzioni. Analoghi tentativi sulle scimmie e su alcuni pazienti (compiuti ad Harvard dal neurobiologo Evans Snyder) fanno ritenere non lontano nel tempo la possibilità di riparare motoneuroni con la riacquisizione delle funzioni deambulatorie. È recente la notizia dell'isolamento e coltura di cellule ES ottenute da blastocisti umane al quattordicesimo giorno di sviluppo. Le blastocisti provengono dalle cliniche di fecondazione *in vitro* e sono embrioni in eccesso che non sono stati trasferiti nell'utero della madre, ma con il consenso dei genitori utilizzate per la ricerca. Uno studio successivo ha anche dimostrato le potenzialità che hanno le cellule ES umane di differenziarsi, come quelle di topo, in altri tipi cellulari.

Nell'embrione postimpianto e poi nel feto sono ancora molte le cellule staminali presenti, anche se difficile è il loro isolamento. Tra le più studiate sono sicuramente le cellule germinali primordiali (PGC, Primordial Germ Cells) che rappresentano lo stadio di differenziamento che precede la formazione delle gonadi. Le PGC fanno la loro comparsa, nell'embrione di topo e umano, alla 1^a e 3^a settimana di sviluppo rispettivamente. Se isolate dall'embrione queste cellule sono in

grado di moltiplicarsi e produrre cellule pluripotenti dette EG (Embryonic Germ cells) in grado, come le cellule ES, di differenziarsi in quasi tutti i tipi cellulari presenti nell'individuo adulto. La loro difficile reperibilità ne ostacola però fortemente il possibile impiego quale sorgente di reagente biologico utile nel trattamento terapeutico di tante patologie.

Nell'individuo adulto si trovano cellule staminali in diversi distretti tissutali differenziati: nel midollo spinale, nell'epitelio seminifero della gonade maschile, nella retina, negli epitelii, nel cervello. Se le cellule staminali di ciascuno di questi distretti vengono isolate e opportunamente coltivate è possibile espanderle di numero e differenziarle nel tipo cellulare specifico del distretto tissutale da cui derivano o anche transdifferenziarle ottenendo così, ad esempio, cellule del sangue a partire da cellule staminali del tessuto nervoso. Il gruppo diretto da Angelo Vescovi ha differenziato cellule muscolari a partire da cellule staminali neuronali. È chiaro che disporre di un reagente biologico quale le staminali, da differenziare nei diversi tipi cellulari, apre nuovi scenari terapeutici: patologie ora poco trattabili, quali l'Alzheimer, il Parkinson, l'infarto, il diabete e molte altre potrebbero essere affrontate con maggior successo grazie alla sostituzione dei tessuti danneggiati.

Le cellule staminali adulte sono purtroppo di difficile reperibilità, poiché numericamente molto scarse; inoltre non possono essere coltivate a lungo, poiché dopo alcune divisioni cellulari, tendono a perdere le caratteristiche di pluripotenzialità. Diversamente, le cellule ES possono essere mantenute in coltura per moltissimi cicli di divisione, addirittura per più di dieci anni, senza perdere di pluripotenzialità'.

Una via alternativa per ottenere cellule staminali è il loro isolamento dal cordone ombelicale. Va comunque ricordato che le limitazioni numerica e fisiologica si presentano anche in questo caso, sebbene in minor misura.

Reversibilità del programma differenziativo

Accanto a queste sorgenti fisiologiche di cellule staminali, negli ultimi tre anni, se ne è aggiunta un'altra molto promettente basata sulla possibilità di modificare il programma genetico delle cellule differenziate. Questa nuova possibilità si è sviluppata a partire dal 1997 quando sono stati pubblicati i risultati di alcune ricerche che dimostrano come il programma genetico di nuclei di cellule terminalmente differenziate può essere modificato fino ad una sua completa riprogrammazione. I ricercatori Willmut e Campbell, nella pecora, e successivamente Yanagimachi e collaboratori, nel topo, hanno stabilito con chiarezza che il nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate, quando trasferito nel citoplasma di una cellula uovo, viene riprogrammato ed è capace di iniziare lo sviluppo embrionale e di portare alla nascita di un nuovo individuo. Dal punto di vista genetico il nuovo individuo è una "copia genomica" del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare e quindi possiamo definirlo un clone genetico.

Rimangono oscuri quali siano i meccanismi e le molecole coinvolte in questo pro-

cesso di deprogrammazione e riprogrammazione del genoma della cellula somatica dopo il suo trasferimento nell'ooplasma. È però chiaro, come dimostato da Kikyo e Wolffe, che la riprogrammazione comporta modificazioni nella composizione proteica della fibra di DNA, modificazioni capaci di determinare variazioni regolative della attività di espressione genica: la cromatina si decondensa, la struttura a nucleosomi si destabilizza per la sostituzione degli istoni somatici H_1 con la loro variante oocitaria B_4 e la dissociazione dalla fibra di DNA delle proteine regolatrici.

Attivazione del genoma embrionale

Un aspetto importante che ci aiuta nel definire i tempi in cui avvengono le modificazioni delle funzioni del genoma della cellula somatica, successivamente al suo trasferimento nel citoplasma della cellula uovo, riguarda le modalità ed i tempi di attivazione dei geni embrionali. In tutti i mammiferi le prime fasi dello sviluppo embrionale a partire dallo zigote avvengono grazie agli RNA messaggeri (mRNA) e alle proteine di origine materna presenti nel citoplasma dell'oocita e prodotti durante l'oogenesi. mRNA e proteine materne si esauriscono col procedere dello sviluppo embrionale mentre parallelamente inizia la sintesi di mRNA da parte dell'embrione. L'attivazione del genoma embrionale (ZGA, Zygotic Genome Activation) avviene durante lo sviluppo preimpianto in momenti diversi nelle diverse specie di Mammifero. Nel topo lo ZGA avviene a partire dall'embrione a 2 cellule, nell'embrione umano a partire da 4 cellule, nel coniglio e nella pecora a 16/32 cellule. Se l'embrione non esprime correttamente i geni embrionali entro questi tempi non potrà proseguire lo sviluppo. Ad esempio, lo zigote di topo ottenuto con il trasferimento di un nucleo somatico deve necessariamente avere il nuovo programma genetico attivo allo stadio di 2 cellule per procedere correttamente nello sviluppo embrionale. Ne consegue che per la comprensione dei meccanismi e delle molecole coinvolti nel processo di de-differenziazione e riprogrammazione del genoma dei nuclei somatici, gli studi devono essere effettuati nelle primissime fasi dello sviluppo embrionale preimpianto, nei momenti immediatamente successivi al trasferimento dei nuclei somatici negli oociti enucleati.

Fattori importanti per la riprogrammazione del genoma del nucleo trasferito

Tra i diversi fattori coinvolti nelle prime fasi che seguono il trasferimento del nucleo somatico nell'ooplasma, sicuramente importanti sono il grado di ploidia del genoma (il contenuto in DNA) ed il momento del ciclo cellulare in cui si trova il nucleo trasferito. Si è notato, ad esempio, che il trasferimento di nuclei nella fase G_0 del ciclo cellulare facilita lo sviluppo preimpianto, aumentando il numero di blastocisti ottenute.

Quali sono i meccanismi molecolari ad oggi conosciuti in grado di regolare l'espressione del genoma negli embrioni preimpianto di Mammifero?

Modificazioni epigenetiche: regole e vincoli alle potenzialità del genoma

Sebbene nella maggior parte delle cellule il contenuto in DNA (le dimensioni del genoma) e le sequenze del DNA rimangano invariate col procedere dello sviluppo embrionale, il repertorio di geni che viene espresso in un dato tipo cellulare e in un dato momento del ciclo cellulare è limitato e specifico per ogni tipo cellulare. L'espressione del genoma embrionale viene regolata e limitata da una serie di meccanismi di tipo epigenetico quali la metilazione del DNA, l'organizzazione della cromatina e l'architettura nucleare. Questi meccanismi, attivi durante la gametogenesi e le prime fasi dello sviluppo embrionale preimpianto, sono coinvolti nel modellare e modulare le funzioni del genoma. Cambiamenti in uno o più di questi regolatori epigenetici determinano modificazioni nell'espressione genica.

La metilazione del DNA

La regolazione dell'espressione di molti geni è dipendente dalla presenza/assenza di citosine metilate lungo la sequenza del DNA del gene. La metilazione è associata ad importanti eventi nello sviluppo embrionale quali l'inattivazione del cromosoma X nelle femmine di Mammifero e nel fenomeno dell'*imprinting*, processo che consiste in una marcatura differenziale dei genomi paterno e materno durante la gametogenesi così che l'espressione di alcuni geni dipende dalla loro origine parentale. Il gamete maschile e quello femminile, differenzialmente metilati al momento della fecondazione, hanno una diversa organizzazione della cromatina.

I geni costitutivi (quelli che si esprimono in tutti i tessuti) sono demetilati in entrambi i gameti e si mantengono demetilati durante tutte le fasi dello sviluppo preimpianto; al contrario, i geni tessuto specifici sono fortemente metilati nello spermatozoo e meno metilati nell'oocita e vanno incontro ad una generale demetilazione durante lo sviluppo preimpianto, per poi essere nuovamente metilati successivamente all'impianto. Questo processo di demetilazione pare necessario per ristabilire uno stato di pluripotenzialità prima dell'inizio della determinazione e differenziazione cellulare che prende il via con la gastrulazione, subito dopo l'impianto, ed è contemporaneo ad una estesa *de novo* metilazione. La presenza di citosine metilate è in grado di modificare la conformazione della cromatina così da facilitare o impedire il legame con fattori o inibitori della trascrizione.

L'organizzazione della cromatina nello spermatozoo, nell'oocita e nell'embrione preimpianto

L'organizzazione della cromatina cambia durante le gametogenesi maschile e femminile e nel corso delle prime fasi dello sviluppo dell'embrione. Nel gamete maschile gli istoni vengono sostituiti dalle protamine (necessarie a garantire l'alta condensazione della cromatina nella testa dello spermatozoo) durante la sper-

mioistogenesi; queste ultime vengono sostituite a loro volta con proteine istoniche quando lo spermatozoo è penetrato all'interno del gamete femminile durante la decondensazione della cromatina e la formazione del pronucleo.

Durante l'oogenesi, la cromatina si organizza secondo un'architettura ben precisa che permette di identificare due tipi di oociti presenti nel compartimento antrale dell'ovario. Questi oociti sono stati denominati SN (Surrounded Nucleolus) ed NSN (Not Surrounded Nucleolus) per la presenza o assenza rispettivamente di un anello di cromatina attorno al nucleolo e per una cromatina fortemente condensata o dispersa nel nucleo. La differenza tra i due tipi di oociti non è solo morfologica ma è anche funzionale poiché correlata ad una diversa attività genica ed alla possibilità di proseguire (SN) o meno (NSN) nello sviluppo embrionale dopo la fecondazione: solo il tipo SN è in grado di completare lo sviluppo preimpianto.

Dopo la fecondazione, l'organizzazione della cromatina dei gameti maschile e femminile va incontro ad importanti fenomeni di rimodellamento. Nell'embrione preimpianto, la nuova organizzazione della cromatina regola l'espressione genica consentendo una prima ondata di attivazione di geni embrionali a partire dalla fase terminale (G_2) del primo ciclo cellulare ed una espressione genica qualitativamente e quantitativamente più consistente nella fase G_2 del secondo ciclo cellulare, nell'embrione a 2 cellule.

L'architettura del genoma

I cromosomi all'interno del nucleo non sono disposti in maniera casuale, ma occupano precise regioni che variano con il ciclo cellulare così da definire un contesto dinamico che si ripete ad ogni ciclo cellulare. Ciò è stato dimostrato utilizzando una tecnica di ibridazione *in situ* chiamata "chromosome painting", che permette di evidenziare tutto un singolo cromosoma con sonde fluorescenti. Se un cromosoma o una sua porzione viene ad essere spostata dal proprio dominio spaziale (ad esempio in presenza di traslocazioni cromosomiche), allora anche l'espressione dei geni di quella porzione può cambiare.

Cosa accade ad un nucleo di una cellula somatica quando viene trasferito all'interno dell'ooplasma? Le caratteristiche particolari di metilazione, organizzazione della cromatina e architettura del genoma vengono mantenute o variate? La comparazione tra lo status epigenetico del genoma di uno zigote ottenuto normalmente dalla fecondazione di uno spermatozoo e di un oocita con quello di uno zigote ricostituito (ottenuto in seguito al trasferimento nucleare) permette di cogliere quali siano le condizioni necessarie per il proseguimento dello sviluppo embrionale. In questo modo è possibile definire con precisione quali siano i requisiti di metilazione, organizzazione della cromatina e architettura nucleare necessari al corretto sviluppo dell'embrione ed anche quali siano le modificazioni "tollerate" o "tollerabili". Sarà proprio la comprensione di questi "confini" epigenetici entro i quali il genoma si esprime correttamente a definire l'ambito di possibili interventi sperimentali (nella ricerca di base) e terapeutici (nelle applicazioni biomediche).

Riprogrammazione terapeutica delle funzioni del genoma

La comprensione dei meccanismi che intervengono nel differenziamento cellulare e nei processi che lo rendono reversibile apre non solo vasti scenari di conoscenza, ma ancor più vaste possibilità applicative in ambito biomedico e farmacologico. È così possibile prevedere la possibilità di ottenere *in vitro* la de-differenziazione di una cellula somatica prelevata da un individuo adulto e poi di guidarne la re-differenziazione per ottenere un tipo cellulare nuovo in grande quantità, ritrasferibile nel corpo dell'individuo oppure coltivabile fino all'ottenimento di una popolazione omogenea e potenzialmente in grado di progredire nelle fasi successive dell'istogenesi e dell'organogenesi. O ancora, la possibilità di indurre cellule quiescenti a riacquisire funzioni utili in un organismo differenziato o di modificare i meccanismi della progressione neoplastica fino alla completa reversione del tumore ed alla riprogrammazione delle attività normali della cellula.

La più promettente applicazione in ambito biomedico delle tecniche di riprogrammazione delle funzioni del genoma è certamente quella della produzione di popolazioni cellulari o di veri e propri tessuti da trapianto differenziati *ad hoc*. Per le diverse patologie si può prevedere di differenziare *in vitro* i tipi cellulari necessari per la terapia da attuare. Questa via, sebbene ancora non praticabile in tutte le sue tappe, sicuramente offre una prospettiva per i milioni di pazienti affetti da patologie degenerative o croniche la cui incidenza nella popolazione è estremamente elevata.

Le cellule staminali ES e quelle EG sono in grado, in specifiche condizioni di coltura, di generare nuovi tipi cellulari differenziati. L'impiego terapeutico di questi tipi cellulari è però ostacolato da almeno due grandi difficoltà. La prima è costituita dalla difficile reperibilità di cellule staminali dall'adulto e dal fatto che le cellule ES possono essere isolate solo da embrioni, con conseguenti problemi di natura etica. La seconda è legata ad eventuali incompatibilità immunologiche nel trapianto di questi nuovi tessuti. Questo secondo problema può essere risolto impiegando cellule staminali del paziente da curare, quando si riescano ad ottenere, oppure utilizzando campioni di cellule del cordone ombelicale congelate alla nascita.

Una strategia completamente diversa è quella di associare le tecniche del trasferimento nucleare con le metodiche impiegate per il differenziamento delle cellule staminali. È chiaro che anche questa strategia richiede l'uso di oociti, con ciò incontrando sia i problemi di natura etica legati all'impiego ed alla donazione di gameti sia quelli relativi alla salute della donna donatrice di oociti. L'impiego di cellule uovo di altre specie risultata incoraggiante; Tanja Dominko ha dimostrato che il citoplasma dell'oocita di bovino è in grado di determinare la proliferazione cellulare del nucleo di cellule somatiche di ratto, maiale, ariete e scimmia sino alla formazione della cavità del blastocite. I risultati di questi lavori rendono chiaro che i meccanismi e le molecole che regolano i primi stadi dello sviluppo embrionale e la precoce differenziazione cellulare sono evolutivamente conservati.

In questa prospettiva è quindi prioritario il proseguimento della ricerca in modelli animali sui meccanismi e sulle molecole che governano i fenomeni di de-programmazione e ri-programmazione. Ad oggi, i fattori che più efficacemente stimolano la riprogrammazione del nucleo somatico e che specificano funzionalmente le cellule staminali sono scarsamente conosciuti. Tra i pochi noti, l'espressione della fosfatasi alcalina, del fattore di crescita GDF-3, di trascrizione OCT-4, di repressione *Genesis*, la comparsa delle proteine del gruppo Polycomb e di quelle capaci di legare le isole CpG metilate. Lo scopo di queste ricerche è quello di giungere a riprogrammare *in vitro* i nuclei delle cellule somatiche in assenza del gamete femminile impiegando citoplasti artificiali. Questa strategia di ricerca è fortemente auspicata nel rapporto della commissione di studio sull'uso delle cellule staminali per finalità terapeutiche, presieduta dal Nobel Renato Dulbecco, di recente istituita dal Ministro della Sanità Prof. Umberto Veronesi. Nel *rapporto Dulbecco*, la commissione, recepiti i più recenti avanzamenti delle conoscenze scientifiche nel settore della biologia delle cellule staminali e dopo aver valutato le proposte del rapporto Donaldson (www.doh.gov.uk) per la ricerca sulle cellule staminali, ha sottolineato il fatto che il sostegno alla ricerca sul differenziamento cellulare al fine di ottenere cellule e tessuti è centrale per lo sviluppo delle politiche sanitarie basate sulla medicina ricostruttiva. Si pensi che solo negli USA circa 60 milioni di persone presentano patologie del sistema cardiovascolare (9,5 in Italia), più di 15 sono affette da diabete (2,1), 10 dalla osteoporosi (2,2), più di 4 dall'Alzheimer (0,5) e più di 2 dal Parkinson (0,04).

La ricerca sulle vie di produzione delle cellule staminali ed in particolare il loro impiego nella terapia (altri se ne potrebbero indicare, impiego per saggi di ecotossicologia, di dinamica farmacologica, etc.) costituirà inoltre un vero e proprio Eldorado per le imprese mercantili considerando la loro potenziale efficacia in un contesto di terapia cellulare/tissutale per la sostituzione di cellule o tessuti danneggiati o non funzionanti nella prospettiva di superare il tradizionale trapianto di organo da cadavere. Si pensi alla ricostruzione del midollo spinale danneggiato da traumi fisici o del tessuto cardiaco dopo infarto, alle malattie infiammatorie di natura sistemica (sindrome di Sjögren), grazie alla sostituzione delle cellule delle ghiandole salivari atrofiche o a quelle muscolo-scheletriche (displasia ossea, malattie progressive delle giunzioni ossee, osteogenesis imperfecta, miopatie primitive) ed ancora alle malattie degenerative della retina, della cornea e dell'apparato uditivo, i cui tessuti siano danneggiati per cause genetiche o traumatiche ed infine alle malattie degenerative del sistema nervoso (Alzheimer, morbo di Parkinson, malattia di Huntington, sclerosi laterale amiotrofica). Fattore cruciale per il successo di tutte queste terapie è la quantità di cellule necessarie per trattare un paziente: il materiale embryo/fetale di 5-6 aborti permette la raccolta di un numero di staminali neuronali utili al recupero funzionale (dai 2 ai 5-6 anni) di un solo paziente parkinsoniano. Questi numeri dicono chiaramente che altre fonti di staminali sono necessarie, in attesa di giungere a riprogrammare *in vitro* i nuclei somatici: è dovere della ricerca accademica e della impresa chimico-farmaceutica trovarle.

Lecture consigliate

1. Dominko T., Mitalipova M., Haley B., Neyhan Z., Memili E., Mckusik B., E First N. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species in "Biology of Reproduction", 60, 1496-1502, 1999.
2. Garagna S., Redi C.A., Zuccotti M. Clonazione: storia e tecniche in "Le Scienze", 377, 46-52, 2000.
3. Kikyo N. E Wolffe A.P. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons in "Journal of Cell Science", 113, 11-20, 2000.
4. Lake J.A., Rathjen J., Remiszewski J. E Rathjen P.D. Reversible programming of pluripotent cell differentiation in "Journal of Cell Science", 113, 555-566, 2000.
5. Thomson J.A. e Odorico J.S., Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines in "Trends in Biotechnology", 18, 53-57, 2000.
6. Futuro Bionico. Le Scienze Dossier 4, 2000.
7. Stem cell research and ethics. Science 287, 1417-1446, 2000.

Caratterizzazione biologica delle cellule del cordone ombelicale: Cellule staminali somatiche di origine fetale

Francesco Bertolini

Divisione di Emato-Oncologia, Dipartimento di Medicina,
Istituto Europeo di Oncologia, Milano

Il trapianto allogenico (o da donatore) di cellule staminali (CS) derivate da midollo osseo (MO), sangue periferico (SP) o cordone ombelicale (CO) è attualmente utilizzato per la terapia di pazienti con emopatie maligne, aplasie, alcune immunodeficienze congenite ed alcune malattie metaboliche. Uno dei maggiori limiti all'utilizzo delle CS allogeniche è costituito dalla necessità di reperire un donatore idoneo. Anche se allo stato attuale quasi due milioni di donatori di CS da MO o SP sono iscritti ai Registri Internazionali, il 50% dei candidati al trapianto non riesce a trovare un donatore pienamente compatibile per i diversi loci del sistema maggiore di istocompatibilità HLA. Inoltre, molti gruppi etnici sono scarsamente rappresentati nei registri dei donatori.

In questo contesto, nella prima metà degli anni '90 sono sorti contemporaneamente a New York, Dusseldorf e Milano tre programmi di raccolta di CS da CO (da qui in poi denominate CS-CO) tipizzate per il sistema HLA e disponibili per il trapianto.

Il razionale biologico di questa iniziativa risiedeva in una serie di studi condotti alla fine degli anni '80 che avevano dimostrato la presenza di CS nel CO (Broxmeyer et al., PNAS 1989) e la loro capacità di rigenerare una ematopoiesi completa nei riceventi pediatrici sottoposti a mieloablazione. Il primo paziente trapiantato con CS-CO, affetto da anemia di fanconi, venne trapiantato il 6 ottobre 1988 da una equipe mista franco-statunitense (Gluckman et al., NEJM 1989). Il successo clinico di questo caso fu la prova di principio della possibilità di usare le CS-CO per la terapia dei pazienti pediatrici.

Lo sviluppo delle banche di CS-CO ha quindi permesso negli anni '90 e all'inizio del nuovo secolo di intensificare l'uso di questa risorsa, e recenti review indicano in oltre 3500 i riceventi di trapianti di CS-CO, in larga maggioranza pazienti pediatrici (Cohen e Nagler, Blood Rev 2004) ed in oltre 70,000 le unità di CS-CO tipizzate e disponibili per l'uso clinico (Benito et al., Bone Marrow Transpl 2004).

L'intenso uso clinico delle CS-CO ha permesso di identificare una finestra di opportunità cliniche differente rispetto alle CS da MO o SP. La natura "naive" dei

linfociti presenti nel CO ha infatti consentito l'utilizzo delle CS-CO con una incompatibilità HLA più ampia (1-2 antigeni) rispetto alle CS da MO o SP, senza incorrere in incidenze di malattie da trapianto contro ospite (GVHD) più significative. Studi immunologici hanno inoltre evidenziato come questi stessi linfociti presenti nel CO possano essere attivati nel corso del trapianto in modo da indurre una significativa attività di trapianto contro leucemia (GVL).

Il rovescio della medaglia, emerso soprattutto nella valutazione degli oltre 500 trapianti *sjn* qui effettuati nei pazienti adulti, è dovuto all'esiguo numero di CS presenti in una singola unità di CS-CO. I tempi di attecchimento delle filiere mieloidi, eritroidi e soprattutto megacariocitaria risultano infatti significativamente dilazionati rispetto a quanto osservato nei pazienti adulti trapiantati con CS da MO o SP (Takahashi et al, Blood 2004).

Allo stato attuale, dunque, la ricerca clinica sull'utilizzo delle CS-CO si incentra sulla necessità di superare la barriera costituita dal limitato numero di CS. Due sono le principali strategie in atto: da una parte si cerca di espandere *ex vivo* le CS mediante esposizione a fattori di crescita (SCF, FL, TPO, etc.) e/o linee cellulari (principalmente endoteliali o mesenchimali) con funzione di sostegno alla proliferazione delle CS. Dall'altra si considera la possibilità di utilizzare contemporaneamente più unità di CS-CO.

Gli studi preclinici e clinici delle procedure di espansione *ex vivo* delle CS-CO hanno fin qui dato risultati non conclusivi, soprattutto perchè non è chiaro il potenziale di attecchimento a lungo termine delle cellule poste in coltura (Mazurier et al., Ann NY Acad Sci 2003). Allo stesso modo, alla luce dei primi studi clinici, non è ancora chiaro se l'utilizzo di più unità di CS-CO sia associato ad un beneficio in termini di velocità di attecchimento delle diverse filiere emopoietiche o attività GVL (Barker e Wagner, Nat Rev Cancer 2003). Di particolare interesse appare dunque la recente osservazione dell'aumento del potenziale di attecchimento delle CS emopoietiche conseguente alla modulazione della peptidasi CD26 (Christopherson et al., Science 2004).

La particolare natura delle CS-CO, che le pone in qualche modo a cavaliere tra le CS di derivazione embrionale e le CS dell'adulto, lascia anche intravedere degli utilizzi clinici in grado di sfruttarne le capacità proliferative e di plasticità. Poiché su base mondiale appare chiara la necessità di accedere a nuove sorgenti di cellule mature del sangue per uso trasfusionale, diversi gruppi hanno studiato la possibilità di usare le CS-CO per la produzione *ex vivo* di globuli rossi. Popolazioni di cellule CD34+ del CO sono state espanse *in vitro* verso la filiera eritroide ottenendo una espansione quasi uni-linea di eritroblasti. Queste cellule, iniettate in diversi modelli di topi immunodeficienti, hanno permesso la proliferazione e la differenziazione terminale in globuli rossi maturi e funzionali (Neidez-Nguyen et al., Nat Biotechnol 2002). Resta ancora da valutare la fattibilità su larga scala di questo approccio potenzialmente molto interessante dal punto di vista clinico.

Un altro campo di particolare interesse è rappresentato dalle malattie neurologiche ed in particolare da quelle su base ischemica. Le CS-CO possiedono una particolare plasticità che le rende capaci di generare (sia *ex vivo* che *in vivo*) cellule mature del sistema emopoietico, endoteliale e nervoso (McGukin et al., Exp Cell

Res 2004). In questo contesto, si è recentemente osservato che l'inoculo di cellule CD34+ del CO può portare al recupero funzionale in un modello murino pre-clinico di ictus. In questo modello, infatti, le CS-CO hanno indotto una significativa vasculogenesi e neurogenesi e permesso la ricostituzione di diversi tessuti corticali (Peterson, J Clin Invest 2004). Risultati similmente interessanti sono stati ottenuti utilizzando le CS-CO per la terapia delle ischemie indotte agli arti di diversi modelli preclinici (Kawamoto et al Cardiovasc Radiat Med 2002) e per la terapia di alcune patologie oculari, dove le cellule CD34+ del CO hanno contribuito alla rivascolarizzazione corneale (Cogle et al., Blood 2004). Resta tuttavia da valutare . a livello clinico - quanto possa essere superata la barriera costituita dal sistema di istocompatibilità HLA.

Un aspetto invece ancora controverso è la presenza nel CO di CS capaci di differenziarsi in senso mesenchimale. Alcuni autori hanno escluso la capacità differenziativa in tal senso delle CS-CO, ma un gruppo è recentemente riuscito ad ottenere una proliferazione di in senso osteogenico e condrogenico (Bieback et al., Stem Cells, 2004) delle CS da CO.

Linee di cellule staminali derivate da villi corionici umani e liquido amniotico: una nuova prospettiva di terapia cellulare

Paolo De Coppi

Laboratorio Cellule Staminali, Oncoematologia Pediatrica e Chirurgia Pediatrica, Università di Padova

Nell'adulto è chiara la possibilità di ricavare le cellule staminali dal midollo osseo, ma chiare dimostrazioni fanno pensare che in realtà queste cellule siano ubiquitarie e siano alla base della riparazione nei singoli tessuti [A. Atala, R.P.Lanza, in "Methods of Tissue Engineering" Academic Press 2001, Gussoni E et al. Nature. 1999 Sep 23; 401(6751): 390-4, Pittenger MF et al. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". Science. 1999 Apr 2; 284 (5411): 143-7]. Fonte alternativa alle cellule staminali di tipo adulto è rappresentata dalle cellule staminali embrionali, caratterizzate da una elevatissima capacità di replicazione mantenendo inalterata la loro potenzialità differenziativa [Weissman Science 287: 1442, 2000]. Diversi ordini di problemi impediscono l'uso di queste cellule nella pratica clinica. Tali cellule infatti, per poter essere coltivate in vitro abbisognano di "feeder layer" da cui nutrirsi; proliferano indefinitamente in vitro e formano teratomi una volta iniettate in vivo; inoltre una volta indotte alla differenziazione solo una parte delle cellule forma il tessuto richiesto, mentre vengono formate in percentuali diverse anche altri tipi di tessuto [Thompson T. "What is the promise of embryonic stem cell research?" J Natl Cancer Inst. 2001 Oct 3; 93(19): 1445-7.]. Da ultimo, limitazioni di carattere etico ne impediscono l'utilizzo clinico in Europa. Recentemente, sangue del cordone ombelicale, già utilizzato nel trapianto allogenico come alternativa alla donazione di midollo osseo da parte di volontari [Broxmeyer et al., Proc Natl Acad Sci USA 86: 3828, 1989], è stato visto che potrebbe rappresentare una valida fonte di cellule staminali. Studi di Broxmeyer, Gluckman et al. (1989) riportano che il sangue ottenuto da cordone ombelicale (UCB) è una ricca fonte di cellule staminali e progenitori ematopoietici (HSPC) e che, inoltre, UCB può essere utilizzato nella pratica clinica per i trapianti di cellule ematopoietiche. Fino ad ora centinaia di trapianti sono stati eseguiti nel mondo, in pazienti - per la maggior parte bambini - con differenti patologie ematologiche e genetiche, quali leucemia linfoide e mieloide, anemia di Fanconi, anemia aplastica, sindrome di Hunter, talassemia tipo beta e neuroblastoma. Inoltre è stato progettato un registro internazionale per il trapianto di UCB, mentre il banking di UCB è già in corso.

Il prelievo dei villi coriali (villocentesi) e del liquido amniotico (amniocentesi) sono state usate per più di vent'anni per la diagnosi prenatale di anomalie cromosomiche. Si tratta di tecniche sicure, utilizzate in periodi diversi della gravidanza, accompagnate comunemente da una bassa morbilità e mortalità. Tra la 10 e la 14 settimana nella diagnosi prenatale precoce si usufruisce oramai da molti anni del prelievo dei Villi Coriali. Tecnica in realtà non priva di rischi, ma comunque in grado di fornire cellule di tipo embrionale (fino alla dodicesima settimana il prodotto del concepimento viene definito appunto embrione per le caratteristiche peculiari che ne caratterizzano il suo sviluppo). Il liquido amniotico che può essere teoricamente prelevato a partire dalla 12 settimana fino al termine della gravidanza, viene normalmente prelevato tra la 14 e la 18 settimana, periodo nel quale il feto subisce un importante rimodellamento che ne segna i tratti finali esterni, liberando un enorme quantità di cellule nel liquido che lo circonda; inoltre altre cellule vengono continuamente liberate da organi e apparati in continuo contatto con il liquido amniotico, quali tratto gastro-intestinale, respiratorio e urinario. Tali cellule, perdendo il contatto con gli stimoli differenziativi provenienti dal tessuto di origine, potrebbero mantenere caratteristiche di pluripotenza. È noto, infatti, che la matrice gioca un ruolo attivo e complesso nella regolazione del comportamento delle cellule con cui entra in contatto, influenzandone lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione, la forma e la funzione metabolica. Le cellule derivate dal prelievo dei Villi Coriali e del liquido amniotico rappresentano l'indubbio vantaggio rispetto alle cellule cordonali di rappresentare uno stadio notevolmente più precoce di differenziazione e pertanto poter essere una fonte di cellule staminali notevolmente più efficace. Inoltre tali cellule, rappresentando uno stadio più precoce, hanno molto probabilmente una più bassa immunogenicità e quindi rappresentare un vantaggio nell'uso del trapianto di tipo allogenico. Partendo da queste considerazioni campioni di fluido amniotico e di villi coriali umani prelevati in epoche diverse durante la gestazione sono stati utilizzati: le cellule sono state isolate, clonate ed espanse in cultura. Per esplorare la loro pluripotenzialità le stesse sono state coltivate in condizioni di induzione endoteliale (EBM2 Medium e VEGF), adipogenica (Desametasone, 3-isobuti-1-metilxantina, insulina ed indometacina), miogenica (siero di cavallo, estratto di embrione di pollo e 5-AZA), osteogenica (siero bovino fetale, desametasone, beta-glicerofosfato, acido ascorbico-2-fosfato), neurogenica (NGF e BHA) ed epatocitaria (siero di bovino fetale, HGF).

Le cellule da noi selezionate avevano capacità clonogenica, mantenevano una normale lunghezza del telomero e un normale cariotipo. I diversi cloni così derivati erano in grado, nelle condizioni descritte precedentemente di andare incontro in vitro a differenziazioni in senso osteogenico, muscolare, adipogenico, endoteliale, neurogenico ed epatocitario. Inoltre, cloni derivati da topo erano in grado, se iniettati in blastocisti di dare origine a diversi tessuti.

Tale modello potrebbe rappresentare un'interessante arma terapeutica nel prossimo futuro: tali cellule infatti potrebbero migliorare i problemi proliferativi e differenziativi legati all'uso delle cellule staminali adulte e nello stesso tempo superare i problemi etici legati alle cellule embrionali.

Mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche

Laura Salvaneschi

Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

A partire dalle prime evidenze nei modelli animali della capacità delle cellule staminali di ripopolare il midollo osseo, le cellule staminali ematopoietiche (CSE) sono diventate la principale fonte di cellule per il trapianto autologo ed allogenico (1). Al 1978 risalgono i primi trapianti autologhi (2) coronati da successo. Nei primi anni '80 vennero descritte le caratteristiche delle CSE periferiche circolanti non mobilizzate o mobilizzate con chemioterapia; solo successivamente alla disponibilità dei fattori di crescita ematopoietici è stato possibile raccogliere in numero elevato CSE dal sangue periferico ed ottenere una rapida ricostituzione delle funzioni midollari dopo trapianto autologo. Il parallelo sviluppo della terapia di supporto post-trapianto ha permesso di dimostrare che l'uso delle CSE era correlato con riduzione della tossicità e della mortalità trapianto-correlata. Ma il vantaggio principale delle CSE ottenute mediante mobilizzazione è probabilmente rappresentato dalla possibilità di raccolta di un numero così elevato di cellule da permettere di procedere agevolmente a manipolazione, purging ed espansione. Le CSE del sangue periferico sono state rapidamente impiegate, dopo l'autologo, anche nel trapianto allogenico. Poiché una raccolta di CSE contiene un numero di T-linfociti superiore di dieci volte rispetto al prelievo midollare, il rischio maggiore è rappresentato dall'incremento di incidenza e gravità di GvHD. Di fatto, la comparsa di GvHD acuta non appare aumentata, mentre la GvHD cronica, se si somministrano CSE non selezionate, compare con frequenza significativamente maggiore in caso di trapianto di CSE raccolta dal sangue periferico.

Al midollo osseo ed alle CSE periferiche si affianca come fonte di cellule staminali ematopoietiche da impiegare per il trapianto il sangue del cordone ombelicale, la cui maggiore limitazione per l'utilizzo nel paziente adulto è, almeno allo stato, il numero relativamente limitato di cellule CD34+ presenti.

Mobilizzazione e raccolta delle CSE dal sangue periferico

Le CSE possono essere ottenute anche senza mobilizzazione dal sangue periferico, ma una raccolta efficace avviene solo dopo mobilizzazione del pool delle CSE

mediante trattamento con farmaci citotossici, con fattori di crescita ematopoietici o con la combinazione di entrambi.

I vantaggi derivanti dalla raccolta delle CSE dal sangue periferico sono rappresentati:

- a) per il donatore, dalla raccolta eseguita senza ricorrere ad anestesia generale;
- b) per il ricevente, la possibilità di raccogliere un numero di progenitori ematopoietici più di dieci volte superiore a quello ottenibile con prelievo midollare. Un elevato numero di CSE assicura il successo dell'attecchimento e riduce il rischio di fallimento del graft in caso di trapianto da donatore non correlato o "mismatched". Il problema della maggiore incidenza di GvHD cronica è superabile mediante l'adozione dei purgino dei linfociti contaminanti.

A) Mobilizzazione delle CSE con terapia citotossica

La mobilizzazione delle CSE chemioterapia-mediata fu descritta per la prima volta nel 1976 nella fase del recupero ematologico in pazienti sottoposti a terapia mieloablattiva (3).

E' stato dimostrato che sia dosi singole di ciclofosfamide (3-7 g/m²) sia regimi chemioterapici con differenti combinazioni di farmaci citotossici sono in grado di ottenere la mobilizzazione, che è la diretta conseguenza di una mielodepressione di grado elevato tale da indurre per alcuni giorni una neutropenia severa. Le CSE aumentano di numero nel sangue periferico durante la fase del recupero ematopoietico: la raccolta mediante leucaferesi si inizia non appena la conta leucocitaria supera il valore di $1 \times 10^9/L$.

Gli svantaggi dell'impiego della sola chemioterapia sono rappresentati da:

- limitata efficacia di mobilizzazione, con conseguente aumento del numero delle sedute di leucaferesi,
- rischi e tossicità chemioterapia-correlati,
- difficoltà di predizione del "timing" per la raccolta.

Attualmente, per le motivazioni sopra elencate, questa modalità di mobilizzazione è praticata solo raramente.

B) Mobilizzazione delle CSE con sole citochine

L'effetto mobilizzante del Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) e del Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) è stato descritto per la prima volta nel 1988 (4).

Entrambe le citochine possono essere impiegate, senza stimolazione addizionale con farmaci citotossici, per l'espansione del pool di CSE circolanti, sia in pazienti sia in donatori sani.

G-CSF è impiegato di routine sia da solo sia associato a farmaci citotossici, in quanto, rispetto a GM-CSF, offre i seguenti vantaggi:

- maggiore efficacia di mobilizzazione;
- maggiore sicurezza e tollerabilità per i donatori/pazienti trattati.

Gli effetti indesiderati, secondari alla somministrazione di questi fattori di crescita, sono rappresentati fundamentalmente dai dolori ossei, che compaiono invariabilmente quando le dosi di G-CSF somministrate superano i 10 mg/Kg/die. Con

frequenza minore possono comparire: cefalea, astenia, febbre, nausea. GM-CSF comporta, in aggiunta, il rischio elevato di indurre eventi avversi sistemici.

In Letteratura sono riportati anche casi di rottura spontanea di milza in pazienti/donatori dopo mobilizzazione con G-CSF (5).

Altri fattori di crescita sono stati utilizzati in trials clinici controllati: Interleuchina-3 (IL-3), Interleuchina-8 (IL-8), Trombopoietina (TPO), Fit-3 ligand (Fit-3), ecc., che non hanno dimostrato di essere superiori a G-CSF quanto ad efficacia e sicurezza (6, 7).

L'associazione di G-CSF e GM-CSF non comporta un incremento di efficacia statisticamente significativo e, d'altra parte, sottopone il paziente alla tossicità di entrambe le citochine.

Le cellule CD34+ del sangue periferico aumentano solo in terza giornata dalla prima dose di G-CSF e raggiungono i valori massimi usualmente in quinta giornata. Pertanto la raccolta deve essere iniziata non prima del terzo giorno e non deve essere protratta oltre il settimo dall'inizio della somministrazione.

Le dosi di G-CSF somministrate tengono conto della necessità di conciliare una efficiente mobilizzazione con minimi livelli di tossicità. Usualmente si somministrano 8-16 mg/Kg suddivise in due somministrazioni ogni 12 ore. Le leucaferesi di norma iniziano in quarta o quinta giornata dall'inizio del trattamento con fattore di crescita e non proseguono oltre il settimo giorno. In caso di donazione allogenica si utilizzano dosi ridotte per evitare un incremento eccessivo di leucociti (superiore a $70 \times 10^9/L$).

C) Mobilizzazione delle CSE con citochine e chemioterapia

La mobilizzazione combinata G-CSF (oppure G-CSF + GM-CSF) + chemioterapia è associata ad un'efficacia significativamente aumentata della mobilizzazione delle CSE e ad una riduzione del numero di cellule neoplastiche contaminanti il graft.

Gli svantaggi della mobilizzazione combinata sono rappresentati da:

- aumento di tossicità e morbilità;
- maggiori difficoltà di pianificazione della raccolta.

Il momento ottimale per la raccolta coincide in genere con valori di conta leucocitaria di $5 \times 10^9/L$ e con l'inizio del recupero piastrinico. Tuttavia solo il monitoraggio delle cellule CD34+ nel sangue periferico offre informazioni utili per dare inizio alla leucaferesi e programmare il numero di sedute.

L'impiego di G-CSF si è dimostrato associato ad una bassa incidenza di effetti indesiderati e ad un più precoce picco delle cellule CD 34+. Nonostante l'efficacia della mobilizzazione dipenda dalla dose di citochine somministrate, di fatto i dosaggi sono relativamente bassi (8-16 mg/Kg/die): la somministrazione ha inizio il giorno successivo al completamento della chemioterapia e continua fino al completamento della raccolta di CSE.

D) Controindicazioni alla somministrazione di G-CSF nei donatori sani

I donatori allogenici possono presentare problemi legati al peso (pazienti pediatrici) o all'età. Le principali controindicazioni alla mobilizzazione sono:

- positività dei markers infettivologici (HbsAg, HIV, HCV);
- trombosi venose;
- malattia aterosclerotica;
- malattie neoplastiche ed autoimmuni.

Effetti indesiderati a lungo termine (insorgenza di mielodisplasie, leucemie) non sono ad oggi dimostrati.

E) La raccolta delle CSE dal sangue periferico

Le procedure di aferesi, grazie all'elevato livello tecnologico raggiunto dai separatori cellulari, permettono di raccogliere una vasta gamma di prodotti da impiegare in terapia e/o di trattare un numero sempre maggiore di pazienti, anche in situazioni cliniche critiche.

Perché la raccolta delle CSE dal paziente/donatore avvenga in modo corretto ed efficiente è indispensabile seguire le linee guida emanate dal Servizio di Medicina Trasfusionale di riferimento. In particolare:

- La responsabilità dell'uso dei separatori cellulari è del medico responsabile di settore, coadiuvato dai Medici del settore e dallo staff infermieristico.
- Il consenso informato deve essere sottoscritto sia dai pazienti sia dai donatori.
- Il Medico dell'Aferesi è responsabile della selezione di pazienti e donatori. Per questi ultimi devono essere seguite le disposizioni legislative vigenti.
- I pazienti pediatrici richiedono una particolare attenzione e la stretta collaborazione con i medici dello staff pediatrico.

Le procedure di aferesi non sono esenti da rischi sia per i donatori sia per i pazienti:

- tutto lo staff medico – infermieristico deve essere in grado di riconoscere le più comuni complicanze e preparato ad intervenire per correggerle.
- Lo staff deve essere addestrato a risolvere i problemi più comuni, che riguardano: gli accessi venosi, le reazioni da citrato, le reazioni secondarie al rimpiazzo dei liquidi, le reazioni trasfusionali emolitiche e non emolitiche.
- I pazienti pediatrici e quelli con malattie renali, epatiche, immunosoppressione, ecc. sono i più esposti alle reazioni avverse.
- L'abilità nell'uso dei separatori e nell'assistenza a pazienti e donatori è assicurata solo dall'uso regolare delle apparecchiature e dalla permanenza nel settore di aferesi.

Particolare rilevanza assume la valutazione clinica. La selezione del candidato ad eseguire la leucaferesi per la raccolta di cellule staminali deve riguardare sia il paziente candidato all'autotrapianto che il donatore sano individuato per la donazione di cellule staminali allogene.

In caso di autotrapianto, il paziente considerato eleggibile per il trapianto deve essere valutato attentamente in due tempi diversi dal medico del servizio di immunoematologia sia per quanto riguarda le condizioni cliniche che i parametri di laboratorio e l'idoneità degli accessi vascolari. La prima valutazione dovrà essere effettuata circa 15 giorni prima del presunto momento della raccolta per

l' idoneità alla leucaferesi e la seconda volta immediatamente prima della raccolta (24 ore prima) con l' intento di individuare eventuali controindicazioni alla procedura presentatesi nel frattempo. Entrambe le valutazioni devono essere documentate.

La valutazione clinica deve comprendere anamnesi ed esame obiettivo. I parametri di laboratorio indispensabili di cui disporre comprendono gli esami di funzionalità epatica, renale, elettrolitemia, coagulazione. Inoltre devono essere disponibili un esame Rx del torace, EGC ed un' eventuale indagine ecocardiografica eseguita da non oltre 30 giorni. La presenza di febbre intercorrente nei giorni immediatamente precedenti la leucaferesi e non ascrivibile all' uso del fattore di crescita deve essere attentamente studiata.

Controindicazioni assolute alla raccolta sono rappresentate da:

- insufficienza cardiaca con frazione di eiezione ventricolare inferiore al 40%;
- gravi alterazioni del ritmo cardiaco;
- grave insufficienza renale;
- insufficienza epatica ingravescente;
- IMA recente; TIA recente;
- ipertensione arteriosa non controllabile con i comuni presidi terapeutici;
- diabete mellito insulino-dipendente non controllabile con terapia insulinica;
- importanti deficit coagulativi;
- infezioni in atto.

La presenza di febbre > 38°C di origine infettiva batterica, virale, fungina emersa nei giorni che precedono la raccolta impone o la temporanea sospensione della raccolta o la programmazione di accertamenti aggiuntivi.

La terapia con ACE inibitori (fatta eccezione per il losartan) deve essere prontamente sospesa e sostituita con un Ca antagonista o un b-bloccante.

Il posizionamento di un catetere venoso centrale (CVC) si impone qualora il paziente non disponga di almeno 3 accessi venosi periferici sicuramente praticabili. Due di questi accessi venosi periferici devono essere reperibili alla piega del gomito bilateralmente e di calibro adeguato (deve essere possibile posizionare un ago fistola da 17 G). Il CVC deve essere posizionato preferibilmente a livello della vena succlavia e avere le seguenti caratteristiche: bilume da dialisi con calibro 12 French, lunghezza 16 cm (paziente adulto); bilume da dialisi con calibro 8 French, lunghezza 12 cm (paziente pediatrico o adulto di basso peso).

I cateteri venosi centrali devono essere posizionati da un medico qualificato per eseguire questa procedura.

In caso di allo trapianto, il donatore sano compatibile deve essere studiato con le stesse modalità sopra riportate per il paziente; è indispensabile un accurato screening infettivologico, comprendente la sierologia per epatite B, C, per HIV1-2, per HTLVI-II e per la lue, eseguiti entro 30 giorni dalla raccolta. Particolare attenzione deve essere posta alla storia trasfusionale del donatore, all' intervallo tra vaccinazioni e donazione, alla somministrazione di Immunoglobuline. Nei limiti del possibile devono essere utilizzati accessi venosi periferici. Il posizionamento

di un CVC va considerata procedura eccezionale e deve incontrare il pieno consenso informato riguardo ai rischi che tale pratica comporta.

Per il trattamento degli effetti indesiderati devono essere disponibili farmaci e strumentazioni adeguati nella sede di aferesi e deve essere predisposta una specifica procedura di intervento in caso di insorgenza di una delle reazioni indesiderate di più frequente riscontro o di maggiore gravità.

La complicità di più comune riscontro durante la procedura è l'ipocalcemia transitoria indotta dall'impiego di ACD-A quale anticoagulante, facilmente evitabile mediante la somministrazione profilattica di calcio gluconato; dopo la procedura l'evento più frequente è la riduzione critica del numero delle piastrine, conseguenza della processazione di due volumi ematici nei separatori a flusso continuo. È prassi consolidata reinfondere al donatore/paziente (se il numero delle piastrine è inferiore a $50 \times 10^9/L$) il plasma autologo ricco di piastrine ottenuto per centrifugazione dall'unità di cellule staminali raccolte.

Le complicanze associate al posizionamento del catetere venoso centrale sono evitabili se l'accesso venoso centrale è affidato a mani esperte. Lo scompenso emodinamico nei pazienti pediatrici è evitato dall'impiego di separatori cellulari a flusso continuo e con bassa extracorporea e dalla disponibilità di uno staff medico-infermieristico preparato, in grado di programmare il priming del separatore con globuli rossi in questi pazienti ed un attento bilanciamento dei liquidi.

F) La dose di CSE necessaria per il trapianto

Il numero totale di cellule esprimenti l'antigene CD34 correla con la conta delle CFC e con la velocità di ripopolazione midollare, in caso di trapianto autologo, anche se non permette di predire con precisione il tempo necessario per la ricostituzione del midollo, soprattutto quando il numero di CD34+ è molto elevato. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che, per un numero di cellule CD34+ superiore a $2-2,5 \times 10^6/Kg$, un ulteriore incremento dei progenitori non ha come effetto un decremento lineare del tempo necessario per il recupero piastrinico. Vi è accordo sul fatto che una buona ripopolazione midollare, nella stragrande maggioranza dei trapiantati, si ottiene quando è superata la soglia di $2 \times 10^6/Kg$ (i valori delle piastrine risalgono, nel 90% dei casi, nel giro di quattro settimane). $3,5-5 \times 10^6/Kg$ sono considerati valori ottimali; un incremento ulteriore non si traduce in una riduzione sostanziale del tempo necessario per l'attecchimento.

Nella definizione della dose non deve essere mai dimenticato il paziente candidato al trapianto con le caratteristiche peculiarità (tipo di malattia, stadio, età, patologia associata, storia della malattia, ecc.).

La qualità di una raccolta di CSE si può testare con la conta delle CFU-GM, che correla con quella delle cellule CD34+. La dose target di CFU-GM è stimata di $1-5 \times 10^5/Kg$ (a seconda del metodo impiegato). In pratica si ricorre alla sola conta delle cellule CD34+, che ha il vantaggio di una maggiore rapidità di esecuzione ed attendibilità, se eseguita da mani esperte.

Si deve infine segnalare che mobilitazione e raccolta sono negativamente influenzati da (8):

- precedente radioterapia (dosaggi, estensione);
- chemioterapia pregressa:
 - durata
 - dosaggi
 - tipo di farmaci impiegati (BCNU, Melphalan, Fludarabina)
- presenza di metastasi a livello midollare (?).

Meccanismi della mobilizzazione delle CSE

Localizzazione, proliferazione, differenziazione e sopravvivenza delle CSE nel midollo osseo devono essere inquadrare in un contesto generale di relazioni dinamiche con il microambiente midollare e la matrice extracellulare.

In condizioni basali le CSE nei vari stadi di differenziazione sono confinate in specifiche nicchie del midollo osseo, dalle quali le cellule differenziate e mature migrano nel sangue periferico. Un piccolo numero di cellule primitive esce dal comparto midollare e migra nel sangue. Il meccanismo di rilascio dal midollo non è ancora del tutto chiarito.

Il pool delle CSE circolanti può aumentare notevolmente sotto l'effetto di svariate stimolazioni; questo evento, che viene definito "mobilizzazione", è stato dimostrato nelle numerose specie animali studiate, confermando la convinzione che si tratti di un meccanismo altamente conservato.

In studi recenti condotti sia su modelli murini sia nell'uomo si è evidenziato che il midollo osseo rappresenta la sede di complesse interazioni fra citochine/chemochine, proteasi e molecole di adesione. La complessità di questi meccanismi è dovuta alla possibilità che i singoli fattori agiscano indipendentemente oppure interagiscano fra loro configurando un vero e proprio processo a cascata (9).

Le proteasi

La mobilizzazione ottenuta con G-CSF è il risultato di una complessa cascata di eventi, difficilmente isolabili.

Studi condotti su modelli murini con deficit dei recettori per IL-8 o G-CSF hanno dimostrato che per la mobilizzazione è indispensabile la presenza di un pool sufficientemente ampio di neutrofili con normale funzionalità, in particolare con normale risposta a IL-8 o a G-CSF (10-12);

Perché la mobilizzazione si attui, dopo somministrazione di G-CSF, è necessaria anche la presenza di un fattore solubile;

I neutrofili attivati dopo trattamento con G-CSF liberano il contenuto dei granuli specifici (matrice metalloproteinasi - 9 [MMP-9], lactoferrina) e dei granuli azzurrofilici (elastasi, catepsina G, proteinasi 3) e incrementano la liberazione di L-selectina.

Anche se le modalità d'interazione di queste proteasi, i loro specifici substrati in vivo e l'interazione con altre molecole sono ancora materia di studio, è stato dimostrato che, dopo somministrazione di G-CSF, serin-proteasi (soprattutto elastasi neutrofila) si accumulano nell'ambiente midollare; i loro substrati comprendono numerose molecole, tra le quali: molecole di adesione dell'endotelio vasale

(VCAM-1), c-kit, il recettore 4 per la chemochina CXC (CXCR4) e SDF-1 (ligando per il fattore 1 di derivazione stromale). Tra gli altri substrati, non ancora identificati, vi sarebbe lo stesso G-CSF: ciò spiegherebbe il declino dell'efficienza di mobilitazione dopo la sesta giornata di trattamento, nonostante la prosecuzione della somministrazione (13, 14).

Metalloproteasi o dipeptil peptidasi IV (DPPIV/CD26) operano il clivaggio delle stesse molecole che sono attaccate da serin-peptidasi (15).

Oggi si ritiene che il contributo di ogni singola proteasi non sia critico, ma che sia richiesta una coalizione di proteasi all'interno del midollo osseo, perché la mobilitazione abbia luogo.

Le chemochine

La mobilitazione delle CSE si ottiene con numerose chemochine: IL-8, Proteina infiammatoria macrofagica 1α o 1β , Gro β , SDF-1, ecc.

L'effetto mobilizzante si manifesta molto rapidamente (dopo 30 minuti, fino ad alcune ore).

Dal punto di vista funzionale sono state studiate IL-8, Gro β , SDF-1. La risposta alla somministrazione di IL-8 e Gro β è dipendente dalla presenza di un numero adeguato di neutrofili circolanti funzionalmente normali ed è accompagnata dall'incremento di MMP-9, rilasciata dai neutrofili stessi (16).

SDF-1 è la chemochina più attiva: essa induce "down regulation" del recettore di CXCR4 e ne cancella il segnale sulle CSE.

Le integrine

Le CSE circolanti sono cellule non-ciclianti: si è dimostrato che escono preferibilmente dal midollo osseo le cellule quiescenti, che presentano anche riduzione funzionale dei recettori di VLA-4.

La risposta migratoria a G-CSF è mediata dalla partecipazione delle integrine: infatti la "down regulation" della funzione integrinica è un passaggio obbligato per gli stadi finali di tras migrazione attraverso l'endotelio dei sinusoidi.

Un altro evento obbligatorio è la "down regulation" dei recettori di CXCR4 e l'iporesponsività a SDF-1.

Tutto ciò comporta che la tras migrazione avvenga in maniera efficiente solo in cellule che presentano iporegolazione sia di integrine alfa 4 sia della funzione di CXCR4/SDF-1 (17).

Quesiti irrisolti

Gli studi eseguiti sulla mobilitazione non hanno ancora chiarito l'intero meccanismo e lasciano aperti numerosi quesiti:

- Alla base del rilascio fisiologico in circolo delle CSE e della mobilitazione con fattori di crescita ematopoietici sta lo stesso meccanismo? In altri termini, la mobilitazione indotta sarebbe un'esaltazione del processo normalmente presente? Va rimarcato che alcune molecole sono coinvolte solo nell'ematopoiesi stressata e non in condizioni basali.

- Le CSE sono dimostrabili anche in svariati tessuti, fuori dal midollo osseo; le CSE circolanti sarebbero in equilibrio dinamico con quelle dei tessuti. Queste ultime vengono modificate dopo mobilizzazione?
- Solo una piccola percentuale di cellule è mobilizzata rispetto al pool che rimane nel midollo osseo. Le cellule che fuoriescono presentano un particolare fenotipo?
- Le CSE sono rilasciate insieme ad un elevato numero di cellule mature (18). Vi sono influenze transcellulari o umorali che inducono questo comportamento? Vi sono variazioni rispetto ai vari agenti mobilizzanti?

Bibliografia essenziale

1. Dreger P., Gluckman E., Schmitz N. Source of haemopoietic stem cells. In "Blood and Marrow Transplantation" 2000, 69-90. Apperley JF., Gluckman E., Gratwohl A. Eds.
2. Apperbaum FR, Herzog GP, Ziegler JL, et al. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978; 52: 85-95.
3. Richman CM., Weiner RS., Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976; 47: 1031-9.
4. Duhrsen U., Villeval JL., Boyd J., et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988; 72: 2074-81.
5. Balaguer H., Galmes A., Ventayol G. Splenic rupture after granulocyte-colony-stimulating factor mobilization in a peripheral blood progenitor cell donor. *Transfusion* 2004; 44: 1260-1.
6. Rosenfield CS., Bolwell B., Lefever A., et al. Comparison of four cytokine regimens for mobilization of peripheral blood stem cells: IL-3 alone and combined with GM-CSF or G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 179-83.
7. Laterveer L., Lindley IJ., Heemskerk DP., et al. Rapid mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by a single intravenous injection of Interleukin-8. *Blood* 1996; 87: 71-8.
8. Dreger P., Kloss M., Petersen B., et al. Autologous progenitor cell transplantation: Prior exposure to stem cell-toxic drugs determines yield and engraftment of peripheral blood progenitor cells but not of bone marrow grafts. *Blood* 1995; 86: 3970-8.
9. Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 2004; 103: 1580-5.
10. Link DC. Mechanisms of granulocyte colony-stimulating factor-induced hematopoietic progenitor-cell mobilization. *Semin Hematol* 2000; 30: 973-81.
11. Thomas J., Liu F., Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 183-9.

12. Pruijt JFM., Verzaal P., Van Os R., et al. Neutrophils are indispensable for hematopoietic stem cell mobilization by interleukin-8 in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6228-33.
13. Lévesque JP., Takamatsu Y., Nilsson SK., et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 2001; 98: 1289-97.
14. Lévesque JP., Hendy J., Takamatsu T., et al. Disruption of the CXCR4/CSCL 12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 2003; 110: 187-96.
15. Proost P., Struyf S., Schols D., et al. Processing by CD26/dipeptidyl-dipeptidase IV reduces the chemotactic and anti-HIV-1 activity of stromal-cell derived factor 1 alpha. *FEBS Lett* 1998; 432: 73-6.
16. Pruijt JFM., Fibbe WE., Laterveer L., et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10863-8.
17. To LB., Haylock DN., Simmons PJ., Jultner CA. The biology and clinical use s of blood stem cells. *Blood* 1997; 89: 2233-58.
18. Abkowitz JL., Robinson AE., Kale S., et al. The mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood* 2003; 102: 1249-53.

Allestimento di colture di cellule staminali somatiche

Tui Neri

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia

I tessuti sono sottoposti a continui fenomeni di depletamento cellulare, sia per l'usura dovuta allo svolgimento delle normali funzioni fisiologiche, sia per eventuali insulti chimici, fisici o biologici che possono danneggiare gli organi di un individuo.

La capacità di riparare un danno (plasticità) è una caratteristica espressa in modo eterogeneo dai diversi tessuti e può non essere presente, se non in minima parte, in quelli perenni. Infatti, i tessuti che sono sottoposti ad un continuo turnover fisiologico come l'intestino tenue, l'epidermide e il sistema emopoietico possono più facilmente riparare lesioni anche molto estese, mentre tessuti più "statici", come quello muscolare, non mostrano di possedere simili potenzialità.

Nei mammiferi si riscontrano due sistemi di rinnovo o sostituzione di cellule: in un caso (epatociti, cellule endoteliali) l'omeostasi cellulare viene mantenuta attraverso la divisione delle cellule differenziate a dare cellule figlie con le stesse caratteristiche funzionali e lo stesso fenotipo (duplicazione semplice); nell'altro caso è prevista l'esistenza di un compartimento di cellule indifferenziate e multipotenti (cellule staminali somatiche, SCs) che hanno la duplice capacità di replicare se stesse e generare cellule progenitrici. È da queste ultime che si generano tutti i tipi di cellule mature appartenenti ad un dato tessuto.

Le SCs sono spesso quiescenti o proliferano molto lentamente, ma hanno la capacità di iniziare a dividersi rapidamente per rimpiazzare cellule morte o danneggiate.

Cellule staminali somatiche: definizione

La definizione di cellula staminale non è immediata. Essa si basa su caratteristiche funzionali, ma perché queste vengano indagate e stabilite è necessario che la cellula staminale sia manipolata sperimentalmente, procedura che ne altera le proprietà fisiologiche di base.

Esiste comunque una definizione formulata da Potten e Loeffler nel 1997, e attualmente accettata, che prende come riferimento le staminali che popolano l'e-

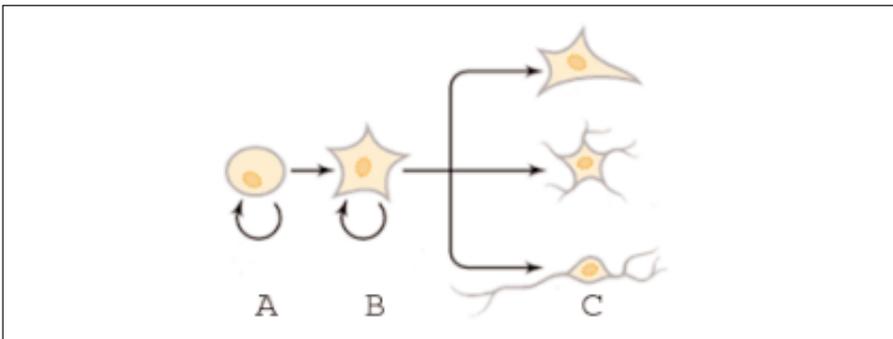
pitelio delle cripte intestinali, ma che può essere allargata alle SCs presenti nei diversi tessuti. Queste vengono considerate tali se:

- sono indifferenziate;
- sono in grado di proliferare estesamente;
- sono in grado di generare cellule uguali a se stesse per periodi di tempo molto estesi, in genere per tutta la vita dell'organismo, e possono utilizzare questa capacità in modo da mantenere costante il numero di elementi appartenenti ad un determinato compartimento staminale (automantenimento);
- sono capaci di generare un ampio spettro di cellule differenziate e funzionali (multipotenzialità);
- infine, come conseguenza delle caratteristiche elencate, sono in grado di rigenerare un tessuto che è stato danneggiato.

Le popolazioni staminali presenti nei diversi tessuti esprimono però in modo eterogeneo queste proprietà e talvolta solo in particolari situazioni. Idealmente questi criteri dovrebbero essere soddisfatti in toto; in pratica, anche per limitazioni sperimentali, ciò non avviene. Una ulteriore complicazione deriva dal fatto che non tutte queste funzioni hanno lo stesso peso. Non è sufficiente per esempio definire una cellula come staminale solo in virtù della sua capacità di proliferare, come si è fatto in passato. In generale si può affermare che popolazioni di cellule che soddisfano tutti questi criteri sono “vere cellule staminali”, mentre quelle che non esprimono momentaneamente queste caratteristiche, pur essendone in possesso (quiescenza), sono “cellule staminali potenziali” (Potten e Loffler, 1990).

Le cellule staminali somatiche si trovano localizzate in nicchie ristrette e piuttosto profonde dei tessuti. Al loro interno (il midollo osseo, la base della cripta intestinale, lo strato germinativo dell'epidermide) risiede la popolazione di SCs e avvengono i fenomeni alla base dell'automantenimento. Tra il compartimento staminale somatico e le cellule mature di un tessuto esiste poi un compartimento intermedio, quello dei progenitori di transito. In queste cellule la capacità di proliferare si mantiene per un numero limitato di cicli e si esaurisce con il differenziamento delle stesse in un elevato numero di cellule mature (Fig. 1)

Fig. 1 - A cellula staminale, B progenitore proliferante, C cellule differenziate



In alcuni tessuti non esiste un compartimento staminale chiaramente distinguibile a livello morfologico (muscolo scheletrico). In questi casi la popolazione staminale viene individuata sulla base di marcatori biochimici e molecolari. Le nicchie in cui risiedono le SCs possono quindi essere considerate delle entità biochimiche più che anatomiche, dei microambienti in cui le cellule sono in contatto con i corretti segnali che consentono loro di mantenere le caratteristiche fondamentali che le caratterizzano.

Isolamento e coltura di SCs

Come abbiamo visto le cellule staminali somatiche risiedono nei diversi tessuti al cui rinnovamento partecipano, in misura più o meno rilevante, nell'arco della vita di un individuo. È necessario quindi isolarle per poter allestire una coltura, si procede cioè alla preparazione di una coltura primaria (considereremo qui il modello animale murino come rappresentante della classe dei Mammiferi), nome con il quale viene indicato l'espianto primario di tessuto e la conseguente prima popolazione di cellule che si ottiene tramite un procedimento diverso di volta in volta, a seconda del tipo di cellule che si vogliono ottenere.

Se vogliamo ottenere ad esempio cellule staminali ematopoietiche preleveremo dall'animale i femori e lo sterno, dai quali, con un vero e proprio lavaggio (flushing) faremo fuoriuscire l'intero contenuto, il midollo osseo.

Se vogliamo isolare cellule staminali neurali andremo a prelevare dall'animale una ben precisa area dell'encefalo, la zona subventricolare (SVZ), nella quale sappiamo risiedere gli elementi cellulari cui siamo interessati.

Il primo problema che si presenta durante una coltura primaria è la quantità di cellule che riusciamo a isolare e dalle quali far partire la nostra linea cellulare. Spesso infatti gli elementi di partenza sono molto pochi e frammisti ad un enorme numero di cellule (milioni), detriti e matrice che ritroviamo nella "soluzione" che abbiamo ottenuto dall'animale.

A questo punto inizia una serie di procedure, comprendenti normalmente centrifugazioni successive e lavaggi, che ci permette di liberarci da questa enorme quantità di materiale che altrimenti disturberebbe la crescita delle cellule che abbiamo voluto isolare.

Una volta terminato questo processo, che potremmo chiamare di purificazione, porremo gli elementi ottenuti (a volte difficilmente inquadrabili ad un primo esame al microscopio ottico) nel terreno di coltura nel quale verranno espansi.

I terreni di coltura sono soluzioni contenenti le sostanze chimiche necessarie per il mantenimento in coltura di ciascun tipo di cellula. Le SCs hanno esigenze diverse a seconda della classe cui appartengono. La difficoltà che si incontra nel coltivare le SCs, di qualunque tipo, è primariamente quella di mantenerle in uno stato indifferenziato; se trascurate, tendono molto presto a differenziare, andando normalmente a formare i lineage cellulari propri del tessuto da cui provengono. Nei terreni di coltura sono presenti, oltre ad aminoacidi essenziali e non, soluzioni tampone, antibiotici, beta-mercaptoetanolo, uno o più fattori di crescita. Questi ultimi danno uno "stimolo artificiale", non fornito ovviamente dalle nor-

mali condizioni *in vitro*, che permette di mantenere le cellule in uno stato indifferenziato.

Viene in genere anche aggiunto del siero fetale, il bovino (FBS) è il più comune, che contiene una serie di sostanze che favoriscono notevolmente la proliferazione cellulare; sono ormoni, fattori di crescita (PDGF, FGF?), lipidi, proteine di trasporto dei lipidi, carboidrati, inibitori delle proteasi, minerali e aminoacidi. L'utilizzo di qualunque tipo di siero introduce un elemento di variabilità nella coltura: non solo non ne conosciamo esattamente la composizione, ma spesso sussistono differenze tra i diversi lotti in commercio. Le condizioni di coltura devono essere monitorate costantemente; grande attenzione deve destare un cambiamento nel colore del terreno di coltura (nella maggior parte dei media di crescita è presente una minima quantità di rosso fenolo, un indicatore di PH che vira al variare di quest'ultimo) indice di un cambiamento di PH. Le cellule non devono essere sottoposte a sbalzi di temperatura improvvisi, o almeno è consigliabile limitare lo stress termico al periodo trascorso fuori dall'incubatore, nel quale l'atmosfera è di solito mantenuta ad una pCO₂ del 5% e ad una temperatura di 37°C, per l'analisi morfologica e per l'attuazione delle procedure che permettono l'espansione in coltura delle SCs.

Le cellule staminali somatiche infatti presentano di norma un tasso di crescita molto elevato: tendono a moltiplicarsi indefinitamente fino a consumare tutto il medium di crescita e occupare lo spazio che trovano a disposizione. Le SCs possono crescere adese, come le staminali mesenchimali, o in sospensione, come le cellule staminali nervose. Nel primo caso la procedura di espansione e di subcoltivazione seriale della linea cellulare prevede il distacco delle stesse dalla piastra nella quale sono coltivate, tramite enzimi proteolitici come la tripsina, e la sospensione in terreno fresco. La stessa procedura viene attuata anche nel secondo caso, omettendo l'uso di enzimi, non necessari proprio per il fatto che queste cellule crescono in sospensione.

Tutti i processi che permettono la crescita e l'espansione di queste cellule vanno eseguiti in perfetta sterilità, tramite l'uso di una cappa a flusso laminare verticale. È infatti estremamente ricorrente la contaminazione da batteri, subito evidenti allo sguardo dell'operatore, e soprattutto da micoplasma, non visibile a occhio nudo né rilevabile ad una seppur attenta analisi al microscopio ottico; l'unico effetto evidente di questo microrganismo può essere un eventuale rallentamento della crescita delle cellule in coltura che possono presentare in alcuni casi un aspetto non sano. Esistono in commercio kit completi per la detezione di questo contaminante estremamente dannoso. Esso infatti una volta presente nella coltura non è eliminabile; la sua presenza però va ad alterare le condizioni di vita delle SCs e a minare la conseguente riproducibilità degli esperimenti.

Le colture di cellule staminali somatiche umane vengono allestite di norma in maniera simile a quelle murine e le modalità di subcoltivazione seriale sono in genere molto simili. Deve essere prestata molta attenzione nel manipolare materiale umano: il rischio di trasmissione di patologie (soprattutto dovute a forme virali latenti presenti nei tessuti del "donatore") e soprattutto la necessità di mantenere condizioni di assoluta sterilità se si prevede la possibilità di un trapianto di

cellule in un paziente, rendono la manipolazione di SCs umane un processo più delicato e difficile.

Credo sia opportuno a questo punto ricordare che la condizione di “staminalità” è una condizione intrinseca di una determinata popolazione cellulare; normalmente cioè le SCs, una volta poste nelle condizioni adatte, mostrano di possedere un ampio potere replicativo e una vasto potenziale differenziativo. Queste cellule cioè non vengono immortalizzate, come spesso accade in colture di cellule somatiche, e mantengono le loro caratteristiche per un grande numero di passaggi *in vitro*.

Una volta ottenuta una linea cellulare stabile (sono necessari alcuni passaggi di amplificazione dalla coltura primaria) si procede alla caratterizzazione degli elementi che la compongono. Non tutte le linee infatti mostrano gli stessi tassi di crescita e produzione delle tipologie cellulari proprie del tessuto di origine. Le proprietà di automantenimento e multipotenzialità vengono indagate per mezzo di curve di crescita (Fig. 2) e reazioni di immunofluorescenza (Fig.3).

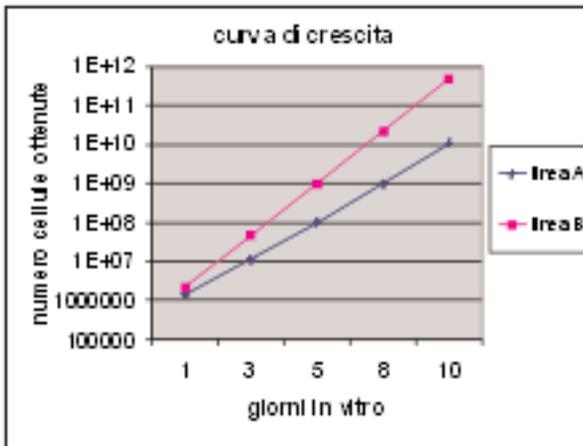


Fig. 2 - Esempio di curva di crescita: la linea cellulare B mostra un tasso di crescita maggiore rispetto alla A.

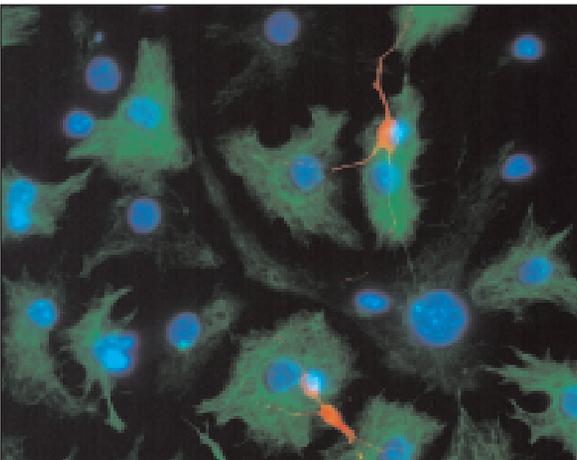


Fig. 3 - Immunofluorescenza: sono evidenti neuroni (in rosso) e astrociti (in verde). Nuclei in blu (Dapi).

Per portare a termine la prima analisi viene contato e registrato per un certo periodo il numero di cellule prodotte a ciascun passaggio di amplificazione a partire da elementi che vengono piastrati regolarmente nello stesso numero; si riportano questi valori su grafico e si ottiene, utilizzando una scala logaritmica, una retta la cui maggiore o minore pendenza indica un maggiore o minore tasso di crescita. La multipotenzialità, ovvero la capacità di dare origine ai diversi fenotipi cellulari caratteristici del tessuto di provenienza, non cambia nel tempo: prendendo come esempio le cellule staminali nervose adulte si è visto che, sia che questa popolazione sia stata appena prelevata dal topo, sia dopo mesi di passaggi di subcoltivazione, la quantità di neuroni (10-15%), astrociti (70-80%) e oligodendrociti (5%) prodotta rimane pressoché invariata. Il metodo più rapido ed efficace per questo secondo tipo di analisi, almeno per un primo esame al microscopio, è l'immunofluorescenza: vengono utilizzati anticorpi primari coniugati o primari e secondari coniugati con fluorocromi: l'anticorpo primario si lega alla proteina di interesse, in questo caso quella propria della tipologia cellulare che stiamo analizzando, rivelando la presenza o assenza di quel particolare antigene e quindi la presenza o assenza di quel particolare lineage cellulare nella nostra coltura. Quest'analisi viene anche effettuata tramite PCR, andando a estrarre, purificare e amplificare il DNA delle cellule presenti in coltura per mezzo di primers specifici per i geni espressi da una particolare classe cellulare.

Brevi accenni all'isolamento e alla coltura di cellule staminali embrionali

Riporto qui, per completezza del quadro, le modalità di isolamento e coltivazione di cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells, ESC).

Vengono ottenute da embrioni allo stadio di blastocisti (Fig. 4); viene isolata manualmente la ICM (Inner Cell Mass), composta da un piccolo numero di cellule, che darà origine all'embrione vero e proprio, e viene posta in coltura in condizioni tali da indurre la moltiplicazione degli elementi che la compongono. Si genera così una linea cellulare, proveniente quindi da un solo embrione, una



Fig. 4 - Blastocisti

popolazione di cellule che contengono lo stesso patrimonio genetico. Le ES hanno un enorme potenziale proliferativo (e purtroppo una elevata tumorigenicità), possono moltiplicare il loro numero in pochissime ore formando colonie che contengono migliaia di elementi. Hanno altresì il più vasto potenziale differenziativo attribuibile ad un singolo tipo cellulare: essendo deputate alla formazione di tutti i tessuti e gli organi dell'individuo adulto devono essere in grado di "trasformarsi" nelle diverse classi cellulari presenti nell'organismo; devono cioè essere in grado di acquisire la morfologia e le caratteristiche funzionali, come l'espressione di un particolare set di geni, proprio di ciascun tipo di cellula presente nei diversi distretti corporei.

L'allestimento di questo tipo di colture è un processo delicato: è molto forte la tendenza al differenziamento, non reversibile, indotta molto facilmente da condizioni di coltura stressanti come una variazione di PH, uno sbalzo termico o una crescita non controllata (crescono più velocemente delle SCs, i passaggi di subcoltivazione avvengono in genere ogni 2 giorni).

Crescono in terreni cui viene aggiunto LIF (Leukemia Inhibitory Factor), coadiuvante nel mantenimento di uno stato indifferenziato, e/o su monostrati di fibroblasti mitomicinizzati, che oltre a fare da supporto trofico se opportunamente ingegnerizzati forniscono anch'essi LIF.

Lo studio dei meccanismi di differenziamento delle cellule staminali embrionali è ancora agli inizi e appare più complesso rispetto allo studio delle SCs, proprio per la grande quantità di fenotipi che è possibile ottenere da queste cellule.

Una delle principali applicazioni future (attualmente in una fase preliminare) che immaginiamo per le cellule staminali sia embrionali che adulte sarà il trapianto. In vista di questo scopo si dovranno migliorare le conoscenze dei fenomeni che regolano, *in vitro*, la proliferazione ed il differenziamento, lavorando allo scopo di ottenere protocolli sempre più precisi, che permettano una accurata manipolazione e un forte controllo sul comportamento delle cellule coltivate.

Caratterizzazione e manipolazione ex-vivo delle cellule staminali emopoietiche

Wanda Piacibello

Istituto per la Ricerca e la Terapia dei Tumori, Torino

La cellula staminale emopoietica (HPSC) è per definizione una cellula capace di una enorme capacità di automantenimento ed in grado di generare cellule mature di tutte le linee differenziate. Quest'ultimo fenomeno avviene tramite la generazione di cellule intermedie, commissionate verso una o più linee maturative, per cui possiedono un grande potenziale proliferativo-differenziativo e, talora, un piccolo grado di automantenimento. Caratterizzazione e quantificazione di questi progenitori e delle HPSC sono fondamentali per la comprensione dei meccanismi e delle sequenze di automantenimento, proliferazione e differenziazione per il trapianto, l'espansione ex-vivo e la terapia genica. Fino a poco tempo fa l'analisi quantitativa delle cellule emopoietiche primitive umane era limitata a saggi in vitro, come i test clonogenici per cellule formanti colonie (le diverse CFC) o colture a lungo termine (LTC). Le CFC identificavano soltanto progenitori commissionati uni o multipotenti. Le LTC permettono di identificare cellule più primitive (LTC-IC), capaci di generare colonie mieloidi per almeno 5-12 settimane di coltura su idonei tappeti stromali. Il saggio trapiantologico del topo è stato fondamentale per caratterizzare e definire le cellule staminali emopoietiche più primitive.

Recentemente, un saggio analogo è stato reso possibile anche per l'uomo. Diversi gruppi hanno provato a trapiantare cellule staminali emopoietiche in diversi ceppi murini mutanti, nel tentativo di trovare un modello di trapianto uomo-topo riproducibile. Ne è risultato che l'iniezione endovenosa di progenitori emopoietici umani in topi Non Obesi Diabetici con Immunodeficienza Severa Combinata (NOD/SCID) irradiati subletalmente determina l'attecchimento, nei tessuti emopoietici (midollo osseo, milza e timo), di cellule primitive umane, che proliferano e differenziano, producendo numerosi LTC-IC, CFCSs, precursori e cellule più immature o mature mieloidi, eritroidi, megacariocitarie e linfocitarie anche senza l'impiego di fattori di crescita esogeni. Le cellule emopoietiche che hanno determinato l'attecchimento di cellule umane sono state denominate SRC (Cellule Ripopolanti gli SCID). Le SRC sono biologicamente distinte e molto più primitive della maggior parte delle LTC-IC e di tutte le CFC.

Questo saggio sperimentale è molto importante per definire e comprendere molti aspetti biologici delle cellule staminali emopoietiche umane sia in campo clinico che sperimentale. Inoltre un concetto è evidente: simbolo della cellula staminale emopoietica è la sua capacità di ricostituzione emopoietica completa e duratura. Un altro punto molto importante è l'identificazione di condizioni di coltura in vitro (o "ex-vivo"), che permettano alle cellule staminali emopoietiche umane di autorinnovarsi e di espandersi. In particolare il sangue di cordone ombelicale (CB) ha attratto particolare attenzione come fonte alternativa di cellule emopoietiche per trapianto e terapia genica. Tuttavia, poiché il suo volume è fisiologicamente limitato e perciò non sufficiente per trapiantare pazienti adulti, molto interesse è stato concentrato sui tentativi di espandere le HPSC di sangue cordonale in vitro.

Abbiamo messo a punto un metodo di colture "serum-free" che permette la crescita per lungo termine di cellule emopoietiche appartenenti a tutte le linee cellulari ed anche di quelle più "immature" (CD34⁺ CD38⁻ Lineage⁻). Queste cellule non solo si mantengono fino ad oltre 20 settimane, ma soprattutto si espandono milioni di volte.

Saggi in vitro (CFU-BI, CFU-GEMM ed LTC-IC) per "cellule staminali putative" hanno confermato l'espansione di cellule più immature; ma soprattutto il saggio di ripopolamento in vivo nei topi NOD/SCID, le cosiddette SRC (SCID Repopulating Cells) ha permesso di quantizzare l'entità dell'espansione delle cellule staminali emopoietiche ripopolanti a lungo termine. Tali cellule sono espanse di 70 volte dopo 9-10 settimane di coltura e di migliaia di volte dopo 16 settimane.

L'applicazione in vivo risulterebbe molto importante per il trapianto con sangue di cordone i soggetti adulti e per la terapia genica.

Modificazione Genetica delle Cellule Staminali

Fulvio Mavilio

Ordinario di Biologia Molecolare, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena

Il trapianto di cellule staminali geneticamente modificate costituisce un nuovo approccio terapeutico per numerose malattie del sangue, sia genetiche (immunodeficienze, talassemia), che acquisite (AIDS). La modificazione genetica delle cellule staminali del sangue viene realizzata attraverso l'utilizzo di vettori virali, virus modificati i cui geni vengono sostituiti da quelli terapeutici. Con questa tecnologia, due gruppi in Francia, all'Ospedale Necker di Parigi, e in Italia, Al San Raffaele di Milano, hanno curato con successo più di quindici bambini affetti da due diverse forme di immunodeficienza grave combinata, una malattia fatale nei primi anni di vita. Dopo i primi successi, sono emersi tuttavia anche i limiti della tecnologia, il più grave dei quali è la possibilità di generare tumori nelle cellule del sangue a causa di attivazione fortuita di oncogeni da parte del vettore terapeutico.

Lo scopo delle ricerche in corso è quindi il miglioramento dei sistemi di trasferimento genico, attraverso l'utilizzo di vettori di nuova generazione dotati di profili di efficacia e di sicurezza superiore a quelli attualmente utilizzati. Le nuove tecnologie saranno probabilmente disponibili per l'utilizzo clinico nell'arco dei prossimi tre anni. Va tuttavia sottolineato che, pur con i limiti attuali, la terapia genica è, nelle applicazioni attuali, una terapia salvavita, che offre in ogni caso uno standard di sicurezza e un rapporto rischio-beneficio per il paziente di gran lunga superiori alle alternative terapeutiche esistenti.

**PLASTICITÀ DELLE CELLULE
STAMINALI SOMATICHE**

Basi molecolari della plasticità differenziativa delle cellule staminali emopoietiche

Sergio Ferrari

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

La disponibilità della tecnologia dei DNA microarrays ha fornito uno strumento importante di indagine per lo studio del profilo di espressione di migliaia di geni contemporaneamente, permettendo quindi di valutare quanti e quali geni sono accesi in uno specifico contesto cellulare (1). L'analisi comparativa fatta con questa metodologia in contesti cellulari diversi ha permesso inoltre:

- a) di affrontare il problema della complessità di programmi genetici quali quello proliferativo (2);
- b) di studiare i meccanismi molecolari che stanno alla base della trasformazione e progressione tumorale (3);
- c) di fare una classificazione molecolare di diversi tumori (4);
- d) di correlare l'espressione genica con la prognosi di diverse neoplasie (5);
- e) di identificare i geni espressi nel processo di differenziamento (6);
- d) di identificare i geni espressi in seguito a trattamenti farmacologici (7), aspetto rilevante per la terapia di numerose malattie neoplastiche e non;
- e) di studiare meccanismi di regolazione genica non ancora conosciuti (8).

Da anni il nostro laboratorio si occupa dello studio, a livello molecolare, della mielopoiesi normale e leucemica con particolare interesse alla monocitopoiesi e granulocitopoiesi (9). Nello studio dell'emopoiesi normale uno dei problemi irrisolti riguarda i meccanismi molecolari che stanno alla base del differenziamento della cellula staminale emopoietica multipotente. In particolare i meccanismi di selezione di linea (lineage commitment) a cellule precursori e la regolazione dei programmi differenziativi che portano a cellule terminalmente differenziate profondamente diverse fra loro per morfologia e funzione (processo di maturazione). L'emopoiesi infatti avviene nel contesto microambientale midollare dove sono presenti, oltre alle cellule ematiche, anche numerose cellule accessorie responsabili della secrezione di numerose citochine e fattori di crescita emopoietici. Le cellule staminali emopoietiche dell'adulto (midollari e periferiche) e quelle fetali derivate dal sangue del cordone ombelicale hanno caratteristiche biologiche particolari quali l'autorinnovamento (self-renewal), la capacità di dare origine ai

precursori delle linee differenziative mieloidi e linfoidi (lineage commitment) e quella di ripopolare il midollo di topi irradiati (engraftment). Più recentemente numerosi studi hanno evidenziato la capacità della cellula staminale emopoietica di trans-differenziare, di dare origine cioè a cellule non emopoietiche quali epatociti, cheratinociti, neuroni (developmental plasticity) (10).

Una delle problematiche aperte è se questi segnali extracellulari siano in grado di influenzare le cellule staminali nel passaggio a precursori cellulari di specifiche linee (modello istruttivo) o se permettano semplicemente la sopravvivenza e la proliferazione di predeterminate cellule staminali (modello permissivo) (11). Anche se questo secondo modello sembra quello prevalente, la notevole plasticità delle cellule staminali non permette di chiarire questo dubbio. Inoltre recentemente è stato proposto un modello in cui la fase di transizione da cellula staminale a precursore multilineare e/o monolineare sarebbe determinato dall'antagonismo fra diversi regolatori trascrizionali dell'ematopoiesi (12). Recenti pubblicazioni hanno permesso di caratterizzare mediante lo studio del profilo di espressione genica, il fenotipo molecolare della cellula staminale emopoietica di topo (13) e umana (14). Una ulteriore problematica aperta è legata ai meccanismi molecolari che stanno alla base della maturazione terminale delle cellule emopoietiche.

In questo studio abbiamo applicato la tecnologia dei DNA microarrays alla caratterizzazione molecolare di diverse popolazioni di cellule staminali emopoietiche anche di recente isolamento come le CD34-/Lin- (15). Mediante l'analisi della variabilità del trascrittoma abbiamo cercato di correlare le proprietà biologiche di tali sottopopolazioni di cellule staminali emopoietiche con l'espressione differenziale di numerose famiglie geniche funzionalmente rilevanti quali fattori trascrizionali, trasduttori del segnale, molecole di adesione, marcatori di superficie, marcatori del differenziamento e geni ciclo relati. I risultati da noi ottenuti hanno chiaramente evidenziato che le cellule staminali emopoietiche CD34-/Lin- sono cellule quiescenti, fuori ciclo, hanno attivato delle vie di trasduzione inibitorie della proliferazione come quella dell'IL-10 e dell'IL-17. Le cellule staminali CD34+ sia Lin- che Lin+ sono cellule in ciclo, prevalentemente nella fase G1, con una attività trascrizionale notevolmente più permissiva in grado di esprimere geni rilevanti per l'autorinnovamento, il differenziamento e molecole di adesione importanti per l'engraftment. A conferma di questi dati di espressione, il saggio clonogenico ha evidenziato che le cellule staminali CD34+ sono sensibili, a differenza delle cellule staminali CD34-/Lin-, all'attività mitogenica della trombopoietina. Inoltre sono trascritti geni associati alla Fase G1 del ciclo e funzionalmente coinvolti nella sintesi proteica, nel processamento del RNA, nel rimodellamento della cromatina, ecc. Anche se non sono ancora noti gli stimoli microambientali che permettono l'entrata in ciclo delle cellule staminali CD34-/Lin- possiamo ipotizzare che il modello di emopoiesi più coerente con i nostri dati sia quello dell'espansione simmetrica della cellula staminale emopoietica e non necessariamente il modello di divisione asimmetrica. Inoltre riteniamo che il modello dell'emopoiesi non sia così strettamente gerarchico come molti autori sostengono, ma che le proprietà biologiche dipendano dallo stato cinetico di tali

cellule e che la fase G1 sia la più coinvolta nella modulazione dell'espressione genica alla base dell'attornovamento, differenziamento o engrafment e quindi anche della plasticità differenziativa (16) in accordo con il modello di emopoiesi proposto da Quesenberry (17).

Altri studi condotti nel nostro laboratorio hanno riguardato le variazioni del trascrittoma nella fase di commitment (plasticità differenziativa) che porta la cellula staminale CD34+ a precursori mieloblastici, monoblastici, eritroblastici e megacarioblastici. Il modello sperimentale da noi utilizzato è stato quello della coltura in vitro di cellule staminali emopoietiche derivate da sangue di cordone ombelicale, coltivate in presenza di un cocktail di citochine e fattori di crescita tali da sostenere la loro attività proliferativa e da specifici fattori di crescita per condizionarne il passaggio a precursori. Inoltre sempre utilizzando tale modello in vitro abbiamo studiato l'importanza della forma attiva della Vit. D3 nel commitment monocitario. I risultati da noi ottenuti hanno messo in evidenza che dosi fisiologiche di Vit. D3 attivano, mediante la via genomica, cioè attraverso il recettore VDR, il commitment della cellula staminale alla mono-macrofagopoiesi come dimostrato dal saggio clonogenico in metil-cellulosa e come confermato dalle variazioni del trascrittoma (18). La purificazione, fatta mediante biglie immunomagnetiche, di precursori monoblastici CD14+ e mieloblastici CD14- e lo studio in vitro del loro potenziale proliferativo e differenziativo, studiato mediante citometria flusso, ha evidenziato che i monoblasti CD14+ hanno una capacità ciclabile molto limitata, 2-3 cicli replicativi, e quindi si arrestano nella fase G1 del ciclo e differenziano spontaneamente, senza necessità di trattamento con agenti inducenti quali Vit. D3, TGF β , M-CSF, a macrofagi. I mieloblasti CD14- conservano invece una notevole capacità ciclabile, sono in grado di completare 12-15 cicli replicativi, e una bipotenzialità differenziativa a mono-macrofagi inducibile sia da Vit. D3 e M-CSF per la monocitopoiesi, che ATRA e G-CSF per la granulocitopoiesi. Lo studio in citometria della coespressione di due marcatori di linea come la MPO per la granulocitopoiesi e il CD14 per la mono-macrofagopoiesi, hanno inoltre dimostrato una transizione continua di precursori mieloblastici, MPO positivi e CD14-, verso i precursori monoblastici CD14+ e MPO-. Infatti si osserva la coespressione dei due marcatori in una rilevante percentuale di cellule. Questa è una evidenza importante di "lineage switching" o "intra hematopoietic plasticity" che si realizza a livello di precursori e non di progenitori (19). La comparazione dei profili di espressione genica dei monoblasti e dei mieloblasti ha permesso lo studio di una lista notevole di geni differenzialmente espressi appartenenti a diverse famiglie funzionali come modellatori della cromatina, fattori trascrizionali, recettori per fattori di crescita, marcatori di superficie, proteine dei granuli, molecole di adesione ecc. In particolare fra i fattori trascrizionali evidenziati, l'espressione differenziale di MafB, ICSP1, CEBP β nei monoblasti colpisce per l'intensità della loro espressione differenziale. La rilevanza funzionale di Maf B nella monocitopoiesi umana è stata dimostrata da esperimenti di over-espressione mediata da vettori retrovirali, di tale fattore trascrizionale nel contesto staminale fetale CD34+. Tali esperimenti hanno messo in evidenza che il programma genetico attivato da MafB nel contesto dei proge-

ntori CD34+ è specifico dei monoblasti e non dei mieloblasti e questo è confermato anche dal saggio clonogenico in metil-cellulosa (20).

In conclusione possiamo dire che:

- 1) gli studi delle variazioni del trascrittoma nell'emopoiesi normale umana associati a studi funzionali hanno dato informazioni rilevanti riguardo ai meccanismi molecolari che stanno alla base delle proprietà biologiche delle diverse sottopopolazioni di cellule staminali emopoietiche;
- 2) il modello cinetico sembra che sia alla base delle variazioni del profilo di espressione genica che si ha nelle diverse sottopopolazioni di cellule staminali emopoietiche, e che l'espansione di tali cellule è probabilmente più riducibile al modello di espansione simmetrica più che asimmetrica. Il modello cinetico può coesistere con l'ipotesi del modello strettamente gerarchico dell'emopoiesi;
- 3) la plasticità differenziativa delle cellule staminali emopoietiche dipende dagli stimoli microambientali e dalla capacità ciclabile di queste cellule e l'induzione di fattori trascrizionali è alla base della scelta delle diverse linee differenziali;
- 4) il lineage switching è possibile anche a livello di precursori e non solo di progenitori emopoietici.

Bibliografia

- 1) Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P. & Trent J.M. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Gen.* 21: 10, 1999.
- 2) Cho R.J., Campbell M.J., Winzler E.A., Steinmetz L., Conway A., Wodicka L., Wolfsberg T.G., Gabrielian A.E., Landsman D., Lockhart D.J., & Davis R.W. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Molecular Cell* 2: 65, 1998.
- 3) Alon U., Barkai D., Notterman D.A., Gish K., Ybarra S., Mack D., & Levine A.J.. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *PNAS* 96: 6745, 1999.
- 4) Bullinger L., Dohner K., Bair E., Frohling S., Schlenk R.F., Tibshirani R., Dohner H., Pollack J.R. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia: *N.E.J.M.* 350: 1605-1616, 2004.
- 5) Valk P.J.M., Verhaak G.W., Beijnen M.A., Erpelinck C.A.J., van Doorn-Khosrovani S.B., Boer J.M., Beverloo H.B., Moorhouse M.J., van der Spek P.J., Lowenberg B., Delwel R. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia: *N.E.J.M.* 350: 1617-1628, 2004.
- 6) Tagliafico E., Tenedini E., Bergamaschi A., Manfredini R., Percudani R., Siena M., Zanocco-Marani T., Grande A., Montanari M., Gemelli C., Torelli U., Ferrari S. Gene expression profile of Vitamin D3 treated HL-60 cells shows a phenotypic but not a complete functional conversion to monocytes.

- Cell Death Diff. 9: 1185-1195, 2002.
- 7) Der S.D., Zhou A., Bryan R., Williams G., & Silverman R.H. Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. PNAS 95: 15623, 1998.
 - 8) Young R.A. Biomedical discovery with DNA arrays. Cell 102: 9, 2000.
 - 9) S. Ferrari, R. Manfredini, A. Grande, G. Torelli, U. Torelli. Proliferation, differentiation arrest and survival in leukemic blast cells. Ann. NY Acad. Sci USA 663: 204-214, 1992.
 - 10) Herzog E.L., Chai L., Krause D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood 102: 3483-3493, 2003.
 - 11) Morrison S.J., Nirao M., Shah M., Anderson D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell 88: 287-298, 1997.
 - 12) Orkin S.H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. Nature Rev. Genetics 1: 57-64, 2000.
 - 13) Phillips R.L., Ernst R.E., Brunk B., Ivanova N., Mahan M.A., Deanehan J.K., Moore K.A., Overton G.C., Lemischka I.R. The genetic program of hematopoietic stem cells. Science 288: 1635-1640, 2000.
 - 14) Ng YY, van Kessel B, Lokhorst HM et al. Gene-expression profiling of CD34+ cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. J Leukoc Biol 2004;75:314-323.
 - 15) Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. Nat Med 4:1038-1045, 1998.
 - 16) Manfredini R., Zini R., Salati S., Siena M., Tenedini E., Tagliafico E., Montanari M., Zanocco-Marani T., Gemelli C., Vignudelli T., Fogli M., Rossi L., Fagioli M.E., Catani L., Lemoli R.M., Ferrari S. The kinetic status of Hemopoietic Stem Cell (HSC) subpopulations underlies a differential expression of genes involved in self-renewal, commitment and engraftment. Submitted.
 - 17) Quesenberry PJ, Colvin GA, Abedi M et al. The marrow stem cell: the continuum. Bone Marrow Transplant 32 Suppl 1: S19-S22, 2003.
 - 18) Grande A., Montanari M., Tagliafico E., Manfredini R., Zanocco-Marani T., Siena M., Tenedini E., Gallinelli A., Ferrari S. Physiological levels of $1\alpha, 25$ dihydroxyvitamin D₃ induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors. Journal of Leukocyte Biology 71: 641-651, 2002.
 - 19) Montanari M., Gemelli C., Tenedini E., Zanocco Marani T, Vignudelli T., Siena M., Zini R., Salati S., Chioffi G., Tagliafico E., Grande A., Ferrari S. Correlation between differentiation capacity and mRNA expression profiling of CD34+ derived CD14- and CD14+ myeloid precursors. Submitted
 - 20) Gemelli C., Montanari M., Tenedini E., Zanocco Marani T., Vignudelli T., Siena M., Zini R., Salati S., Manfredini R., Grande A., Ferrari S. Retrovirally mediated MafB over-expression induces the monocyte differentiation of monoblastic cell lines and CD34+ hematopoietic progenitors. Submitted.

Rigenerazione dell'endotelio vascolare da cellule staminali somatiche

Francesco Bertolini

Divisione di Emato-Oncologia, Dipartimento di Medicina, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

Fino ad alcuni anni or sono si riteneva che la vasculogenesi (generazione di nuovo endotelio dalle cellule progenitrici) fosse limitata al periodo di sviluppo embrionale, mentre nell'adulto la generazione di nuovi vasi (limitata peraltro alla riparazione delle ferite e al ciclo mestruale femminile) fosse ad esclusiva partenza da cellule endoteliali (CE) mature in un processo denominato angiogenesi. Vi è ora invece evidenza della presenza di cellule progenitrici endoteliali (CPE) presenti nel midollo osseo (MO) e nel sangue periferico (SP) durante la vita adulta.

La presenza di CPE capaci di partecipare alla vasculogenesi è stata dimostrata per la prima volta da Shi et al (Blood 1998) in un modello canino sottoposto a trapianto di MO. In questi animali l'impianto di una protesi vascolare 6-8 mesi dopo il trapianto portava alla generazione di nuovo endotelio da parte di cellule del donatore (identificate grazie a tecniche di biologia molecolare). In un modello di topo transgenico esprimente un gene marcatore sotto il controllo di un promoter endotelio-specifico (Flk-1 o Tie-2), CPE derivanti dal MO sono state osservate nella generazione di nuovi vasi nell'endometrio dopo l'ovulazione, nei vasi tumori del colon, nelle ferite cutanee e nei foci di neovascolarizzazione marginali agli infarti del miocardio indotti deliberatamente mediante clamping delle coronarie (Asahara et al., Circ Res 1999).

Un aumento delle CPE circolanti nel SP (valutate mediante citofluorimetria e/o tecniche di coltura cellulare) è stato osservato dopo insulto vascolare, malattie ischemiche, ustioni e nei pazienti neoplastici (Rafii e Lyden, Nat Med 2003; Mancuso et al., Blood 2001). Queste condizioni sono infatti spesso associate al rilascio di chemochine o fattori di crescita endoteliali come VEGF, in un complesso meccanismo di mobilizzazione delle CPE dove fattori come le metalloproteinasi, le molecole di adesione, i macrofagi e le piastrine giocano un ruolo rilevante (Heissing et al., Cell 2002).

Le CPE umane possono essere identificate all'interno della più larga popolazione delle CE circolanti nel SP mediante l'espressione dell'antigene CD133, condiviso peraltro dalle CP del sistema emopoietico. Recenti osservazioni sperimentali hanno peraltro confermato la presenza nel modello murino di CP con poten-

ziale sia endoteliale che emopoietico (Bailey et al., Blood 2004), ma queste cellule sono state identificate come Kit+Sca-1+ Lin- in quanto l'antigene CD133 non è ancora stato sufficientemente studiato nel topo. Oltre che nel MO, sembra possibile che le CPE risiedano nel parenchima dei vasi sistemici ed in alcuni organi. Cellule muscolare isolate con il sistema dell'estrusione del colorante Hoechst (side population cells), infatti, possono generare CE mature (Majka et al., J Clin Invest 2003).

Il ruolo delle CPE nella rivascolarizzazione

a) Retina e sistema nervoso centrale (SNC)

Il diabete, la nascita pre-termine e la degenerazione maculare sono patologie associate ad una rivascolarizzazione abnorme a livello retinico. Questa condizione si può a sua volta associare ad una retinopatia proliferativa. Studi nel topo hanno dimostrato che la progenie di una singola CPE Sca1⁺c-Kit⁺Lin⁻ trasdotta per la green fluorescent protein (GFP), iniettata in un animale letalmente irradiato, può dare origine, dopo ischemia indotta da laser, a nuovi vasi GFP positivi all'interno della retina (Otani et al., Nat Med 2002). Altri studi hanno inoltre dimostrato l'incorporazione nei vasi di CPE Lin⁻ iniettate nel vitreo di topi neonati o adulti con retina deliberatamente fotocoagulata. Sorprendentemente, queste cellule si localizzano in prossimità degli astrociti. Queste osservazioni suggeriscono dunque un ruolo centrale degli astrociti nella formazione dei vasi della retina (Grant et al., Nat Med 2002).

La rivascolarizzazione della zona confinante con la lesione è osservata spesso nei pazienti affetti da ischemia cerebrale. Il trapianto di CPE da donatore maschio in riceventi femminili, sottoposti successivamente a occlusione delle arterie cerebrali, ha dato origine ad una predominanza di cellule del donatore nei siti di rivascolarizzazione studiati 3 giorni dopo l'occlusione (Hess et al, Stroke 2002; Zhang et al., Circ Res 2002).

b) Rivascolarizzazione delle protesi vascolari

Le protesi vascolari autologhe (o, in alternativa protesi costituite da matrici acellulari) vengono utilizzate per sostituire le arterie coronarie. La trombosi è una delle complicanze più temute di questa terapia. Le CPE possono generare delle EC mature (ad attività anti-trombotica) capaci di ricoprire la superficie delle protesi. Dopo lo studio pilota di She et al. (Blood 1998), cellule di MO sono state poste in coltura sulle protesi sintetiche prima dell'innesto, generando una superficie funzionale e ad elevata attività anti-trombotica (Kaushal et al., Nat Med 2001). Questo approccio può quindi facilitare il rimodellamento in vivo della superficie vascolare.

c) Ischemia degli arti

In una serie di studi preclinici, sospensioni cellulari autologhe derivate dal MO, iniettate nel muscolo gastrocnemio reso deliberatamente ischemico, hanno ripristinato la funzione vascolare (Takahashi et al., Nat Med 1999; Kalka et al., PNAS 2000). Una serie di osservazioni cliniche ha confermato la capacità di sospensioni

cellulari del MO di ripristinare la vascolarizzazione nei pazienti affetti da ischemia degli arti (Tateishi-Yuyama, Lancet 2002). Poiché le cellule utilizzate non erano state in alcun modo purificate, resta tuttavia incerto il contributo relativo delle diverse popolazioni (emopoietiche, endoteliali, mesenchimali) presenti nel MO. Va comunque notato che la rivascularizzazione degli arti dipende da una neoformazione bilanciata di vasi arteriosi, venosi e del sistema linfatico, in quanto un deficit di quest'ultimo sistema porta alla formazione di edemi e/o ulcere. L'utilizzo del fattore di crescita VEGF-C sembra di particolare interesse nel promuovere la adeguata proliferazione dei vasi linfatici (Yoon et al., J Clin Invest 2003).

d) Rivascularizzazione del miocardio

Anche se questo argomento viene trattato in maggior dettaglio altrove (Treatment of ischemic heart disease with adult stem cell infusion, C. Stamm), sembra opportuno segnalare una serie di studi preclinici e clinici sull'utilizzo delle CPE nella terapia della malattia ischemica del miocardio. Mentre la presenza di cellule progenitrici miocardio-specifiche - recentemente ipotizzata da Oh et al. (PNAS 2003) - è ancora fonte di controversie, diversi modelli sperimentali hanno permesso di osservare una rigenerazione del miocardio e soprattutto del suo sistema vascolare a partire da cellule progenitrici del MO (Orlic et al., Nature 2001; Kocher et al., Nat Med 2001). Queste osservazioni hanno promosso una serie di studi clinici dove CPE prelevate dal MO (e talvolta purificate come cellule CD133+) sono state utilizzate come supporto all'angioplastica coronaria nei pazienti affetti da ischemia. (Kawamoto et al., Circulation 2001; Strauer et al., Circulation 2002; Assmus et al., Circulation 2002; Kawamoto et al., Circulation 2003; Perin et al., Circulation 2003; Tse et al., Lancet 2003; Stamm et al., Lancet 2003). Nel modello murino, infine, CPE mobilizzate nel SP dalla somministrazione di G-CSF sembrano in grado di riparare una serie di danni al tessuto miocardio indotti dall'ischemia (Orlic et al., PNAS 2001). Anche questa ipotesi è in corso di validazione clinica in una serie di trials internazionali. È inoltre stato recentemente osservato che l'eritropoietina svolge un importante ruolo di mobilitazione delle CPE nel SP (Heeschen et al., Blood 2003).

Il ruolo delle CPE nelle malattie neoplastiche

La prima prova di principio del ruolo delle CPE nella progressione neoplastica è stata ottenuta nel modello murino del topo Id1^{+/-} Id3^{-/-}. In questi animali, la maggior parte dei tumori xeno-trapiantati non progrediva a causa di una insufficiente vascolarizzazione. Dopo un trapianto di midollo da donatore Id1^{+/+} Id3^{+/+}, invece, diversi tipi di tumore potevano crescere con una normale vascolarizzazione, evidentemente promossa da CPE derivanti dal MO (Lyden et al., Nat Med 2001). Studi successivi in questo stesso ed in altri modelli hanno permesso di definire meglio il ruolo delle CPE nella vasculogenesi tumorale, indicando tra l'altro che le CPE giocano un ruolo più rilevante nei tumori poco differenziati rispetto a quelli più differenziati e che progenitori provenienti dal MO sono responsabili della stabilizzazione dei vasi tumorali mediata dai periciti (Salven et al., Blood 2004).

Differenziazione e determinazione dei progenitori neurali

Lorenzo Magrassi

Sezione di Neurochirurgia, Dipartimento di Chirurgia, Università di Pavia, IRCCS Policlinico S. Matteo, e I.G.M CNR

Una definizione operativa di determinazione che ci deriva dall'embriologia classica intende una cellula o un insieme di cellule come determinato quando avendo separato dalla loro sede naturale prima della definitiva differenziazione le cellule di cui si vuole testare la determinazione, le si trapianta ectopicamente o eterocronicamente e queste, a dispetto di condizioni diverse del microambiente, sono egualmente capaci di completare la loro differenziazione fino ad assumere lo stesso fenotipo e ad esprimere gli stessi antigeni che avrebbero espresso se lasciate nella loro sede d'origine.

Questa definizione si applica male ai progenitori neuronali il cui fenotipo caratteristico comprende di norma anche le connessioni sinaptiche stabilite reciprocamente con altri neuroni. Lo stabilirsi delle connessioni appropriate è, infatti, a volte forzatamente impossibile, se i precursori neuronali sono trapiantati ectopicamente in una sede separata da quella ove risiedono i neuroni pre e post-sinaptici che normalmente stabiliscono connessioni con i neuroni derivati dai progenitori trapiantati. Nonostante questo l'albero dendritico e la morfologia dell'assone d'alcune classi di neuroni mantengono caratteristiche topologiche e geometriche che ne permettono la riconoscibilità anche in assenza di connessioni appropriate. Seppur con queste limitazioni possiamo dunque estendere anche ai neuroni e ai loro progenitori la definizione operativa di determinazione basata sul trapianto, chiedendoci se i progenitori neuronali proliferanti presenti nel sistema nervoso dei mammiferi hanno un destino completamente determinato e non modificabile dal microambiente in cui avviene il differenziamento

Per rispondere a questa domanda *in vivo* è necessario poter operare sul sistema nervoso durante lo sviluppo senza interferire con la gravidanza. Questo è possibile nel ratto e nel topo adottando la tecnica dell'iniezione transuterina sotto controllo visivo (1). Questa tecnica sfrutta la possibilità di transilluminare, una volta che la decidua si è assottigliata e retratta dal polo opposto a quello placentare, le strutture del feto attraverso la parete uterina e le membrane extrauterine con una fibra ottica appoggiata alla parete dell'utero. Nel ratto la retrazione della decidua è sufficiente a permettere la transilluminazione a partire dal 14.5 giorno di gesta-

zione (E14.5) mentre nel topo questo avviene a partire da E13. La tecnica È stata impiegata soprattutto per studiare lo sviluppo del sistema nervoso centrale ma può essere adattata a qualsiasi organo o tessuto dell'embrione come il fegato, gli abbozzi degli arti, il cuore che sia direttamente visualizzabile.

La metodica prevede una volta identificato visivamente il bersaglio (per esempio gli emisferi cerebrali) il suo raggiungimento tramite puntura della parete uterina, delle membrane e dei tessuti embrionali che lo circondano con un microelettrodo di vetro il cui diametro esterno non deve superare i 50 micrometri. In questo modo è possibile iniettare volumi fino a 2 microlitri, volumi maggiori, infatti, si perderebbero al di fuori del tessuto spandendosi oltre il bersaglio voluto.

Con questa tecnica a partire dai primi anni novanta è stato possibile effettuare in tutto il sistema nervoso centrale (CNS) durante lo sviluppo trapianti di progenitori neuroepiteliali dissociati da regioni neurogenetiche attive prima e/o dopo la nascita. La produzione di topi (2) e ratti (3) transgenici esprimenti costitutivamente in tutti i tessuti una variante (eGFP) intensamente fluorescente della proteina fluorescente in verde della medusa *Aequorea victoria* ha grandemente semplificato il problema della distinzione delle cellule trapiantate e dei loro eventuali discendenti da quelle dell'ospite. Infatti, trapiantando cellule esprimenti il transgene codificante per l'eGFP in embrioni di ratto non transgenico si possono distinguere facilmente per la loro fluorescenza le cellule trapiantate. Queste cellule sono inoltre perfettamente visualizzate nella loro complessa morfologia permettendo per esempio di studiare appieno le arborizzazioni dendritiche e assonali dei neuroni eventualmente derivati.

Negli ultimi anni abbiamo pertanto applicato sistematicamente questa tecnica di trapianto intrauterino al sistema nervoso centrale inoculando ectopicamente e/o eterocronicamente progenitori neurali ottenuti da diverse regioni del sistema nervoso al fine di ottenere informazioni riguardanti il loro stato di determinazione.

I neuroni dello strato granulare interno del cervelletto sono generati nel topo nelle prime 3 settimane della vita post natale dalla migrazione di neuroni immaturi dallo strato granulare esterno. I neuroni che migrano sono generati dalla proliferazione all'interno dello strato granulare esterno di progenitori esprimenti il gene *Math1*, che a loro volta sono generati durante la vita embrionale (E12-E15) nello strato germinativo della fossa romboidale per migrare poi sulla superficie del cervelletto in sviluppo a formare lo strato granulare esterno (4).

Se si disseziona lo strato granulare esterno dal cervelletto dagli strati più profondi sia nell'embrione, sia nell'animale postnatale, si può preparare una sospensione di precursori dei granuli cerebellari relativamente pura. Adottando quindi la tecnica del trapianto in embrione di ratto sotto controllo visivo si possono inoculare queste cellule in qualsiasi posizione del CNS. Inoculando nel CNS d'embrioni di ratto E15 una sospensione di 10 (5) cellule isolate dallo strato granulare esterno del cervelletto di topo transgenico esprimente eGFP in tutte le cellule dell'organismo e sacrificando l'animale ospite dopo la nascita a tempi diversi fino all'età adulta si nota che le cellule tendono a disperdersi nel tessuto nervoso dell'ospite senza particolare preferenza per il tessuto cerebellare formando in alcuni casi aggregati (cluster) dove le cellule si mantengono mitoticamente attive per

almeno qualche settimana dopo il trapianto. Riguardo al fenotipo acquisito dalle cellule trapiantate esso è prevalentemente quello di un granulo cerebellare maturo e questo indipendentemente dalla regione extracerebellare dell'encefalo in cui si è integrato (5). La conferma del raggiungimento di una differenziazione in senso appropriato alla regione di provenienza delle cellule indipendentemente dal microambiente ectopico cui sono continuamente sottoposto *in vivo* è venuta dalla dimostrazione del mRNA codificante per la proteina RU49 tipico dei neuroni granulari e della subunità 6 del recettore per il GABA.

Risultati diversi si sono ottenuti trapiantando nel CNS precursori neuronali isolati dalla superficie cerebellare d'embrioni E12 degli stessi transgenici di topo usati come donatori per le cellule post-natali. Anche in questo caso le cellule trapiantate si sono integrate facilmente in sedi extracerebellari ma non sono stati trovati granuli in localizzazioni extracerebellari con l'eccezione delle cellule integrate nella porzione dorsale del tronco una regione con caratteristiche di sviluppo e neuroanatomiche molto simili a quelle del cervelletto (6). Quando però la stessa sospensione di cellule prelevate dalla superficie del cervelletto embrionale fosse invece impiantata *in vitro* in colture organotipiche di strutture telencefaliche con lo stesso grado di differenziazione di quelle presenti nei ratti ospiti al momento del trapianto *intra-utero* si notava la differenziazione di granuli cerebellari anche in assenza di qualsiasi struttura cerebellare nelle sezioni ospite (5). In conclusione questi esperimenti indicano la possibilità che precursori dei granuli siano determinati a dare origine ad un fenotipo granulare ben prima di andare incontro all'ultima divisione mitotica anche se almeno *in vivo* sono necessari fattori permissivi presenti in sufficiente quantità solo in regioni derivate embriologicamente dalla porzione dorsale del tronco dell'encefalo (cervelletto, nucleo cocleare dorsale) perchè possano sopravvivere.

La presenza di precursori neuronali proliferanti ma il cui fato è già determinato ed insensibile alle manipolazioni del microambiente è dimostrabile anche in strutture del CNS esterne al romboencefalo. Durante lo sviluppo del telencefalo i neuroni che andranno a comporre i nuclei dei gangli della base derivano dalla proliferazione di cellule contenute nelle eminenze gangliari mediale e laterale. I neuroni gabaergici di dimensioni medie ricchi di spine dendritiche (MSN, medium spiny neurons) costituiscono circa il 95% dei neuroni dello striato e sono generati nel ratto a partire da E14 fino al 1 giorno della vita post-natale. Se i precursori neuronali contenuti nell'eminenza gangliare laterale di un embrione di ratto E14 vengono dissociati e trapiantati come sospensione di singole cellule nel CNS di feti di ratto E15-E16 queste cellule sono capaci di integrarsi e sopravvivere anche al di fuori di strutture di origine telencefalica quali per esempio il midollo oblungato ed il ponte (7). Come nel caso dei progenitori dei granuli cerebellari, anche i progenitori striatali possono integrarsi come cellule isolate o come aggregati (clusters) composti da centinaia - migliaia di cellule derivate dal donatore. Studiando la presenza di marcatori striatali tipici dei MSN come le fosfoproteine ARPP-21 e DARP-32 si nota che una quota preponderante delle cellule presenti negli aggregati, anche se al di fuori del telencefalo, esprimono questi marcatori (7).

Questo suggerisce che i progenitori striatali, benché ancora proliferanti, siano già determinati in quanto una volta trapiantati ed esposti ad un microambiente diverso da quello telencefalico sono in grado di riaggregarsi in strutture ectopiche con caratteristiche anatomiche ed immunofenotipiche del tutto analoghe a quelle trovate nei gangli della base.

Lo stesso comportamento e cioè, differenziazione in senso appropriato per l'origine e non la sede del trapianto, è stato recentemente dimostrato per precursori neuronali derivati dalla neocorteccia⁸. Anche queste cellule d'origine telencefalica, sempre trapiantate come sospensione di singole cellule possono integrarsi singolarmente o formare aggregati nel tessuto ospite, invariabilmente le cellule contenute negli aggregati si differenziano in accordo con il loro comportamento nella sede d'origine e non con quello della regione ectopica in cui sono state trapiantate (8).

Anche trapiantando precursori neuronali che provengono da strutture originatesi da placodi al di fuori della placca neurale, quali i precursori neuronali presenti nella mucosa olfattiva dell'embrione e dell'adulto, si possono trovare esempi di progenitori neuronali proliferanti ma già determinati. Infatti, è stato dimostrato che quando queste cellule sono trapiantate all'interno del CNS embrionale di ratto E15 le cellule trapiantate possono sopravvivere integrandosi nel tessuto sia come cellule singole, che apparentemente acquisiscono caratteristiche peculiari al tessuto dell'ospite in cui si sono localizzate, sia riunendosi a formare aggregati all'interno dei quali le stesse cellule si differenziano con caratteristiche tipiche dei neuroni olfattivi quali lo sviluppo di cilia recettoriali, l'espressione di proteina marcatore delle cellule olfattive (olfactory marker protein, OMP) tanto da formare un epitelio con caratteristiche simili a quelle della mucosa olfattiva (9).

Queste conclusioni comuni a precursori neuronali proliferanti non hanno solo importanza per la biologia dello sviluppo ma hanno implicazioni per l'avanzamento delle terapie cellulari del sistema nervoso centrale. Infatti, la tendenza dei precursori neuronali ad aggregarsi spontaneamente dopo il trapianto e a differenziare in accordo con la loro origine invece che con la sede in cui sono stati trapiantati, è vera sia nel caso dei trapianti in embrione che in adulti. Per questo anche nelle applicazioni cliniche la diffusione delle cellule trapiantate a coprire completamente il territorio afflitto dalla malattia rappresenta ancora un importante problema che si accentua nell'uomo per le elevate dimensioni delle strutture bersaglio e per il limite nel numero di tracce effettuabili con le canule per l'impianto stereotassico senza aumentare troppo il rischio ulteriore di danno meccanico al tessuto cerebrale o il rischio di sanguinamento (10).

Bibliografia essenziale

1. Magrassi L. Vision-guided technique for cell transplantation and injection of active molecules into rat and mouse embryos. *Methods Mol Biol.* 2002; 198: 327-40.
2. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997; 407: 313-9.

3. Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 2625-35.
4. Ben-Arie N, Bellen HJ, Armstrong DL, McCall AE, Gordadze PR, Guo Q, Matzuk MM, Zoghbi HY. Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature.* 1997; 390: 169-72.
5. Carletti B, Grimaldi P, Magrassi L, Rossi F. Specification of cerebellar progenitors after heterotopic-heterochronic transplantation to the embryonic CNS in vivo and in vitro. *J Neurosci.* 2002; 22: 7132-46.
6. Mugnaini E. GABA neurons in the superficial layers of the rat dorsal cochlear nucleus: light and electron microscopic immunocytochemistry. *J Comp Neurol.* 1985; 235: 61-81.
7. Magrassi L, Ehrlich ME, Butti G, Pezzotta S, Govoni S, Cattaneo E. Basal ganglia precursors found in aggregates following embryonic transplantation adopt a striatal phenotype in heterotopic locations. *Development.* 1998; 125: 2847-55.
8. Carletti B, Grimaldi P, Magrassi L, Rossi F. Engraftment and differentiation of neocortical progenitor cells transplanted to the embryonic brain in utero. *J Neurocytol.* 2004; 33: 309-19.
9. Magrassi L, Graziadei PP. Lineage specification of olfactory neural precursor cells depends on continuous cell interactions. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996; 96: 11-27.
10. Magrassi L. Multipotent neuroepithelial stem cell differentiation: some caveats for future clinical applications. *Funct Neurol.* 2001; 16: 29-34.

Plasticità delle cellule staminali neurali

Angelo Vescovi

Istituto Scientifico Universitario San Raffaele, Milano

Che cosa sono

Sembra incredibile che l'enorme varietà di forme, dimensioni e competenze che si ritrova tra le cellule dei vari tessuti di un organismo derivi da un unico tipo cellulare "primordiale", una sorta di "antenato cellulare comune". Stiamo parlando delle cellule staminali embrionali, cioè di quelle cellule che, pur contenendo tutte le informazioni genetiche necessarie per dar origine a qualunque cellula dell'organismo adulto e per dirigere il loro organizzarsi in tessuti, organi ed apparati, sono assolutamente indifferenziate, prive di qualunque "specializzazione" di tipo strutturale o funzionale.

«Le cellule staminali embrionali, presenti solo nell'embrione di pochi giorni sono le uniche cellule veramente "totipotenti", capaci cioè di dare effettivamente origine a tutti i tipi di cellule presenti nell'organismo. Le cellule staminali embrionali degli animali e dell'uomo possono essere isolate e coltivate in laboratorio. In opportune condizioni di coltura, possono proliferare per diversi anni e produrre un gran numero di cellule sempre uguali tra loro, e sempre assolutamente indifferenziate e totipotenti. Se, ad un certo punto si vuole ottenere una cellula della pelle, del cuore o del sangue, "basta" esporre un gruppetto di cellule staminali embrionali a particolari sostanze in grado di dirigerne il differenziamento nella direzione desiderata e attendere che le cellule inizino a dividersi. Ogni cellula staminale iniziale allora, dividendosi, darà origine a due cellule figlie, una ancora staminale totipotente, l'altra indirizzata verso una particolare via di differenziamento.

Ma le cellule staminali non sono solo queste. Ne esistono, infatti, almeno altri due tipi di cellule staminali: le staminali fetali e le staminali somatiche adulte.

«Le prime si trovano sempre nell'embrione, ma uno stadio di sviluppo più avanzato delle staminali embrionali vere e proprie. Queste cellule sono ancora in grado di moltiplicarsi rapidamente, ma sono un pò più specializzate rispetto alle staminali embrionali e non possono dar origine proprio a tutti i tipi di cellule presenti nell'organismo. Si dice, quindi, che sono "pluripotenti", ma non "totipotenti". Anche queste cellule, isolate dall'embrione e poste in coltura possono essere

mantenute in laboratorio per alcuni anni e, se necessario, indotte a differenziarsi. Le cellule staminali somatiche adulte, invece, come dice il nome, sono presenti nei tessuti degli animali adulti, uomo compreso. Queste cellule sono ad un livello di differenziamento decisamente più avanzato rispetto alle cellule staminali embrionali e alle staminali somatiche embrionali, ma non sono completamente specializzate per svolgere una certa funzione e mantengono ancora una certa capacità di dar origine a tipi cellulari differenti. I ricercatori, però, non sono ancora riusciti a stabilire i limiti di questa potenzialità residua». Per esempio, si sa da tempo che nel midollo osseo, esistono cellule staminali somatiche adulte capaci di dar origine ai globuli rossi, ai linfociti, alle piastrine, alle cellule della cartilagine e delle ossa, o che negli strati più profondi della pelle esistono altre cellule staminali adulte, capaci di differenziarsi in cellule dell'epidermide. Si sa, cioè, che le cellule staminali adulte presenti in un certo tessuto sono in grado di differenziarsi in tutti i tipi cellulari tipici di quel tessuto. Negli ultimi anni, però, ci sono sempre maggiori evidenze che una cellula staminale adulta di un certo tessuto, isolata e coltivata in laboratorio in opportune condizioni, può essere indirizzata verso vie di differenziamento diverse». Il che significa, per esempio, che una cellula staminale presente nel cervello adulto può essere indotta a svilupparsi in una cellula muscolare o in una cellula del sangue, anziché in una cellula nervosa. I ricercatori hanno chiamato questo fenomeno "transdifferenziamento". Quindi, finché le cellule staminali adulte sono confinate all'interno del loro tessuto originario, la loro unica possibilità è di differenziarsi in cellule di quel tessuto. Ma se vengono prelevate e coltivate in laboratorio, il loro destino sarà dettato non tanto dalla loro origine embrionale, quanto dai segnali biochimici che si ritrovano nell'ambiente.

A cosa servono

Le cellule staminali adulte possono essere considerate "cellule di riserva", serbatoi da cui i tessuti del nostro corpo possono attingere per sostituire le cellule troppo vecchie, o troppo usurate per continuare a svolgere la loro funzione. Su queste cellule si basano, quindi, il rinnovamento fisiologico dell'organismo e la possibilità di riparare danni che determinano una perdita di materiale organico, come un'abrasione o un'ulcera.

Fino ad una decina di anni fa, si riteneva che la possibilità di rinnovarsi non fosse una caratteristica comune a tutti i tessuti dell'organismo. Il tessuto nervoso, per esempio, era considerato un tessuto non rinnovabile. In pratica, si riteneva che i neuroni presenti alla nascita potessero crescere, svilupparsi, invecchiare e morire, ma mai, in nessun caso, essere sostituiti. Questo perché nel cervello non erano mai state trovate cellule staminali. Adesso, però, sappiamo che non è così. Nel 1992, infatti, sono stati trovati piccoli serbatoi di cellule staminali anche in alcune zone molto profonde e ben delimitate, in corrispondenza dei ventricoli cerebrali. Quindi, anche se raramente e solo in alcune parti del cervello, il processo di sostituzione e rinnovamento può avvenire. Ed è una scoperta di non poco conto perché apre la strada a nuove, straordinarie possibilità terapeutiche.

Prospettive terapeutiche e difficoltà attuali

Se si considerano contemporaneamente la possibilità del cervello di rinnovare i propri neuroni a partire dalle cellule staminali e quella di produrre queste cellule staminali in laboratorio, viene spontaneo pensare di poter utilizzare le cellule staminali coltivate in laboratorio per riparare i danni indotti da malattie degenerative del sistema nervoso, come il morbo di Parkinson, l'Alzheimer, la sclerosi multipla o la sclerosi laterale amiotrofica. Ma le potenzialità delle cellule staminali sono ancora più ampie, perché lo stesso approccio potrebbe essere utilizzato anche per sostituire cellule in altri organi e, quindi, anche per curare patologie come il diabete, dovuto alla morte delle cellule delle isole pancreatiche che producono l'insulina, o riparare i danni apportati al tessuto cardiaco da un'ischemia o da un infarto. Questo nel caso si isolassero cellule staminali da questi tessuti/organi.

Con le cellule staminali cerebrali si aprirebbe anche la possibilità del trapianto autologo, o autotrapianto, eliminando molti dei problemi di compatibilità immunologica o di rigetto. Di conseguenza non sarebbe più necessaria la terapia immunosoppressiva, indispensabile invece nel caso di trapianto di cellule da un donatore estraneo. Il problema è che, per esempio, per curare le malattie degenerative del sistema nervoso bisogna prelevare le cellule staminali dal cervello, farle crescere in coltura e reimpiantarle nel cervello del paziente nella zona giusta. È un lavoro che si sta già facendo negli animali, a livello sperimentale, ma è tutt'altro che semplice e l'esito è ancora da verificare. A maggior ragione questo è vero per l'uomo, che dovrà attendere ancora qualche anno, probabilmente non pochissimi, prima di poter usufruire di queste tecniche.

Lo studio delle cellule staminali offre anche l'occasione di approfondire la conoscenza dei meccanismi di differenziamento cellulare, aprendo la strada allo sviluppo di strategie terapeutiche di "riparazione minimamente invasiva" estremamente interessanti. «Le cellule staminali adulte potrebbero, infatti, essere indotte a differenziarsi somministrando *in situ* i segnali biochimici capaci di indirizzarle verso la forma desiderata. Le sostanze in questione verrebbero, cioè, iniettate direttamente in un serbatoio di cellule staminali presente in un certo tessuto del paziente, senza il bisogno di prelevarle, trattarle in laboratorio e poi reinserirle nel "posto" giusto. Questo approccio potrebbe essere molto utile per curare malattie come il morbo di Parkinson, la sclerosi multipla ed altre ancora. Nel caso del Parkinson, per esempio, le cellule staminali già presenti nel cervello della persona malata potrebbero essere indotte a differenziarsi e a rimpiazzare quelle degenerate della *substantia nigra*, con una semplice iniezione. È bene ribadire, però, che oggi queste sono solo tecniche in fase sperimentale. Per poterle applicare in ambito clinico è necessario capire tutti i passaggi del processo di differenziamento e individuare tutti i fattori capaci di influenzarlo».

Comunque, in questo contesto, sono stati recentemente fatti passi da gigante. In particolare, nell'Aprile del 2003, il nostro gruppo, in collaborazione con quello diretto da Gianvito Martino, sempre del San Raffaele, ha dimostrato l'enorme potenziale terapeutico delle staminali cerebrali nel contesto dello sviluppo di cure innovative per la sclerosi multipla. Nel dettaglio:

La sclerosi multipla è una malattia neurologica altamente invalidante che colpisce milioni di persone in tutto il mondo.

Attualmente, in Italia, i pazienti con sclerosi multipla sono circa 50 mila, a cui si aggiungono ogni anno circa 1.800 nuovi casi. L'esordio si registra preferenzialmente nella fascia d'età che va dai trenta ai 50 anni. La causa esatta della sclerosi multipla è tutt'ora sconosciuta. Si sa che dipende dall'instaurarsi di eventi infiammatori che portano alla distruzione della guaina mielinica, il materiale gelatinoso che riveste i nervi e che è essenziale per la corretta trasmissione degli stimoli nervosi. La mielina funziona da isolante, più o meno come il rivestimento dei cavi elettrici, e quando viene distrutta dalla malattia le cellule nervose non riescono più a comunicare tra loro né con gli organi periferici, in particolare con i muscoli. Nei pazienti affetti da sclerosi multipla, la progressiva distruzione della mielina in varie aree del cervello e del midollo spinale determina l'accumularsi di handicap psico-fisici gravi e permanenti.

Le uniche terapie sviluppate fin'ora sono indirizzate a contrastare la reazione infiammatoria e si basano principalmente sulla somministrazione di farmaci immunosoppressori e immunomodulanti. Questo approccio ha, però, un'utilità e un'efficacia limitate e può rallentare l'evoluzione nella malattia solo se questa viene colta nelle fasi precoci. Poco o nulla può fare, invece, negli stadi più avanzati né per riparare i danni già presenti. Inoltre, non andando ad agire sulla causa del disturbo, non è una terapia risolutiva.

La nostra sperimentazione, condotta in roditori affetti dalla forma sperimentale di sclerosi multipla, ha dimostrato come le cellule staminali cerebrali, una volta iniettate per via endovenosa o intracerebrale, sono in grado di raggiungere selettivamente le aree del cervello e del midollo spinale colpite dal processo infiammatorio-demielinizzante e di ricostruire la mielina che in queste aree è danneggiata. Per di più la ricostruzione è rapida (richiede circa un mese dall'iniezione di cellule) e si esplica soprattutto quando le staminali vengono iniettate dopo l'insorgenza della malattia. La nuova mielina riesce a riavvolgere in maniera appropriata i nervi denudati dalla sclerosi, determinando il ripristino della normale conduzione degli impulsi da parte dei nervi danneggiati.

Il risultato è stato che i topi paralizzati dalla malattia dopo un mese dal trattamento hanno ricominciato a camminare.

L'elemento innovativo dello studio è stata la dimostrazione che semplicemente iniettando in un vaso sanguigno periferico, nel nostro caso a livello della coda del topo, le cellule staminali cerebrali adulte si ottiene una ricostruzione, sia anatomica sia funzionale, della guaina mielinica in più aree danneggiate del sistema nervoso. E, soprattutto, che in poco tempo si assiste ad un significativo miglioramento della malattia, sia dal punto di vista clinico sia neurofisiologico. La ragione per cui le cellule staminali cerebrali adulte si comportano in questo modo sembra essere legata alla loro particolare natura. Infatti, normalmente queste cellule risiedono nel cervello adulto dove svolgono funzioni di mantenimento dell'integrità del tessuto cerebrale. Non è chiaro il motivo per cui le cellule staminali che già si trovano nel cervello dei topi malati non riescano di per sé a riparare le lesioni. L'ipotesi più probabile è che la cronicità dell'evento infiammatorio, tipico

della sclerosi multipla, possa esaurire con il tempo la riserva naturale di staminali cerebrali.

Inoltre, il meccanismo con cui queste cellule raggiungono le aree danneggiate del sistema nervoso e le riparano, dopo iniezione in vena, è legato alla presenza sulla loro superficie di molecole di adesione. Queste ultime funzionano da “sensori del danno”: percepiscono i segnali di pericolo inviati dalle cellule nervose lesionate dalla sclerosi multipla e indirizzano le staminali nelle zone da riparare. Ciò significa che le cellule staminali iniettate si localizzano e si attivano solo su richiesta, cioè solo quando è presente la reazione infiammatoria indotta dalla malattia. In condizioni di scarsa infiammazione le cellule staminali non fanno nulla, come se sapessero che non c'è bisogno di loro. Non è un dettaglio da trascurare: in questo modo, il nuovo approccio terapeutico è potenzialmente in grado di agire in modo mirato nelle fasi avanzate della malattia, per le quali oggi non si hanno rimedi a disposizione.

Infine, le cellule staminali iniettate hanno dimostrato di essere in grado, non solo di determinare una riparazione diretta del danno, creando nuova mielina, ma anche di influenzare le capacità autoriparative del tessuto malato in cui si integrano. Normalmente, il tessuto cerebrale danneggiato reagisce ai trattamenti cicatrizzando la zona colpita: ciò significa che la parte di cervello interessata viene irrimediabilmente persa. Quando si iniettano le cellule staminali, invece, la cicatrizzazione viene inibita in favore dell'attivazione delle cellule ancora vitali presenti nel cervello dell'animale malato. Queste ultime iniziano così a produrre mielina e moltiplicarsi, contribuendo alla riparazione del danno.

Non sappiamo ancora se la cura, per ora sperimentata solo su topi da laboratorio, darà risposte paragonabili anche nell'uomo. È interessante, però, notare che per la prima volta abbiamo a che fare con una terapia che ripara anziché danneggiare, come invece avviene nel caso delle terapie immunosoppressive attualmente utilizzate, indirizzate a indebolire la reattività del sistema immunitario. Inoltre è un approccio terapeutico che, contrariamente ai farmaci, agisce in modo naturale perché sfrutta le normali capacità riparative delle cellule staminali, limitando così gli effetti collaterali. Anche se i presupposti ci sono tutti, la strada da percorrere è lunga. La prossima tappa sarà la sperimentazione sulle scimmie sulle quali verranno utilizzate cellule staminali prelevate dal tessuto cerebrale umano, che fortunatamente sono già disponibili. Se questa fase ci porterà ai risultati sperati, potremo passare alle prime sperimentazioni sull'uomo, ma sarà necessario attendere non meno di altri cinque anni. Non resta che avere pazienza, dunque, e un pizzico di ragionevole speranza.

Le cellule staminali, per ora, ci stanno facendo intravedere soluzioni terapeutiche impensabili fino a qualche anno fa, ma non danno ancora solide garanzie di affidabilità. Al di là dell'entusiasmo per le nuove scoperte, quindi, ci si deve sempre ricordare che serve tempo per passare dai laboratori di biologia ai reparti di un ospedale.

Differenziazione di midollo osseo umano adulto in cellule muscolari scheletriche

Davide Soligo, Patrizia Bossolasco

Centro Trapianti di Midollo Osseo, IRCCS Ospedale Maggiore, Milano

Base di partenza scientifica

Numerosi lavori riportano dati riguardanti la plasticità delle cellule staminali da midollo osseo (capacità di differenziare in tipi cellulari diversi dal tessuto d'origine) sia *in vitro* che *in vivo*. In particolare, il trapianto di midollo *in toto* per via sistemica in animali letalmente irradiati o l'iniezione di cellule direttamente nel muscolo danneggiato portano all'attecchimento di cellule muscolari di origine ematopoietica. Oltre al midollo *in toto*, per questi esperimenti sono state utilizzate popolazioni selezionate per markers di superficie o caratteristiche funzionali. I tipi cellulari utilizzati si possono suddividere in due principali categorie:

← cellule mesenchimali (MSCs) ottenute per aderenza su plastica:

Nel 1976, Friedenstein (1) dimostra che una piccola frazione di cellule presenti nel midollo osseo che aderisce sul fondo di una piastra di coltura, possiede caratteristiche di multipotenzialità essendo in grado di differenziare in osteoblasti, condrociti e adipociti. Nel 1995 Wakitani (2) differenzia, benché sporadicamente e con bassa efficienza, MSCs di ratto in muscolo scheletrico *in vitro* usando la 5-azacitidina, un analogo della citidina noto per indurre ipometilazione del DNA e quindi probabilmente in grado di attivare geni specifici. La 5-azacitidina è stata recentemente utilizzata con buoni risultati anche su particolari precursori multipotenti (MAPCs) da Reyes et al. (3). Nel 1999, Phinney et al. (4) ottengono sempre *in vitro*, cellule muscolari da MSCs dopo trattamento con amfotericina-B. Il potenziale miogenico delle MSCs è stato parzialmente dimostrato anche *in vivo* (5, 66).

← cellule emopoietiche CD45+:

Cellule muscolari scheletriche possono essere ottenute *in vivo* anche dalla frazione non aderente del midollo. Ferrari et al. (5-7) dimostrano la rigenerazione muscolare di fibre galatossidasi positive derivanti da topi donatori transgenici MLC3F-lacZ dopo il trapianto direttamente in muscolo sia di midollo *in toto* che della sua frazione non aderente. Il muscolo danneggiato è inoltre in grado di

richiamare cellule a potenziale miogenico dal circolo sanguigno. Infatti, se il midollo di topi MLC3F-lacZ viene trapiantato in topi letalmente irradiati, si osservano nel muscolo del topo ricevente fibre galattosidasi positive. Il potenziale miogenico delle cellule CD45+ è stato riconfermato da diversi autori (8) utilizzando anche sottopopolazioni di cellule emopoietiche selezionate per caratteristiche di staminalità. Una popolazione di cellule staminali emopoietiche dette “side population” (SP) fenotipicamente Sca-1+, c-Kit+, CD45+ e caratterizzate da un’elevata capacità di estrarre il colorante vitale Hoechst 3042 (9) se trapiantata in topi irradiati contribuisce alla rigenerazione muscolare (10) anche a livello di singola cellula (11). Diversi studi riportano inoltre, dopo trapianto sia di midollo in toto (5, 12, 13) che di cellule da SP (12) in topi mdx, la formazione di fibre muscolari da donatore distrofina positive.

Tuttavia, rimangono ancora molti punti da elucidare nello studio della plasticità delle cellule emopoietiche in senso muscolare:

o L’individuazione di una cellula midollare multipotente rimane controversa. Non è stato identificato nessun marcatore che caratterizzi in modo inequivocabile un precursore miogenico nel midollo osseo.

o La maggioranza dei dati pubblicati riguardano studi *in vivo* eseguiti nel topo. Un solo lavoro riporta dati riguardanti la presenza di fibre distrofina positive da donatore in biopsie muscolari di un paziente affetto da distrofia muscolare dopo trapianto di midollo (14).

o Esistono pochi dati *in vitro* e che prevedono essenzialmente l’utilizzo di una sostanza demetilante, la 5-azacitidina per il differenziamento miogenico.

o Mediamente, l’efficienza del trapianto di cellule emopoietiche è bassa con una percentuale di fibre muscolari tra 0.1% e 1%.

o La conversione miogenica di cellule emopoietiche potrebbe essere spiegata attraverso un meccanismo di fusione come ipotizzato per molti tessuti (15, 16). Questo fenomeno sembra avvenire solo a basse frequenze tra cellule emopoietiche e muscolari (18) (fatta eccezione per le MSCs) (17).

Scopo del lavoro

Ci si propone di

- identificare nel midollo osseo umano adulto una popolazione di cellule capaci di differenziare in senso miogenico (cellule muscolari scheletriche).
- mettere a punto una metodica di differenziamento miogenico *in vitro*.

Materiali e metodi

- Sono state utilizzate cellule midollari *in toto* ottenute da frammenti costali prelevati da 36 pazienti sottoposti a chirurgia toracica o cellule mononucleate da midollo osseo di 29 donatori per trapianti allogenici previo consenso informato.

I frammenti costali sono stati ripuliti mediante “flushing” e le cellule così ottenute seminate in fiasca. Cellule mononucleate sono state ottenute per separazio-

ne su gradiente da campioni di midollo osseo da aspirati midollari da cresta iliaca. Un numero variabile da 1 a 3×10^6 cellule per cm^2 sono state coltivate in terreno DMEM con l'aggiunta di 10% di siero fetale bovino (FCS). Settimanalmente, il surnatante delle colture è stato riseminato in una nuova fiasca e terreno fresco aggiunto alla fiasca originale. Le frazioni aderenti (A1, A2, A3) e i surnatanti (NA1, NA2, NA3) di queste colture sono stati quindi osservati al microscopio per la presenza di miotubi e analizzati, *in situ* o dopo tripsinizzazione, con metodiche immunocitochimiche, di Western Blot e Real-time RT-PCR per la presenza di marcatori muscolo specifici.

Risultati

Dall'osservazione morfologica al microscopio ottico rovesciato delle cellule coltivate è emerso che nella maggior parte delle colture, le cellule mostrano una morfologia tipicamente stromale con presenza di sporadiche cellule binucleate. In nessuno dei casi analizzati sono stati osservati miotubi nelle colture derivate dall'adesione di cellule della prima e della seconda settimana di coltura. Nelle frazioni A3 e A4 da costa e cresta iliaca sono state osservate numerose strutture multinucleate simili a miotubi nel 19.4% (7 su 36) delle coste e 3.4% (1 su 29) delle creste ilache. Quando presenti, ricoprono il 50-80% della superficie delle fiasche (Fig. 1) e risultano fortemente positive in immunocitochimica per desmin, a-sarcomeric-(a-SR) actin, M-cadherin, slow myosin heavy chain, dystrophin, N-CAM, and myogenin. L'espressione di CD90 osservata nelle cellule mononucleate è invece assente nei miotubi (Fig. 2).

Lo studio mediante **immunocitochimica** dei campioni al tempo zero e delle varie frazioni aderenti ha evidenziato i seguenti risultati:

Le cellule midollari al T0 mostravano una negatività per la presenza di marcatori specifici di cellule muscolari quali la desmina. Dall'analisi sia delle frazioni

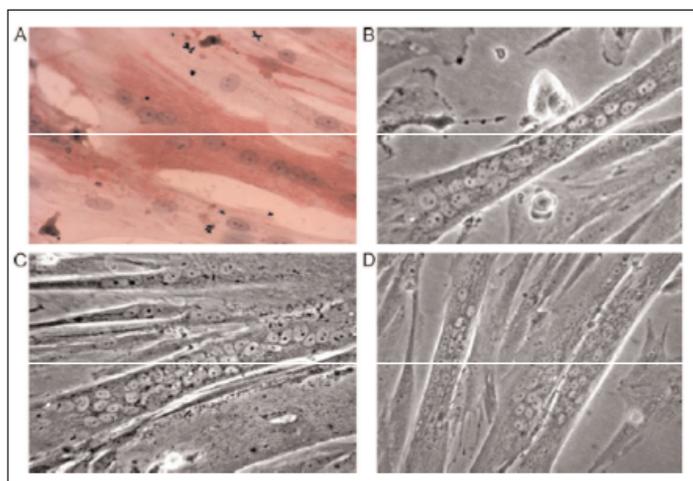


Fig. 1

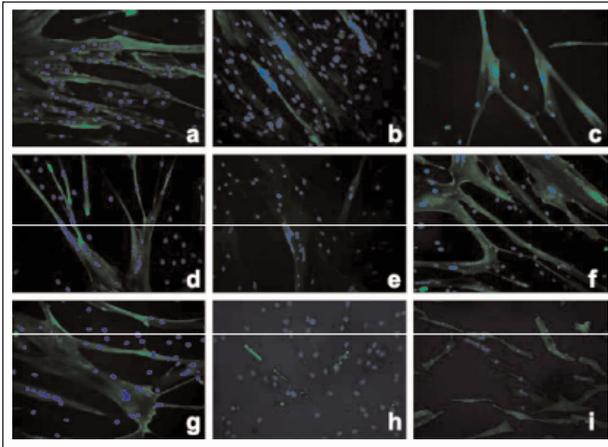


Fig. 2

aderenti che dei surnatanti si è invece riscontrata una percentuale di cellule desmina positive tra lo 0 e il 6.5% (Tab. 1 e Fig. 3).

Tab. 1

	T0	A1	NA1	A2	NA2	A3	NA3
Costa	0	6.3	0.5	6.4	0.1	0	0.2
Cresta Iliaca	0	0.5	0.05	2.2	0.025	6.5	-

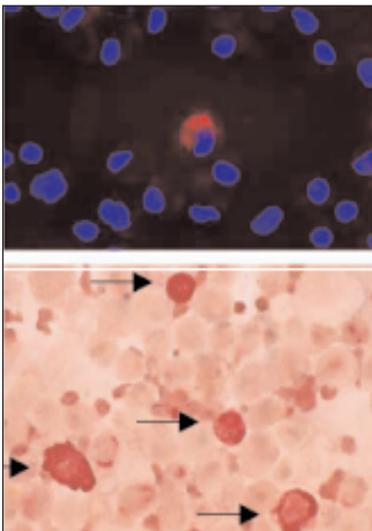


Fig. 3

L'analisi in **citofluorimetria a flusso** mostra la presenza di una piccola percentuale di cellule positive per marcatori i miogenici desmina e N-CAM al T0 coesprimenti il CD45 e un leggero aumento di queste popolazioni nella frazione NA1 rispetto al T0 (Tab. 2).

Tab. 2

Cresta Iliaca	T0	NA1	Costa	T0	NA1
CD45	85.37±7	60.27±7	CD45	71.48±24	34.34±16
CD133	1.60±0.5	0.38±0.28	CD133	1.35±0.99	0.46±0.6
CD34	1.75±0.7	0.48±0.1	CD34	1±0.43	0.18±0.18
CD14	12.46±1	17.60±5.6	CD14	5.41±1.44	3.6±1.7
N-CAM	2.3±1.64	2.62±2	N-CAM	1.45±0.9	1.03±1.3
Desmina	0.81±0.4	1.46±1.2	Desmina	0.65±0.25	1.41±1.9

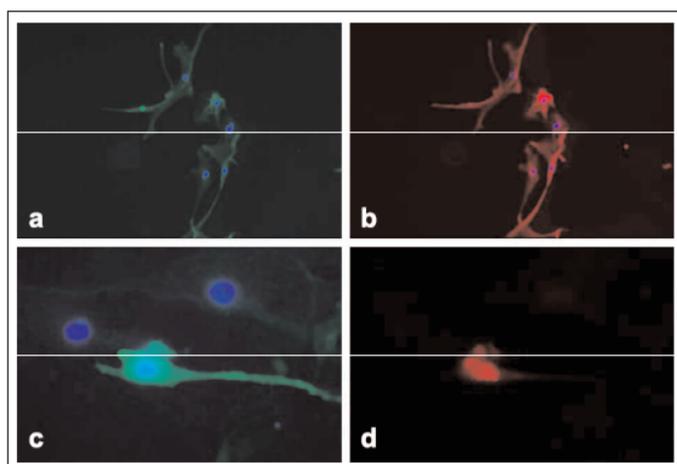


Fig. 4

Cellule mononucleate da midollo osseo adulto separate immunomagneticamente per la presenza del marcatore N-CAM hanno mostrato una doppia positività anche per desmin e Myf5 (Fig. 4).

I campioni al T0 e le frazioni NA1 sono inoltre stati analizzati mediante **Western Blot** per l'espressione dei seguenti marcatori: desmin, slow myosin heavy chain (MyHC), α -sarcomeric- (α -SR) actin (Novocastra) mostrando una certa variabilità per l'espressioni di questi marcatori tra i vari campioni analizzati (Tab. 3).

Tab. 3

		Desmina	MyHC	α -SR-actin
BM da Cresta iliaca e Costa	T0	-	-	75%
	NA1	43%	-	100%

I campioni a T0 e le frazioni non aderenti sono invece stati analizzati mediante **Real-time RT-PCR** per la presenza di Myf5, MyoD, myogenin, and desmin.

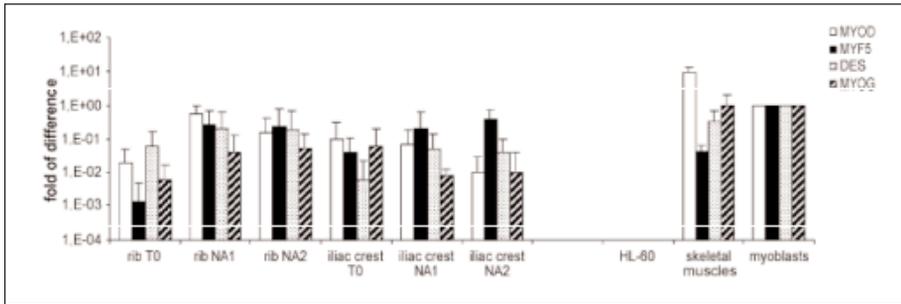


Fig. 5

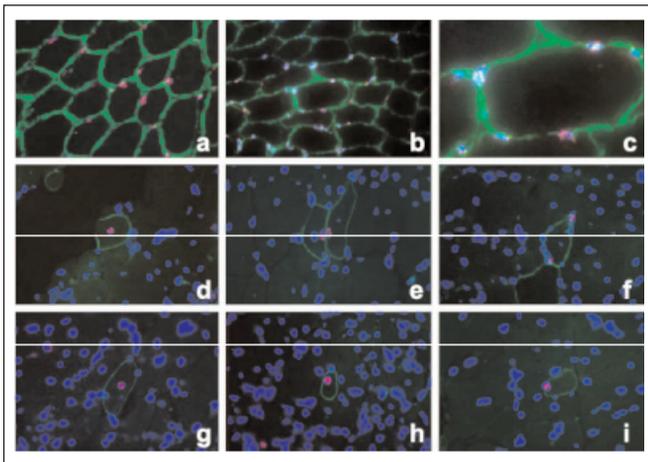


Fig. 6

Tutti campioni analizzati risultano positivi per tutti i marcatori analizzati con un aumento di 10 volte dell'espressione nelle NA rispetto al T0 (Fig. 5).

Il trapianto nella zampa tibiale anteriore di cellule midollari umane *in toto* in topi immunodeficienti (10 NOD-SCID e 12 NOD/RAG) previamente trattati con cardiotossina per indurre degenerazione muscolare ha evidenziato, a due mesi dal trapianto, la presenza di cellule muscolari derivanti da midollo osseo umano anche se in bassa percentuale (da 0.06 \pm 0.06 a 0.19 \pm 0.1) esprimenti distrofina umana e positive in FISH per la presenza di centromeri umani.

Conclusioni

Si dimostra la pre-esistenza nel midollo osseo di cellule a potenziale miogenico in grado di differenziare *in vitro* sporadicamente, ma con alta efficienza, in miotubi positivi per la maggior parte dei marcatori muscolo specifici. Da queste cellule si è ottenuta differenziazione in senso miogenico nel 20% degli esperimenti con una metodica culturale semplice e senza l'utilizzo di sostanze differenzianti (5 azacitidina, amfotericina-B, ecc...). Questa metodica di preplating, uti-

lizzata anche per la coltura di mioblasti da muscolo scheletrico, consiste nel “purificare” le cellule facendo aderire la frazione mesenchimale del midollo nei primi passaggi di coltura. Si è inoltre osservato un aumento del numero di cellule desmina e N-CAM positive co-esprimenti il CD45 nelle varie frazioni che potrebbero, per le loro caratteristiche fenotipiche, essere quelle che danno miotubi *in vitro*. I nostri dati confermano quindi l’ipotesi che le cellule a potenziale miogenico sembrano risiedere nella frazione CD45+ del midollo, in quanto viene utilizzata la popolazione cellulare che viene eliminata in una normale aderenza su plastica.

Punti ancora da chiarire

- Data l’eterogeneità delle popolazioni analizzate, non è stato possibile caratterizzare in modo preciso la popolazione a potenziale miogenico.
- Non è possibile escludere totalmente la possibilità di una contaminazione dei campioni da cellule miogeniche in particolare per quanto riguarda i campioni da costa.
- Per chiarire ulteriormente la differenziazione osservata *in vitro*, il trapianto nel topo verrà effettuato con le cellule delle varie frazioni aderenti e non aderenti. In questo modo, sarà possibile verificare se queste consentono di ottenere un’augmentata percentuale di fibre umane distrofina positive rispetto al trapianto di cellule di midollo *in toto*.

Bibliografia

1. A.J. Friedenstein, J.F. Gorskaja, N.N. Kulagina. *Exp. Hematol.* 4 (1976) 267–274.
2. S. Wakitani, T. Saito, A.I. Caplan. *Muscle Nerve* 18 (1995) 1417– 1426.
3. M. Reyes, T. Lund, T. Lenvik, D. Aguiar, L. Koodie, C.M. Verfaillie. *Blood* 98 (2001) 2615–2625.
4. D. G. Phinney, G. Kopen, R.L. Isaacson, D.J. Prockop. *J. Cell Biochem.* 72(1999) 570–585.
5. G. Ferrari, G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, F. Mavilio. *Science* 279 (1998)1528–1530.
6. G. Ferrari, F. Mavilio. *Neuromuscul. Disord.* 12 (2002) 7–10.
7. G. Ferrari, A. Stornaiuolo, F. Mavilio. *Nature* 441 (6841) (2001) 1014–1015.
8. S. Corti, S. Strazzer, R. Del Bo, S. Salani, P. Bossolasco, F. Fortunato, F. Locatelli, D. Soligo, M. Moggio, P. Ciscato, A. Prella, C. Borsotti, N. Bresolin, G. Scarlato, G.P. Comi. *Exp. Cell Res.* 277 (2002) 74– 85.
9. M.A. Goodell, K. Brose, G. Paradis, A.S. Conner, R.C. Mulligan. *J. Exp. Med.* 183 (1996) 1797-1806.
10. S.Y. Corbel, A. Lee, L. Yi, J. Duenas, T.R. Brazelton, H.M. Blau, F.M. Rossi. *Nat. Med.* 9 (2003) 1528–1532.
11. F.D. Camargo, R. Green, Y. Capetenaki, K.A. Jackson, M.A. Goodell. *Nat. Med* 12 (2003) 1520-1527.

12. E. Gussoni, Y. Soneoka, C.D. Strickland, E.A. Buzney, M.K. Khan, A.F. Flint, L.M. Kunkel, R.C. Mulligan. *Nature* 401 (1999) 390-394.
13. R.E. Bittner, C. Schofer, K. Weipoltshammer, S. Ivanova, B. Streubel, E. Hauser, M. Freilinger, H. Hoger, A. Elbe-Burger, F. Wachtler. *Anat Embryol (Berl)* 199(5) (1999) 391-396.
14. E. Gussoni, R.R. Bennett, K. R. Muskiewicz, T. Meyerrose, J.A. Nolta, I. Gilgoff, J. Stein, Y.M. Chan, H.G. Lidov, C.G. Bonnemann, A. Von Moers, G.E. Morris, J.T. Den Dunnen, J.S. Chamberlain, L.M. Kunkel, K. Weinberg. *J Clin Invest* 110 (6) (2002) 807-814.
15. N. Terada, T. Hamazaki, M. Oka, M. Hoki, D.M. Mastalerz, Y. Nakano, E.M. Meyer, L. Morel, B.E. Petersen, E.W. Scott *Nature* 416(6880) (2002) 542-545.
16. Q.L. Ying, J. Nichols, E.P. Evans, A.G. Smith. *Nature* 416(6880) (2002) 545-548.
17. D. Shi, H. Reinecke, C.E. Murry, B. Torok-Storb. *Blood*. 104 (2004) 290-294.
18. M.A. LaBarge, H.M. Blau. *Cell* 111 (2002) 589-601.

Danno tessutale e induzione di plasticità, transdifferenziazione, fusione cellulare

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia

Plasticità della cellula staminale adulta

Le cellule staminali, ivi comprese quelle ematopoietiche, non solo generano cellule appartenenti al proprio tessuto d'origine, ma sono anche in grado di differenziarsi in cellule appartenenti ad altre linee cellulari e ad altri tessuti, persino derivanti da un altro foglietto embrionale. Le condizioni che le cellule staminali debbono soddisfare per dimostrare che si sono realmente differenziate in cellule di altro tessuto possono essere così elencate: la loro origine deve essere comprovata da studi di marcatura genica ed ibridazione in situ (FISH), nessuna o scarse manipolazioni *in vitro*, acquisizione delle caratteristiche morfologiche e funzionali proprie del tessuto in cui si trovano integrate.

Particolarmente interessanti sono i risultati delle ricerche condotte nel topo da Krause et al., 2001. Le tappe di questi esperimenti comportano il trapianto di cellule midollari murine maschili Lin- marcate con PKH26 in riceventi di sesso femminile, seguito due giorni dopo il trapianto dal recupero per sorting delle cellule PKH26 positive reperibili nel midollo del ricevente, con successivo secondo trapianto di una singola cellula PKH26 positiva in 30 riceventi di sesso femminile. I risultati ottenuti dimostrano che cellule maschili (0.19-3.39%) con positività per la citocheratina erano presenti a livello dell'esofago, stomaco, piccolo e grande intestino, dotti biliari e cute, mentre nel polmone il 20% circa delle cellule presentava il cromosoma Y ed esprimeva mRNA per il surfattante B, forse per il danno indotto dalla radioterapia.

La frequenza del ritrovamento di cellule midollari del donatore in tessuti non ematopoietici del ricevente, dopo danno tessutale di vario tipo in esperimenti condotti nel topo, è riassunta in Tab. 1:

Cellula staminale	Tessuto esaminato	Danno indotto da	Frequenza	Autore
Midollo osseo	Macro e microglia	TBI	0.5-2%	Eglitis e Mezey, 1997
Midollo osseo	Muscolare	Esercizio fisico	3.55%	LaBarge e Blau, 2002
Midollo osseo	Neuroni	TBI	0.2-0.3%	Brazelton, 2000
Midollo osseo	Neuroni	TBI	0.3-2.3%	Mezey, 2000
Midollo osseo	Epatociti	TBI	2.2%	Thiese, 2000
Kit+Thy1.1ba Lin-Kit al.	Fegato	TBI+difetto genico	30-40%	Lagasse, 2000
Lin-Kit al.	Cuore/vasi	Legatura coronarie	54%	Orlic, 2001

La plasticità di cellule staminali adulte non ematopoietiche è dimostrata dai risultati di alcune interessanti ricerche sperimentali ormai non più recenti: cellule neurali murine possono ricostituire l'ematopoiesi in topi sottoposti ad irradiazione sub-letale (Bjornson et al., 1999); cellule neurali murine possono dare origine a tutti e tre i foglietti embrionali se iniettati nella morula di topo (Clarke et al., 2000); nel topo una popolazione cellulare residente nella muscolatura scheletrica possiede una potenzialità ematopoietica (Jackson et al., 1999).

Per quanto riguarda i risultati di studi condotti nell'uomo, la Tab. 3 riporta la frequenza del ritrovamento di cellule del donatore in tessuti del ricevente:

Tessuto trapiantato	Cellule del donatore ritrovate	Frequenza	Autore
Midollo osseo	Osteoblasti	1.5-2%	Horwitz, 1999
Midollo osseo	Epatociti	2.2%	Thiese, 2000
Midollo osseo	Epiteli gastro-enterici	0-4.6%	Okamoto, 2002
C. stom. circol.	Epatociti, digerente, cute	0-7%	Korbling, 2002
Cuore	Cardiomiociti, endoteli	20%, 15%	Quaini, 2002
Cuore	Cardiomiociti, endoteli	0.04%, 25%	Laflamme, 2002
Cuore	Cardiomiociti	0.2%	Meller

Induzione di plasticità, transdifferenziazione, contaminazione, fusione cellulare

Il principale induttore della plasticità cellulare è senz'altro il danno tissutale. Le cellule staminali vengono richiamate nell'area danneggiata da citochine liberatesi nella sede stessa del danno tissutale. Lo "*stromal derived factor-1*" (SDF-1 α) e il suo recettore CXCR4 svolgono in tal senso un ruolo cruciale: intervengono in modo determinante nei meccanismi di accasamento ("*homing*") della cellula staminale nel midollo osseo; gli epatociti del fegato danneggiato esprimono SDF-

1α ; la cellula ovale esprime CXCR4 ed il livello di espressione di SDF-1 α può funzionare da gradiente per il richiamo della cellula ovale stessa nell'area epatica danneggiata (Hatch et al., 2002).

La transdifferenziazione di cellule staminali già commissionate verso altre linee cellulari potrebbe essere un modello per spiegarne la plasticità. Tuttavia è da sottolineare che per quanto riguarda la cellula staminale ematopoietica la transdifferenziazione è un evento molto raro e certamente non fisiologico (Wang et al., 2003). La supposta plasticità della cellula staminale adulta potrebbe essere invece legata a una contaminazione cellulare oppure a una fusione cellulare.

Una contaminazione cellulare è possibile se si considera che le cellule staminali presenti nella muscolatura scheletrica esprimono marcatori della cellula staminale ematopoietica CD45 e Sca-1 e devono essere quindi considerate vere e proprie cellule staminali ematopoietiche, e che la loro presenza a livello muscolare o in altri tessuti non ematopoietici è solo occasionale (McKinney-Freeman et al., 2002).

La fusione cellulare consiste nell'unione del patrimonio genetico della cellula staminale ematopoietica del donatore con quello della cellula ospite specifica del tessuto danneggiato, con creazione di un'unica cellula fornita di nuovo fenotipo e nuove funzioni (Terada et al., 2002; Vassilopoulos et al., 2003). Il principale quesito a tale riguardo è quale cellula partecipa alla fusione. Non sembra sia la cellula staminale ematopoietica per molteplici motivi: la ricostituzione ematopoietica avviene prima della integrazione della cellula staminale in tessuti non ematopoietici, quando la cellula staminale ematopoietica viene direttamente iniettata nel fegato o nel muscolo non attecchisce, il danno tissutale necessario a richiamare la cellula staminale richiama anche molte cellule infiammatorie. Parecchie prove depongono invece a favore di un intervento dei macrofagi: partecipano attivamente ai processi infiammatori, oltrepassano le barriere vascolari, si annidano in tessuti non ematopoietici, sono capaci di fondersi fra loro e con altri tipi di cellule, alcuni marcatori genetici ne dimostrano la capacità di generare tessuto muscolare e tessuto epatico.

Uno dei quesiti biologici fondamentali riguardante le cellule staminali commissionate tessuto-specifiche è il seguente: sono esse contenute in vari organi e circolano nel sangue periferico? La risposta è probabilmente affermativa. Tali cellule sono identificate dalla proteina di membrana CXCR4 e vengono richiamate nel midollo osseo perché le cellule stromali producono la chemochina "*stromal derived factor-1*" (SDF-1), ligante specifico di questa proteina. Le cellule CXCR4 positive sono state definite nelle loro caratteristiche fenotipiche e funzionali: sono CD34+ e AC133+ (Sca+ nel topo); circolano nel sangue periferico in condizioni di *steady state* e possono essere mobilizzate dopo danno tissutale o dopo somministrazione di G-CSF; dal sangue periferico giungono nel midollo osseo dove trovano il miglior microambiente per la loro sopravvivenza; non essendo aderenti, e mancando dei marcatori di membrana specifici delle cellule mesenchimali, si ritiene siano diverse da queste. Gli eventi successivi al danno tissutale potrebbero quindi venir così riassunti: aumentata produzione di SDF-1 da parte del tessuto danneggiato, incremento del numero di cellule CXCR4+ nel sangue periferico,

richiamo di cellule staminali nel tessuto danneggiato per azione dell'asse SDF-1-CXCR4 (Ratajczak et al., 2004).

Studi preclinici e primi studi clinici

Le conoscenze sulla plasticità delle cellule staminali hanno portato ai primi tentativi di un loro impiego nella riparazione di danni di tessuti e organi. Alcuni esperimenti riguardano l'uso di cellule staminali ematopoietiche per rigenerare cardiomiociti. Esiste un razionale per tale impiego: le cellule staminali ematopoietiche nella sede del danno miocardico possono migliorare la vascolarizzazione differenziandosi in cellule endoteliali, possono riparare il danno differenziandosi in cardiomiociti, possono produrre citochine che prevengono la fibrosi. Esistono anche prove sperimentali che dimostrano la potenziale utilità di una tale procedura: l'iniezione di cellule ematopoietiche maschili lin^{Kit} nel topo femmina determina una rigenerazione di cardiomiociti ed un miglioramento dei parametri emodinamici (Orlic et al., 2001). I primi studi clinici investigativi condotti nell'uomo sembrano confermare queste premesse sperimentali. Infatti, l'iniezione di cellule staminali autologhe direttamente nell'area di miocardio danneggiata determinerebbe un miglioramento della sintomatologia, della perfusione miocardica e della funzionalità dell'area ischemica alla RMN 3 mesi dopo l'infarto (Tse et al., 2003), mentre l'iniezione di cellule staminali AC133+ ai bordi dell'area infartuata dopo bypass coronarico migliorerebbe la perfusione e la funzionalità cardiaca 3-9 mesi dopo l'infarto (Stamm et al., 2003).

Un argomento di particolare interesse riguarda l'impiego di cellule staminali ematopoietiche per rigenerare cellule neurali. Nell'animale da esperimento è stato dimostrato che cellule staminali midollari esprimenti una proteina transgenica, trapiantate in topi adulti dopo irradiazione corporea totale generano cellule neurali esprimenti i marcatori neurali NeuN e tubulina (Brazelton et al., 2000); lo stesso tipo di esperimento consente di ottenere a distanza di 10-15 mesi dal trapianto un basso livello di chimerismo (0.2%) a carico delle cellule di Purkinje (Priller et al., 2001). Per quanto riguarda gli studi condotti nell'uomo è da sottolineare che pazienti di sesso femminile trapiantate con midollo osseo ottenuto da donatore di sesso maschile presentano 0.025-0.05% di cellule maschili a livello di neocortex e ippocampo (Mezey et al., 2003); inoltre che in tale setting lo 0.1% delle cellule di Purkinje sono maschili, alcune però presentano un numero di cromosomi del sesso superiore a quello diploide, lasciando quindi supporre che si sia verificata una fusione cellulare tra cellule del donatore e quelle dell'ospite (Weimann et al., 2003).

Oltre a differenziarsi in cellule neurali, cellule staminali ottenute dal midollo osseo possono differenziare in oligodendrociti e sono quindi capaci di rimielinizzare particolari lesioni del tessuto nervoso, assumendo le caratteristiche fenotipiche e funzionali proprie degli oligodendrociti (in esperimenti murini la velocità di conduzione lungo l'assone è fortemente migliorata).

Cellule staminali ematopoietiche possono anche rigenerare epatociti funzionalmente attivi. Nell'animale da esperimento il trapianto di cellule staminali KTSL

(Lin⁺kit⁺Sca⁺Thy 1.1^{ba}), marcate con β -galattosidasi ed in grado di metabolizzare tirosina per azione dell'enzima fumarilacetoacetato idrolasi (FAH), in topi con deficit congenito di tale enzima ne consente la sopravvivenza anche se non viene somministrato NTC, farmaco che impedisce la degradazione della tirosina nei suoi metaboliti tossici; la sopravvivenza è possibile perché le cellule staminali del donatore si differenziano in epatociti FAN+ e β -gal+ (Lagasse, 2000). Per quanto riguarda l'uomo è da ricordare che pazienti di sesso femminile, trapiantate con midollo osseo da donatore di sesso maschile, presentano epatociti che contengono il cromosoma Y.

In conclusione, risulta evidente che il sistema delle cellule staminali adulte è molto più flessibile di quanto sino ad ora ritenuto, particolarmente in condizioni di stress tessutali. Abbiamo appena incominciato a capire che cellule staminali circolanti nel sangue possono agire non solo come distributrici di progenitori ematopoietici, ma anche come sistematici fornitori di progenitori staminali che partecipano all'omeostasi dei vari organi e tessuti, e quindi capaci di riparare danni tessutali non-ematopoietici. Il potenziale terapeutico di questa acquisizione è straordinariamente vasto.

Bibliografia essenziale

1. Abkowitz J.L. Can human hematopoietic stem cells become skin, gut, or liver cells? *N. Engl. J. Med.* 346, 770, 2002.
2. Anderson D.J., Gage F.H., Weissman I.L. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat. Med.*, 7, 393, 2001.
3. Camargo F.D., Chambers S.M. Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion. *Cell Prolif.* 37, 55, 2004.
4. Daley G.Q., Goodell M.A., Snyder E.I. Realistic prospect for stem cell therapeutics. *Hematology*, 398, 2003.
5. Körbling M., Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept? *N. Engl. J. Med.* , 349, 570, 2003.
6. Krause D., Theise N.D., Collector M.I. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105, 369, 2001.
7. Medvinsky A., Smith A. Fusion brings down barriers. *Nature*, 422, 823, 2003.
8. Ratajczak M.Z., Kucia M., Reza R. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells "hide out" in the bone marrow. *Leukemia*, 18, 29, 2004.
9. Rosenthal N. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N. Engl. J. Med.*, 349, 267, 2003.

STUDI PRECLINICI

Muscle regeneration by bone marrow-derived progenitors

Giuliana Ferrari

HSR-Telethon Institute for Gene Therapy, IRCCS H.S. Raffaele, Milano

Adult skeletal muscle fibers harbor mononucleated quiescent precursor cells called satellite cells. These cells are located along the muscle fibers, between the sarcolemma and the basement membrane, and contribute myonuclei to growing fibers during postnatal growth and to regenerating fibers after tissue injury. Satellite cells are also capable of self-renewal, but their number, which is highest in post-natal muscle, decline with age. During adult life, satellite cells remain quiescent and once they become activated by injury they start to express myogenic regulatory factors similarly to muscle precursors during skeletal muscle development. Until recently, the identification and the isolation of satellite cells was quite difficult, since it was based on electron microscopy detection. The discovery of proteins differently expressed by satellite cells and myofibers, allowed to identify these cells and to study their functional behaviour. There are evidence that satellite cells are a heterogenous population and, following injury, some proliferate before either differentiating into muscle or replenish the satellite pool, and other directly fuse with damaged muscle without proliferating. Implantation of normal muscle precursors was shown to give rise to satellite cells that are capable of contributing to regeneration following subsequent muscle damage. However, muscle formation from implanted muscle precursors does not efficiently occur, probably due to massive death of the donor cells shortly after transplantation. Therefore, the transplantation of muscle precursors for the treatment of myopathies is hampered by the intrinsic biological features of these cells.

The first demonstration of non-canonical differentiation of adult stem cells (SC) came from studies showing that bone marrow (BM) -derived cells participate to the repair of damaged muscle upon transplantation into irradiated recipient mice. Subsequent reports have shown that BM-derived cells or stem cell-containing fractions are recruited to myogenic differentiation and restore dystrophin gene expression in a murine model of dystrophin-deficient (Duchenne) muscular dystrophy. The origin of the BM-derived myogenic cells and their physiological role, if any, in the homeostasis of the muscle tissue, are ill-defined yet. The exist-

tence of a circulating myogenic progenitor derived from the BM is not predicted on the basis of classic embryology, which ascribes to somites the origin of all skeletal myogenic cells. One possibility is that BM-derived myogenic cells originate from multipotent, mesenchymal stem cells (MSC) located in the BM stroma. MSC were shown to give rise to bone, cartilage, and connective tissue upon transplantation into recipient mice, but recruitment to myogenesis has never been observed *in vivo*. Indeed, clonal analysis of human BM-derived MSC showed that their differentiation potential is limited to the adipocytic, chondrocytic, and osteocytic lineages. A second population of MSC has been recently derived from murine BM cultures. These cells give rise to hematopoietic and epithelial cells, but not to muscle fibers, upon transplantation into irradiated recipients. On the other hand, transplantation of purified hematopoietic cell fractions indicate that cells endowed with myogenic potential *in vivo* derive from the hematopoietic rather than the stromal fraction of the BM. However, it remains to be defined whether SC directly or their differentiated progeny are recruited to the muscle and induced to myogenic differentiation, and whether HSCs transdifferentiate into a muscle-specific stem/progenitor cell (e.g., a satellite cell), as indicated in a recent study or directly into a terminally differentiated progeny, i.e., the muscle fiber. This remains a debated issue, since single hematopoietic stem cell transplantation failed to reveal contribution to muscle fibers through a mononuclear myogenic intermediate. A better definition of the cells capable of changing fate in response to regeneration signals, as well of the signals themselves, is therefore needed to fully understand the blood-to-muscle transition. Expansion and active recruitment to myogenic differentiation of transplantable hematopoietic cells are in fact critical factors for a possible use in cell/gene therapy of muscular dystrophy.

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is due to the total or partial deficiency of dystrophin, a component of the multi-protein complex linking the cytoskeleton of the muscle fiber to the extracellular matrix. In the absence of dystrophin, the complex is functionally impaired, and the mechanical stress associated with contraction progressively leads to degeneration of skeletal muscle fibers, muscle wasting, progressive impairment of movements, and eventually paralysis and death. In the first phases of the disease, new muscle fibers are formed by fusion of resident myoblasts, or satellite cells. Once the proliferation potential of these cells is exhausted, the skeletal muscle is replaced by connective tissue. The current therapeutic approaches to DMD involve pharmacological control of inflammation, which achieve beneficial effects but have no impact on the life expectancy of the patients. Gene therapy of DMD is based on the concept of providing a copy of a normal dystrophin cDNA to muscle fibers or satellite cells, *in vivo* or *ex vivo*. A number of different strategies have been developed, ranging from injection of dystrophin-expressing viral or non-viral vectors to transplantation of autologous, genetically modified myoblasts. However, delivery of vectors or genetically modified myoblasts to a large number of muscles is very inefficient, a major hurdle currently limiting both *ex vivo* and *in vivo* approaches. The availability of a cell population that could be engineered and then systemically deliv-

ered to a large number of muscles would be an invaluable tool for the development of a cell-mediated replacement therapy. The discovery that transplantable, BM-derived cells may give rise to muscle tissue under certain experimental circumstances has obviously raised much hope for a new form of cell-based therapy of DMD.

From a clinical point of view, the studies on the dystrophic mice (*mdx*) were a disappointment. They showed that after BM transplantation less than 0.5% of the muscle fibers of the recipient mice are reconstituted by a donor cell source, with no practical impact on the murine pathology. The implication of these findings is that either the efficiency of the myogenic conversion is too low to be practically useful, or that the *mdx* background does not provide enough differentiation stimuli, or selective advantage, to hematopoietic cells to trigger their expansion and ultimately a significant replacement of the resident muscle cells. In fact, one might argue that despite the dystrophin defect, the *mdx* mouse does not develop a dystrophic clinical phenotype (the musculature of these animals is actually hypertrophic), and that *mdx* satellite cells are perfectly capable of regenerating muscle for the entire animals life span. In this respect, the *mdx* model does not reproduce the clinical picture of human DMD, where the repair potential of muscle satellite cells is lost in the first years of life, and where muscle degeneration gives rise to fibrosis rather than repair. It remains therefore possible that in DMD patients dystrophin-positive fibers made by transplanted BM progenitors might have a selective advantage, resist degeneration, and progressively replace the dystrophin-negative ones.

The most critical issue, however, is whether BM-derived cells with myogenic potential exist in humans, and how can we assay for their abundance, plasticity, and clinical potential. These are difficult questions to answer, since *in vitro* assays were so far unsatisfactory even for HSC. Injection into the muscle of immunodeficient mice would allow to test for the muscle-forming capacity of human BM cells, but not for their self-renewing capacity and recruitment through the peripheral circulation. Immunodeficient mouse strains that allow maintenance and expansion of very early human blood progenitors are indeed available (e. g., the NOD/SCID mice), but do not allow complete differentiation into all the hematopoietic progenies, and are most likely unsuited for the analysis of even more complex phenomena such as recruitment and differentiation of non-myogenic progenitors. More sophisticated human/mouse chimeras need to be developed for this specific purpose, while other pre-clinical models, such as non-human primates, need to be tested to get as close as possible to the human situation. Unfortunately, real animal models of muscular dystrophy do not currently exist, or are very expensive (dystrophic dogs) and still remotely related to the human situation. Given the very primitive knowledge of the biology of human BM-to-muscle transition, it is clearly too early to think about therapeutic transplantation in muscular dystrophy patients. Nevertheless, a consistent ethical framework to carry out human trials need to be developed, together with a consensus as to what type of knowledge should be gained from animal models before it becomes reasonable to start asking questions in a clinical setting.

References

1. Morgan JE., Partridge TA. Muscle satellite cells. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 2003; 35: 1151-56.
2. Zammit PS., Beauchamp JR. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation.* 2001; 68: 193-204.
3. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998; 279: 1528-30.
4. Bittner RE., Schofer C., Weipoltshammer K., Ivanova S., Streubel B., Hauser E., et al. Recruitment of bone marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat. Embryol.* 1999; 199: 391-96.
5. LaBarge MA., Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell.* 2002; 111: 589-601.
6. Gussoni E., Soneoka Y., Strickland CD., Buzney EA., Khan MK., Flint AF., et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* 1999; 401: 390-4.
7. Tajbakhsh S., Cossu G. Establishing myogenic identity during somitogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1997; 7: 634-41.
8. Pereira RF., Halford KW., O'Hara MD., Leeper DB., Sokolov BP., Pollard MD., et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92(11): 4857-61.
9. Pittenger MF., Mackay AM., Beck SC., Jaiswal RK., Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284: 143-7.
10. Ferrari G., Mavilio F. Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy? *Neuromuscular Disorders.* 2002; 12: S7-S10.
11. Camargo FD., Green R., Capetenaki Y., Jackson KA., Goodell MA. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nature Med.* 2003; 9: 1520-27.
12. Ye M, Iwasaki H., Laiosa CV., Stadtfeld M., Xie H., Heck S., et al. Hematopoietic stem cells expressing the myeloid lysozyme gene retain long-term, multilineage repopulation potential. *Immunity.* 2003; 19 :689-99.
13. Nawrotzki R., Blake DJ., Davies KE. The genetic basis of neuromuscular disorders. *Trends Genet.* 1996; 12: 294-8.
14. Emery AEH. *Duchenne Muscular Dystrophy.* Vol. 24: Oxford Medical Publications; 1993.
15. Marshall DJ., Leiden JM. Recent advances in skeletal-muscle-based gene therapy. *Curr Opin Genet Dev.* 1998; 8: 360-5.
16. Partridge TA., Davies KE. Myoblast-based gene therapies. *Br. Med. Bull.* 1995; 51: 123-37.

Quali cellule staminali somatiche per riparare un danno miocardico?

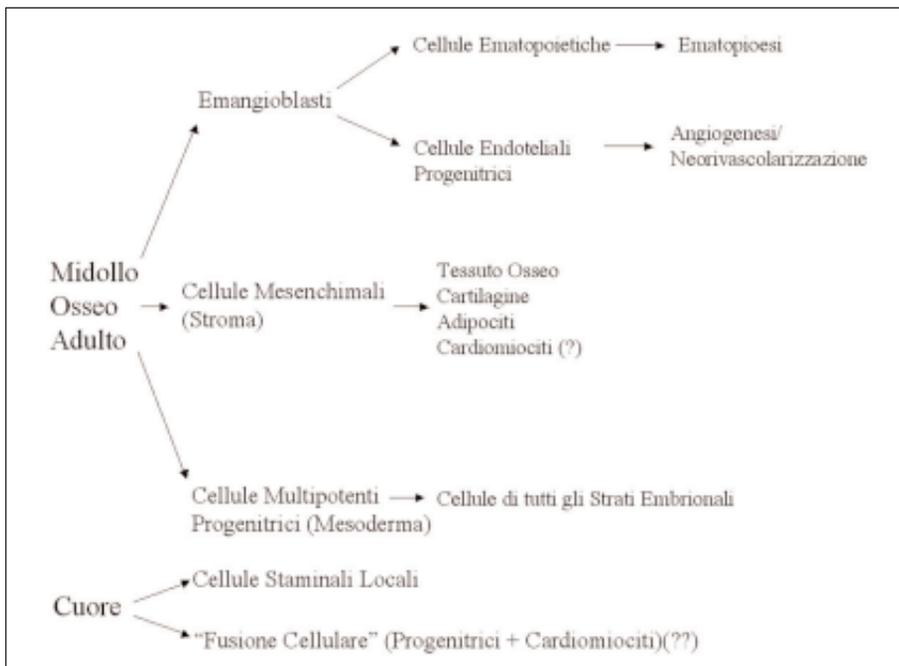
Roberto Lorusso e Giuseppe de Cicco

Laboratorio di Cardiocirurgia Sperimentale - Unità Operativa di Cardiocirurgia,
Azienda Spedali Civili, Brescia

Il trapianto cellulare rappresenta l'ultima frontiera nell'ambito del trattamento delle patologie cardiache. Dal primo lavoro apparso nel 1995 che ha documentato le potenzialità del trapianto di miocellule autologhe periferiche da parte di Chiu e collaboratori (1), innumerevoli tecniche, tipi di cellule, patologie trattate, e tecniche di impianto hanno rappresentato un campo di ricerca estremamente innovativo ed affascinante (2, 3). Il percorso investigativo e di ricerca nel settore del trapianto cellulare indica a chiari linee le modalità e gli obiettivi degli sperimentatori e, soprattutto, le speranze che tale campo ha creato e, a volte, non mantenuto. L'intento primordiale dei ricercatori era quello di ripopolare zone di tessuto miocardio irreversibilmente danneggiato (vedi infarto miocardio acuto). L'obiettivo principale, quindi, era di fornire una nuova popolazione di cellule funzionalmente attive e capaci di ripristinare la contrattilità assente o depressa a causa del sopraggiunto danno ischemico. La scelta di utilizzare cellule miocitiche scheletriche non è stata quindi casuale, in quanto rimpiazzare tessuto miocardio muscolare con altre cellule con la stessa capacità funzionale apparve alquanto ovvio (1). Le differenze intrinseche legate alle diverse caratteristiche fenotipiche e di aggregazione cellulare, le possibili insorgenze di effetti collaterali legati alla presenza di cellule impiantate, ma scarsamente ambientate, e le opzioni fornite da altre cellule potenzialmente in grado di potersi trasformare nella "cellula obiettivo" ha condotto i ricercatori a percorrere strade alternative. L'esperienza nell'ambito del trapianto midollare in ematologia ha da tempo dimostrato l'estrema versatilità e plasticità delle cellule staminali, le uniche, apparentemente, in grado per loro stessa natura di cellule pluripotenti, di percorrere le linee differenziative verso l'obiettivo cellulare e tissutale prescelto (2, 3).

E' noto che il corpo umano possiede in distretti specifici alcuni tipi di cellule con proprietà e capacità di differenziarsi verso peculiari fenotipi cellulari. Vi sono, comunque, cellule con maggiori potenzialità o capacità di trasformazione, o comunque in grado di dar origine a ceppi di maggiore importanza funzionale nel campo cardiovascolare (Schema). Le cellule stromali, altrimenti definite cellule staminali mesenchimali, e le cellule staminali del mesoderma, potenzialmente in

rado di riprodurre linee cellulari di tutti e tre gli strati embrionali, sono attualmente le cellule staminali con la maggiore capacità differenziativa e, quindi, maggiormente appetibili per l'eventuale applicazione nel trattamento di patologie cardiovascolari. Il vantaggio dell'utilizzo di cellule staminali è apparso ai ricercatori evidente: la possibilità di trasformazione fenotipica con acquisizione delle capacità funzionali dell'organo "riparato", la mancanza di immunogenicità di tali cellule, la disponibilità pressoché illimitata del materiale cellulare, e la possibilità di programmazione dell'intervento terapeutico in modo elettivo e ripetitivo. La domanda che è sorta da tali presupposti era legata se realmente esisteva tale possibilità da parte delle cellule staminali di colonizzare e rigenerare tessuto miocardico muscolare danneggiato o disfunzionante o, comunque, favorire un recupero funzionale in presenza di patologie acute o croniche. Nel 2001 Orlic ha dimostrato, in un modello animale di infarto miocardico acuto, che la somministrazione nella zona perinfartuale di cellule staminali tipo c-kit⁺ a nove giorni dall'episodio ischemico conduceva alla formazione di miociti eGFP⁺, a neoangiogenesi, ed al recupero funzionale cardiaco (4). Successivamente, lo stesso gruppo di ricercatori ha dimostrato che le cellule staminali potevano essere anche attivate e colonizzare la zona infartuate "da riparare" mediante la somministrazione di fattori stimolanti e favorenti il rilascio a livello midollare delle cellule stesse con colonizzazione dell'area bersaglio (SDF-1, G-CSF, VEGF), o attirando presso la sede danneggiata le cellule staminali circolanti mediante recettori appro-



Schema delle varie popolazioni o processi inerenti il contributo delle cellule staminali per la riparazione e rigenerazione tissutale miocardica.

priati (5). La capacità delle cellule staminali di poter essere d'aiuto nell'ambito del trattamento di patologie cardiache è stata, quindi, esaminata con maggiore attenzione, nella speranza di discriminare se tali cellule erano in grado di poter riprodurre o rigenerare sia il tessuto muscolare, quello vascolare, o entrambi. Alcuni studi hanno dimostrato l'aumento delle cellule staminali circolanti dopo danno d'organo, suggerendo che tale situazione rappresenti lo stimolo al rilascio ed alla colonizzazione della zona colpita da parte delle cellule staminali autologhe. Gli studi sperimentali a livello cardiaco, oltre all'incremento delle cellule staminali circolanti, hanno documentato che tali cellule erano in grado di favorire la formazione di nuovo tessuto muscolare, con evidenze istologiche che richiamavano le caratteristiche dei miociti fetali sia in dimensione che a livello fenotipico. Sono stati inoltre documentati anche nuove arteriole e capillari, indicando che una possibile linea di differenziazione fosse rappresentata dal sistema vascolare. Alcuni studi recentemente hanno comunque avanzato l'ipotesi che le cellule staminali deputate alla riparazione e colonizzazione cardiaca potessero provenire anche da fonti locali (6), sia interne che esterne (epicardio) (7).

Il contributo della colonizzazione da parte di cellule esterne al miglioramento della qualità e funzione tissutale è stato da alcuni rivisitato, adducendo la possibilità che le cellule impiantate o pervenute nel tessuto da fonti esterne possano andare incontro a fenomeni di "fusione cellulare" con le cellule presenti, ma la rilevanza di tale fenomeno è ancora sconosciuta (8).

Appare, comunque, evidente che le cellule staminali, sia mobilizzate che impiantate abbiano la capacità a livello cardiaco di dare origine a linee cellule varie, con riscontri di tessuto muscolare scheletrico, endoteliale, o tessuto muscolare liscio. Rimane ancora oscuro quali cellule staminali siano le dirette responsabili della differenziazione nei differenti ceppi cellulari o se tali cellule siano anche già presenti a livello cardiaco. Alcuni ricercatori, tuttavia, hanno dimostrato una certa limitazione delle cellule staminali di origine midollare attraverso tecniche di marcatura genetica, e tali studi hanno evidenziato come cellule midollari progenitrici a livello delle zone infartuali e/o cicatriziali miocardiche andavano incontro a limitati processi di differenziazione, con ridotta ripopolazione di cellule miocitiche, mantenendo in modo predominante la linea cellulare ematopoietica (9, 10). Al contrario, in uno studio recente, Agbulut e collaboratori hanno dimostrato come la inoculazione di cellule staminali CD133⁺ nella zona infartuate in un modello animale forniva effetti funzionali ed istologici comparabili all'impianto di mioblasti di origine muscolare scheletrica (11). L'apparente contraddittorietà di tali risultati, se cioè la cellula staminale midollare sia in grado o meno di transdifferenziarsi verso un fenotipo muscolare, rimane ancora irrisolta, ma i dati disponibili, sia a livello clinico che sperimentale, sembrano suggerire che le cellule staminali progenitrici circolanti o midollari siano maggiormente indirizzate verso uno sviluppo ematopoietico e, quindi, favorente una neoangiogenesi, con limitata azione a livello di formazione di neo-miociti cardiaci. Potrebbe risultare invece maggiore il contributo delle cellule locali, attivate cioè in sede dal danno indotto, sia esso ischemico o di altra natura, ma anche tale teoria richiede ulteriori e più convincenti verifiche (12).

Studi Clinici

In ambito clinico l'applicazione delle cellule staminali ha coinvolto diversi campi d'intervento e di scelta di cellule da impiantare. Alcune esperienze sono state indirizzate al trattamento di danno cardiaco acuto (infarto) utilizzando diversi tipi di cellule staminali, situazione ripetuta anche nell'ambito del trattamento di condizioni croniche, sia legate alla presenza di cardiomiopatia ischemica che idiopatica.

Riparazione di danno miocardico acuto

In tale ambito dati significativi sono stati presentati dal gruppo di Francoforte che ha recentemente pubblicato i risultati del trial denominato TOPCARE-AMI che prevedeva la somministrazione in random di cellule staminali midollari versus cellule progenitrici circolanti attraverso la via intracoronarica in seguito ad infarto miocardico acuto (13). Tale studio clinico ha documentato che a 4 mesi dalla procedura la somministrazione di cellule progenitrici circolanti favoriva un maggiore recupero contrattile, migliorava la funzione segmentaria a livello dell'area infartuate e riduceva significativamente il diametro telediastolico nei pazienti trattati. Inoltre, tale studio ha documentato, mediante l'esecuzione di perfusione coronarica e di valutazione della vitalità cellulare nelle zone trattate che l'impianto di cellule staminali circolanti favoriva una migliore rivascolarizzazione e vitalità cellulare nelle aree sottoposte al trattamento. Rimane, comunque, ancora da stabilire se tali effetti positivi verranno mantenuti nel tempo.

Strauer e collaboratori hanno utilizzato cellule staminali di origine midollare in un gruppo di pazienti randomizzato a seguito di infarto miocardico acuto, ed anche in questo caso la somministrazione cellulare consentiva un recupero funzionale ed una riduzione dell'area infartuate (14).

La possibilità di utilizzare fattori che favorissero il rilascio di cellule staminali (citochine) per riparare un danno miocardico acuto è stato investigato da Seiler che ha utilizzato il fattore GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) in pazienti affetti da malattia coronarica e non suscettibili di rivascolarizzazione tradizionale (15). In tale studio la somministrazione intracoronarica e sistemica in 21 pazienti randomizzati e sottoposti a somministrazione quotidiana per 2 settimane, si è assistito ad un miglioramento della perfusione miocardica, al contrario del gruppo di controllo, suggerendo la formazione di neocollaterali. Risultati positivi sono stati riportati da altri investigatori nell'ambito del trattamento dell'infarto miocardico acuto con cellule staminali (16).

Nella maggior parte degli studi clinici la somministrazione di cellule staminali progenitrici si è dimostrata sicura e fattibile. Ultimamente, un segnale di attenzione, nell'ambito dell'uso associato di fattori stimolanti (G-CSF), è stato trasmesso da alcuni ricercatori che hanno registrato alcuni eventi negativi (alta incidenza di ristenosi intra-stent) (17). Altra possibile complicanza, anche se non è mai stata registrata in ambito clinico, è caratterizzata dalla comparsa di microinfarti a seguito della somministrazione intracoronarica di cellule staminali (18). Le esperienze ancora limitate in ambito clinico, comunque, non sembrano indicare

che tali eventi siano un reale pericolo, ma tale possibilità o evenienza richiederà sicuramente ulteriori accertamenti.

Riparazione di danno miocardico cronico

Il razionale del trapianto cellulare a livello cardiaco in presenza di patologia cronica riveste un significato diverso. La somministrazione di cellule staminali può ovviamente avere diversi obiettivi: od il miglioramento in presenza di miocardiociti disfunzionanti in seguito all'attecchimento di cellule staminali differenziate in miociti cardiaci, l'induzione di neoangiogenesi, importante soprattutto nelle aree di ischemia cronica (miocardio ibernato), o la combinazione dei due meccanismi. Il ripristino funzionale di aree acinetiche postinfartuali, ove non sussiste possibilità di rivascularizzazione tradizionale, anche per il trattamento di angina intrattabile per eventi ischemici ripetuti, avrebbe un impatto significativo nella pratica clinica.

Zehier e collaboratori hanno documentato risultati promettenti nell'ambito del recupero funzionale cardiaco in pazienti affetti da cardiomiopatia postinfartuale e trattati con somministrazione di cellule progenitrici circolanti (19)

Recentemente, Perin e collaboratori hanno documentato i risultati ottenuti in 20 pazienti affetti da cardiomiopatia ischemica e sottoposti in modo randomizzato a somministrazione endocardica di cellule staminali mononucleate (20). In tale studio il gruppo di pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ha mostrato un significativo miglioramento del difetto di perfusione miocardica valutato con la SPECT, come migliorata è risultata anche la capacità funzionale (maggiore consumo di ossigeno nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo). Tuttavia, nessuna modifica è stata dimostrata a livello della funzione contrattile globale cardiaca.

Stamm e collaboratori hanno documentato la ripresa contrattile significativa in alcuni pazienti trattati con impianto di cellule staminali in associazione a bypass aortocoronarico (21). In 4 pazienti il recupero contrattile era associato ad un significativo miglioramento della perfusione miocardica, controllata con SPECT, ma i risultati di tale studio devono essere considerati con cautela data la contemporanea effettuazione di rivascularizzazione chirurgica.

In conclusione, i dati attualmente in possesso derivanti da studi sperimentali e clinici suggeriscono che le cellule staminali rappresentano una potenziale risorsa terapeutica. Il trapianto di cellule autologhe, o la mobilitazione con molecole stimolanti il rilascio midollare, rappresentano alcune delle attuali modalità di applicazione. Quali siano le sottopopolazioni cellulari staminali responsabili o fautrici di un innesto efficace, o se la capacità plastica e di trasformazione di tali cellule sia più legata all'organo che al tipo e sistema di attivazione delle cellule stesse, sono punti ancora irrisolti e che necessitano di ulteriori ricerche. La capacità intrinseca del miocardio di autorigenerarsi rappresenta un ulteriore elemento in via di definizione, ma è alquanto evidente che l'apporto di cellule staminali locali potrebbe essere determinante nel processo di riparazione cardiaca.

E' comunque chiaro che le cellule staminali hanno la capacità di dare origine alla

rigenerazione tissutale in senso completo, dalla componente muscolare, a quella vascolare, ed è verosimile che il milieu tissutale e le condizioni cliniche generali o tissutali locali giochino un ruolo critico nell'efficacia o modalità di colonizzazione cellulare o nell'espressione ed attivazione della popolazione staminale locale. Gli studi in corso probabilmente riusciranno a chiarire se esistano tipologie di pazienti più sensibili per una terapia con un determinato ceppo cellulare o se la patologia trattata, acuta o cronica, con o senza fattori adiuvanti, rappresenteranno i fattori critici per la riuscita o risposta cellulare più appropriata, ma pare evidente che ci si trovi di fronte ad una frontiera epocale nell'ambito della medicina cardiovascolare.

Bibliografia

1. Chiu RCJ., Zibaitis A., Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 12-8.
2. Weisel RD., Li RK., Mickle DAG., Yau TM. Cell transplantation comes of age. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121: 835-6.
3. Taylor DA. Cell-based myocardial repair. How should we proceed ?. *Int J Cardiol* 2004;95(Suppl 1):S8-S12.
4. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-5.
5. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-9.
6. Quaini F., Urbanek K., Graiani G., et al. The regenerative potential of the human heart. *Int J Cardiol* 2004; 95(Suppl I): S26-S28.
7. Wessels A., Perez-Pomares JM. Te epicardium and epicardially derived cells as cardiac stem cells. *Anat Res* 2004; 276: 43-57.
8. Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo JM., et al. Fusion of bone marrow-derived cardiomyocytes with purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; 425: 968-73
9. Balsam LB., Wagers AJ., Christensen JL., Kofidis T., Weissman IL., Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature h.
10. Murry CE, Soonpa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 644-8.
11. Agbulut O., Vandervelde S., Al Attar N., Larghero J., et al. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133⁺ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 458-63.
12. Mathur A., Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004; 364: 183-92.
13. Assmus B., Schachinger V., Teupe C., et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Circulation* 2002; 106: 3009-17.
14. Strauer BE., Brehm M., Zeus T., et al. Repair of infarcted myocardium by

- autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-8.
15. Seiler C., Pohl T., Wustmann K., et al. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony – stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 2001; 104: 2012-17.
 16. Wollert KC., Meyer GP., Lotz J., Ringes-Lichtenberg S., Breindenbach C., Fichtner S., Korte T., Hornig B., Messinger D., Arseniev L., Hertenstein B., Ganser A., Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-48.
 17. Kang HJ., Kim HS., Zhang SY., Park KW., Cho HJ., Koo BK., Kim YJ., Lee DS., Sohn DW., Han KS., Oh BH., Lee MM., Park YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751-6.
 18. Vulliamy PR., Greely M., Halloran SM., MacDonald KA., Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004; 363: 783-4.
 19. Dimmeler S., Zeiher AM. Wanted! The best cell for cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 464-5.
 20. Perin EC., Dohmann HFR., Borojevic R., et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004; 110(Suppl II): II-213-II-218.
 21. Stamm C., Westphal B., Kleine HD., et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-6.

Neuroprotezione e rimielinizzazione

Gianvito Martino

Istituto Scientifico Universitario San Raffaele, Milano

Infiammazione e neurodegenerazione

Sebbene il riscontro di un danno assonale nella SM risalga alle storiche osservazioni di Charcot, l'impatto di questo fenomeno nel corso della malattia è stato rivalutato solamente negli ultimi anni (1, 2). Gli studi basati su metodiche di risonanza magnetica (spettroscopia, magnetization transfer, misurazione dell'atrofia) hanno permesso di quantificare la perdita neuro-assonale e stabilire che essa è diffusa anche nella sostanza bianca apparentemente normale, non risparmia la sostanza grigia e si manifesta precocemente nel corso della malattia (3, 4).

La perdita assonale acuta predomina nelle lesioni delle fasi precoci della SM e diminuisce nel tempo (5). Gran parte del danno assonale è riscontrabile in aree caratterizzate da un importante infiltrato di linfociti, macrofagi e microglia attivata, indicando uno stretto rapporto con il processo infiammatorio (6).

A tutt'oggi, i meccanismi che portano alla degenerazione assonale nella SM rimangono oscuri e ancora non disponiamo di marcatori biologici affidabili (7). Si ipotizza un ruolo delle sostanze neurotossiche prodotte dall'infiltrato infiammatorio come i neurotrasmettitori eccitotossici (per esempio, glutammato e N-metil-D-aspartato – NMDA), alcune proteasi, l'ossido nitrico (NO) e il tumor necrosis factor (TNF) (8). In alcune lesioni, infine, il danno tissutale sembra realizzarsi con meccanismi simili all'ipossia (9). Tutti questi fattori attivano una serie di eventi a cascata che si concludono con l'accumulo intracellulare di ioni Calcio e l'attivazione di proteasi calcio-dipendenti che portano alla morte neuronale.

Alcuni Autori hanno dimostrato nei pazienti con SM la presenza di anticorpi diretti contro antigeni assionali (10-13): quest'ultima ipotesi suggerirebbe che la degenerazione assonale è un processo indipendente dalla demielinizzazione. Tuttavia, oltre al danno assonale acuto, vi è evidenza anche di una degenerazione assonale secondaria alla demielinizzazione sia all'interno delle lesioni, sia nella sostanza bianca apparentemente normale. Gli assoni denudati del rivestimento mielinico sarebbero più suscettibili alla degenerazione in quanto privati del supporto trofico degli oligodendrociti, un'ipotesi supportata dal riscontro che gli assoni rimielinizzati sono protetti da ulteriori insulti lesivi (5). La degenerazione

assonale secondaria potrebbe manifestarsi anche a causa di ripetuti attacchi demielinizzanti che indeboliscono il potenziale riparativo degli oligodendrociti o esauriscono la disponibilità di precursori oligodendrogliali (OPCs), cioè delle cellule addette al processo di rimielinizzazione (14). Nella SM primariamente progressiva si sospetta addirittura un difetto primitivo del potenziale rimielinizzante degli oligodendrociti (15): questo dato ridarebbe sostegno all'ipotesi che la SM sia una patologia degenerativa primaria che genera una risposta infiammatoria secondaria.

In sintesi: infiammazione, demielinizzazione e riparazione tissutale (rimielinizzazione inclusa) sono caratteristiche della fase remittente della malattia. Con il graduale estinguersi di questi processi, durante la fase cronico-progressiva secondaria, i fenomeni degenerativi assionali prendono il sopravvento mentre nella forma progressiva primaria sembrano addirittura prevalere sin dall'esordio.

Infiammazione e neuroprotezione

Con la rivalutazione della componente neurodegenerativa nella SM, il concetto di neuroprotezione è divenuto un obiettivo primario delle nuove strategie terapeutiche. Un trattamento neuroprotettivo può essere definito come un intervento che arresta o rallenta la progressione di malattia tramite la protezione, il recupero o il ripristino del degli assoni degenerati.

Alcuni dei farmaci inizialmente utilizzati in patologie neurodegenerative classiche come la sclerosi laterale amiotrofica, sono stati testati anche nella SM. Il Riluzolo, per esempio, sperimentato in un trial pilota nella SM primariamente progressiva, ha fornito incoraggianti risultati sulla perdita assonale visibile alla RMN (16). Molti degli agenti neuroprotettivi dimostratisi assai promettenti nei modelli animali di malattie neurodegenerative (per esempio: antagonisti dei canali ionici, antagonisti dei recettori dell'NMDA o dei recettori del GABA-A, modulatori dei derivati dell'NO, chelanti dei radicali liberi, agenti anti-apoptotici etc.) si sono poi rivelati fallimentari nella patologia umana. Nella SM il discorso è reso ancora più complicato dalla necessità di combinare l'attività neuroprotettiva con gli effetti delle terapie immunomodulanti, cercando nel contempo di preservare l'azione potenzialmente neuroprotettiva dell'infiammazione.

Il ruolo dell'infiammazione nel sistema nervoso centrale (SNC), infatti, è più complesso di quanto precedentemente noto ed include una componente protettiva oltre che dannosa. Recentemente, con l'individuazione dei linfociti T-regolatori (CD4⁺CD25⁺) è stato introdotto il concetto di "autoimmunità protettiva" (179, tuttavia non conosciamo ancora gli esatti meccanismi molecolari o i fattori locali (entrambi probabilmente correlati sia alla natura e persistenza di segnali di pericolo sia al substrato genetico del soggetto) che regolano i differenti aspetti dell'infiammazione durante la demielinizzazione immuno-mediata (18). Per esempio, T-linfociti "protettivi" possono produrre potenti fattori neurotrofici per contrastare l'azione di citochine pro-infiammatorie quali IFN- γ e TNF- α (17).

Alcune citochine sono responsabili della degenerazione neuronale nella SM e, di converso, altre possono essere neuroprotettive. IL-10 (una citochina in grado di

inibire la sintesi di $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$), per esempio, migliora l'outcome neurologico dopo un danno del SNC e protegge i neuroni dal danno ischemico ed eccitotossico (20). Il ruolo della $IL-1b$ è ancora controverso: da una parte, come già ricordato, avrebbe un'azione deleteria, dall'altra sarebbe in grado di promuovere la rimielinizzazione inducendo la sintesi di IGF-1 (vedi Tab. 1) [21].

Altre sostanze con proprietà sia immunomodulanti che neuroprotettive, potenzialmente utili nella SM, includono i ligandi delle immunofiline quali Ciclosporina, Tacrolimus e Sirolimus (22), antibiotici della famiglia delle tetracicline come la Minociclina (23) e le statine ipolipemizzanti come Simvastatina, Lovastatina e Mevastatina (24).

E' interessante ricordare come i trattamenti immunomodulanti attualmente disponibili per la cura della SM possano avere anche proprietà neuroprotettive. L'IFN- β , tra gli innumerevoli suoi effetti, limita l'ingresso di leucociti nel SNC e sembra correggere la carenza di $IL-10$ propria dei malati con SM (25), mentre il Glatiramer Acetato (GA) genera linfociti Th2 GA-specifici di tipo regolatorio, in grado di entrare nel SNC e ridurre l'infiammazione in questo distretto, grazie al loro profilo antinfiammatorio. Semplificando molto, questi due farmaci possono considerarsi neuroprotettivi nella SM in quanto rimuovono l'infiammazione nel SNC. Se una risposta immunitaria alterata porta alla perdita di assoni, oligodendrociti e, verosimilmente, anche di neuroni, come suggerito dalla co-localizzazione di fenomeni infiammatori e neurodegenerativi (6), l'utilizzo di immunomodulanti diventa una strategia ragionevole per conferire neuroprotezione nella SM. Questi farmaci, inoltre, potrebbero avere anche un effetto neuroprotettivo diretto. L'IFN- β diminuisce l'espressione della NO-sintasi, e quindi la produzione di NO, uno dei radicali liberi coinvolti nei processi neurodegenerativi, mentre le linee T-linfocitarie GA-specifiche inducono *in vitro* la produzione di BDNF (26) (vedi fattori di crescita e Tab. 1). L'espressione clinica di questo effetto neuroprotettivo potrebbe essere rappresentata dalla riduzione della percentuale di lesioni che alla RMN evolvono in "buchi neri" (27), espressione di un danno irreversibile.

Se la neuroprotezione costituisce senz'altro la nuova frontiera nel trattamento della SM, è ugualmente certo che, per sviluppare nuovi farmaci, abbiamo bisogno di comprendere meglio i meccanismi responsabili della perdita assonale e neuronale e di individuare marcatori biologici e outcome clinici validi, correlabili ai processi neurodegenerativi di questa malattia.

Fattori di crescita

L'apporto di fattori trofici a sostegno degli oligodendrociti e della mobilitazione, crescita e maturazione dei loro precursori è considerato un promettente approccio per promuovere il fisiologico processo di rimielinizzazione (28). Numerosi studi hanno portato alla identificazione di una serie di molecole che, singolarmente o in associazione, promuovono la migrazione, differenziazione e sopravvivenza di OPCs. Queste sostanze includono i membri delle famiglie delle neurotrofine, i fattori di crescita insulin-like, i fattori di crescita derivati dalle pia-

Tabella 1 Caratteristiche e proprietà dei principali fattori di crescita cellulare di rilevanza nelle neuroscienze

Famiglia	Caratteristiche	Fattore di crescita	Proprietà specifiche
Neurotrofine	Prodotte da neuroni e infiltrati infiammatori; Antagonizzano l'att. infiammatoria della microglia;	Nerve growth factor (NGF) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Neurotrophin-3 (NT-3) Neurotrophin-4/5 (NT-4/5)	Protegge gli Ol dall'apoptosi indotta da TNF- α <i>in vitro</i> . Protegge dall'EAE. Normale o aumentato nel liquor di SM Protegge gli Ol da lesioni del midollo <i>in vivo</i> Aumentato nelle lesioni da SM Sopravvivenza e proliferazione degli Olp Sopravvivenza e proliferazione degli Olp
IGF	Sintesi epatica	Insulin-like growth factor-1	Proliferazione e differenziazione degli Olp Aumentato nelle lesioni di EAE e SM. Promuove la rimielinizzazione nell'EAE Protegge gli Ol immaturi dall'apoptosi da glutammato e da agenti demielinizzanti Testato clinicamente nella SM con risultati negativi (dosi insufficienti?)
PDGF	Interazione con la matrice extracellulare	Platelet-derived growth factor	Migrazione, sopravvivenza e proliferazione degli Olp Livelli cerebrali correlabili con accumulo di Olp dopo demielinizzazione
FGF	Attivi in embriogenesi, cicatrizzazione, emopoiesi, angiogenesi	Fibroblast-derived growth factors (aFGF, bFGF + altri 21 membri)	Coinvolti nel processo di mielinizzazione Migrazione e proliferazione degli Olp (bFGF) Blocco della maturazione degli Olp tramite espressione dei recettori PDGF (bFGF) Protezione dall'EAE con reclutamento di Olp nelle lesioni demielinizzanti (bFGF)
Neuropeptine	Citochine pleiotropiche	Interleukin-6 (IL-6) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) Leukemia inhibitory factor (LIF)	Coinvolta in neurodegenerazione e neuroprotezione Modula la risposta di astrociti e microglia dopo danno cerebrale Sopravvivenza, proliferazione e maturazione degli Olp. Differenziazione astrociti Protegge gli Ol dall'apoptosi indotta da TNF- α e IFN- γ SM più precoce e grave in pazienti con mutazione <i>null</i> del gene CNTF. Sopravvivenza, proliferazione e maturazione degli Olp. Differenziazione astrociti Modula la risposta di astrociti e microglia dopo danno cerebrale Protegge gli Ol dall'apoptosi indotta da TNF- α e IFN- γ
Neureguline	Attive su neuroni e glia	Glial growth factor 2 (GGF2)	Promuove sopravvivenza e proliferazione, inibisce la differenziazione degli Olp Differenziazione terminale degli Ol maturi. Migliora l'EAE tramite immunodeviazione Th2. Assente nelle lesioni SM

Ol = Oligodendrociti, Olp = progenitori degli oligodendrociti; EAE = encefalite autoimmune sperimentale

strine, i fattori di crescita dei fibroblasti, le citochine della famiglia delle neuropoietine e le neureguline. Caratteristiche e proprietà specifiche dei vari fattori di crescita sono riassunte per brevità nella tabella 1.

In particolare, nella SM si sono riscontrati elevati livelli di NGF, BDNF e IGF-1 nel liquor o nelle lesioni demielinizzanti (29), mentre l'assenza di neureguline è stata interpretata come possibile causa di inadeguata rimielinizzazione (30). Infine, i pazienti portatori di una mutazione del gene CNTF che ne impedisce la sintesi, sembrano avere una forma di malattia più grave e precoce (31).

I fattori di crescita possono avere un ruolo nella neuroprotezione grazie a proprietà immunomodulanti: NGF, per esempio, è in grado di indurre uno shift della polarizzazione dell'ambiente citochinico dal tipo Th1 al tipo Th2 (32), notoriamente più favorevole in malattie autoimmuni. Diversi autori hanno valutato l'effetto di alcuni fattori di crescita nel contesto di modelli animali di demielinizzazione, in particolare nell'encefalite autoimmune sperimentale (EAE), con risultati in molti casi incoraggianti. Isolati ed ancora preliminari sono invece i tentativi di applicazione nella SM: la somministrazione di IGF-1 per 24 settimane, per esempio, non ha dimostrato cambiamenti significativi sia a livello clinico che alla RMN (33). La breve emivita e la rapida caduta dei livelli plasmatici di queste molecole dopo somministrazione sistemica suggeriscono che un mancato effetto terapeutico può essere dovuto all'incapacità di raggiungere concentrazioni adeguate a livello delle lesioni del SNC. Inoltre, sebbene gli esperimenti su animali resi privi di singoli fattori di crescita (animali knock-out) suggeriscano un ruolo importante di queste sostanze nella mielinizzazione così come nella rimielinizzazione, è verosimile che questi processi siano regolati dall'azione sequenziale e coordinata di diversi fattori di crescita e, nel caso specifico delle malattie demielinizzanti a patogenesi autoimmune, anche dall'interazione con il microambiente intercellulare (milieu infiammatorio). A ciò si aggiunga che ulteriori fattori, quali ormoni, neurotrasmettitori, componenti della matrice extracellulare, ecc., si sono dimostrati importanti, durante lo sviluppo embrionale, nello stabilire un equilibrio tra proliferazione e differenziazione oligodendrogliale. Sarà una sfida del futuro cercare di comprendere la complessità di questi fenomeni.

Rimielinizzazione

E' noto che il SNC reagisce ai danni tissutali (ischemico, tossico, traumatico, ecc.) inclusi quelli causati dalla demielinizzazione immuno-mediata e dalla perdita assonale. Diversi studi hanno dimostrato che anche nella SM, così come avviene nel suo modello sperimentale EAE, può avvenire una riparazione spontanea della mielina quale risposta fisiologica alla distruzione immuno-mediata [34]. Ancora si discute su quale sia l'elemento cellulare che guida il processo di rivestimento assonale *in vivo*. Nelle aree rimielinizzate si sono riscontrati sia oligodendrociti differenziati sia OPCs (35), tuttavia gli OPCs sono più efficienti degli oligodendrociti post-mitotici nel sostenere il ripristino anatomico e l'integrità funzionale della mielina.

Qualunque sia l'elemento cellulare che guida il rivestimento assonale *in vivo*, il pro-

cesso di rimielinizzazione funzionale nella SM è spesso incompleto e limitato. Sebbene non sia nota la ragione ultima per cui la rimielinizzazione spontanea fallisce nel tempo, si possono formulare alcune ipotesi: (i) perdita di OPCs oppure ridotta capacità di queste cellule di differenziarsi e rimielinizzare gli assoni danneggiati; (ii) incapacità degli OPCs di rispondere alla demielinizzazione; (iii) deplezione selettiva di cellule rimielinizzanti intorno alle aree demielinizzate nel corso degli anni; (iv) inibizione della rimielinizzazione come risultato di un delicato bilancio tra effetti pro-infiammatori e pro-rimielinizzanti delle citochine; (v) limitazione della migrazione endogena di OPCs verso le aree danneggiate per la formazione di cicatrici di astrocitosi reattiva; (vi) perdita acuta e/o cronica di assoni.

Le diverse fonti di cellule rimielinizzanti

Nel tempo sono state sviluppate diverse procedure di trapianto volte a ripristinare l'architettura della mielina all'interno di aree demielinizzate del SNC, tuttavia questi approcci hanno mostrato serie limitazioni (36). In particolare, le cellule mielino-geniche mostrano *in vitro* una limitata capacità di crescita ed espansione e, una volta trapiantate *in vivo*, inducono rimielinizzazione solo in prossimità del sito di trapianto (37).

Gli oligodendrociti maturi, come pure gli OPCs, sono stati ampiamente utilizzati per promuovere la rimielinizzazione in modelli animali di demielinizzazione focale del SNC. Quando iniettati localmente nel sito di danno mielino indotto chimicamente, gli oligodendrociti coltivati mostrano una scarsa capacità di rimielinizzazione, mentre gli OPCs dimostrano maggiori proprietà mitotiche, migratorie e riparative (38, 39).

Le cellule di Schwann producono e mantengono il trofismo della mielina nel sistema nervoso periferico. Possono essere coltivate, espanse *in vitro* in condizioni appropriate, crioconservate e trapiantate in aree demielinizzate del SNC. Il principale vantaggio sta nel fatto che possono essere facilmente ottenute da una biopsia del nervo surale. Inoltre, se è vero che l'attacco (auto) immune nella SM è diretto contro antigeni oligodendrogliali specifici, il trapianto autologo di cellule di Schwann può sfuggire a questa reazione anomala. Una prima sperimentazione di fase I è stata effettuata su tre pazienti affetti da SM progressiva. Sebbene i risultati abbiano dimostrato la sicurezza della procedura di trapianto, le biopsie cerebrali effettuate cinque mesi dopo il trapianto non hanno dimostrato alcuna evidenza diretta di sopravvivenza delle cellule di Schwann *in vivo* e all'inizio del 2003 lo studio è stato interrotto [<http://www.myelin.org/06232003.htm>].

Le cellule olfattorie sono cellule multipotenti appartenenti all'organo olfattivo periferico. Sebbene normalmente non producano mielina, possono rivestire *in vivo* assoni di grosso calibro con una mielina simile a quella prodotta dalle cellule di Schwann. Cellule olfattorie umane trapiantate nel SNC di ratto si sono dimostrate capaci di una estensiva rimielinizzazione funzionale (40).

Cellule staminali neurali e rimielinizzazione

La natura intrinsecamente complessa della SM, in particolare la sua cronicità e multifocalità, pone grandi difficoltà nelle terapie rimielinizzanti basate sul tra-

pianto di cellule. Devono, infatti, essere soddisfatti due principali requisiti: i) disporre di una fonte virtualmente illimitata di cellule; ii) la possibilità di raggiungere simultaneamente diverse aree danneggiate del SNC. Le cellule staminali embrionali e le staminali neuronali dell'adulto (somatiche) possono soddisfare entrambi questi criteri, poiché sono intrinsecamente capaci di modificare il proprio indirizzo di differenziazione secondo le diverse necessità ambientali e, pertanto, possono costituire una fonte ideale di cellule per terapie fondate sul trapianto in diverse malattie del SNC.

La fonte cellulare

I progenitori neuronali derivanti da cellule embrionali non sono stati usati estensivamente a scopo di trapianto, tuttavia sono in grado di differenziarsi in cellule gliali e rivestire *in vivo* assoni demielinizzati in modelli animali (41). Purtroppo molti esperimenti sono stati complicati dalla formazione di tessuti eterologhi e teratomi all'interno degli organi trapiantati (42). Per superare parzialmente queste limitazioni, recentemente sono stati sviluppati protocolli per generare *in vitro* un numero elevato di precursori neurali a partire da cellule embrionali (43).

Le cellule staminali neurali somatiche di mammifero garantiscono neuronogenesi e gliogenesi all'interno di specifiche aree del SNC durante l'età adulta e posseggono la capacità di generare una progenie di cellule neurali che possono integrarsi e riparare il tessuto di origine (44). Queste cellule possono essere isolate da cervelli sia fetali che adulti e possono essere espanse e coltivate in medium di coltura per anni, fornendo così una fonte rinnovabile di cellule utilizzabili per il trapianto (45). Queste cellule, infatti, mostrano capacità di proliferazione e crescita stabile in presenza di fattori di crescita, sono capaci di autorinnovarsi, dimostrano multipotenzialità e plasticità funzionale, anche dopo diversi passaggi *in vitro* o dopo diversi cicli di congelamento e scongelamento. Inoltre, plasticità e flessibilità funzionale possono essere modulate *in vitro* tramite l'esposizione a diversi fattori di crescita. Nei modelli animali di demielinizzazione il trapianto di cellule staminali neurali ha dimostrato che esse hanno la capacità di differenziarsi in oligodendrociti e di rivestire gli assoni, promuovendone il recupero funzionale (46, 47). Si noti che finora il trapianto di cellule staminali somatiche non ha mai indotto la crescita di tumori.

La via di trapianto di cellule staminali

La multifocalità della SM limiterebbe *per se* la fattibilità di terapie trapiantistiche. Questa limitazione può essere superata introducendo le cellule nel circolo sanguigno o nel liquido cerebrospinale: una volta così iniettate, esse raggiungono le multiple aree d'infiammazione. Questo homing specifico è stato spiegato, almeno in parte, con l'espressione costitutiva di un vasto numero di molecole d'adesione. Una volta fermamente ancorate alla microvascolatura cerebrale, le cellule trapiantate seguirebbero un gradiente di chemochine, citochine e di loro recettori nelle sedi d'infiammazione delle lesioni cerebrali. Questa ipotesi è confermata dalla recente dimostrazione che le cellule staminali adulte, somministrate per via endovenosa o liquorale, promuovono un recupero anatomico e funzio-

nale della mielina negli animali affetti da EAE, indovandosi nelle aree infiammate del cervello e del midollo attraverso l'espressione delle molecole di adesione CD44 e VLA-4. (46), utilizzando, quindi, alcune vie di homing proprie dei linfociti encefalitogeni.

Di fatto, le cellule staminali neurali multipotenti pur rivelandosi efficienti nel trasformarsi in oligodendrociti hanno dimostrato anche capacità neuroprotettive (46, 47); tali capacità, in un senso o nell'altro, sembra siano indotte dall'ambiente locale con cui vengono a contatto, che può stabilire il destino evolutivo delle cellule trapiantate. Recentemente è stato dimostrato che, dopo il trapianto, le cellule staminali neurali possono rimanere in uno stato indifferenziato e continuare a rilasciare fattori di crescita neuroprotettivi (46, 48). Questo ultimo dato suggerisce che la riparazione del danno mielino potrebbe anche essere dovuto ad una attività "bystander" delle cellule staminali, le quali modulano il recupero dei neuroni e/o oligodendrociti attraverso il rilascio di molecole neurotrofiche (49) o inibendo la proliferazione di cellule mielinotossiche (47).

L'integrazione funzionale delle cellule staminali nei siti di trapianto rimane il problema più critico. Vi sono scarse evidenze che queste cellule possano ricostruire l'architettura tridimensionale del sistema nervoso e generare elementi cellulari propriamente funzionanti, cioè capaci di integrarsi nei circuiti neuronali. Sono pertanto necessari ulteriori studi per stabilire se le cellule staminali possono generare cellule neuronali o gliali normofunzionanti: fino ad oggi la maggioranza degli studi si è limitata a valutare gli aspetti morfologici o immunoistochimici.

Cellule staminali del midollo osseo e rimielinizzazione

Le cellule staminali del midollo osseo conservano la capacità di auto-rinnovarsi e differenziarsi in cellule di tutte le linee ematiche durante la vita adulta. Recentemente queste cellule si sono dimostrate capaci di differenziarsi in altri tipi cellulare specifici, inclusi quelli di tipo neuronale, dopo trapianto nei roditori e nell'uomo (50). Ciò avverrebbe per transdifferenziazione (conversione diretta in neuroni) e/o fusione cellulare (assimilazione di cellule trapiantate con neuroni preesistenti e formazione di eterocarionti). Recenti risultati indicano che anche la plasticità delle cellule staminali emopoietiche può contribuire alla rimielinizzazione. In ratti con lesioni demielinizzanti del midollo spinale l'iniezione endovenosa o intracerebrale di cellule staminali emopoietiche ha dato luogo a vari gradi di rimielinizzazione, proporzionale al numero di cellule somministrate. Nell'insieme, questi dati supportano il concetto che le cellule staminali del midollo osseo possono essere un utile strumento di riparazione tissutale cerebrale, tuttavia, nonostante l'evidenza sia in campo animale che umano, la reale portata terapeutica del trapianto di midollo osseo nelle malattie neurologiche è ancora controverso (50, 51).

Conclusioni

Numerosi approcci sperimentali di trapianto cellulare hanno tentato di chiarire i meccanismi biologici e molecolari sottostanti alla riparazione del SNC. Oggi le

teorie a sostegno dell'assenza di un potenziale di rinnovamento cellulare nel SNC dell'adulto sono state definitivamente contraddette, promettenti fonti di cellule mielinogeniche a scopo di trapianto sono state caratterizzate e nuove strategie sono state proposte e sperimentate. Si è ottenuta una migliore comprensione delle dinamiche della rimielinizzazione endogena anche se i primi risultati negativi di questo approccio cellula-mediato nei pazienti con SM hanno raffreddato molte aspettative. Questa evidenza negativa si associa ad altri limiti non ancora superati: il numero limitato di cellule mielinizzanti che può essere coltivato *in vitro* e la limitata capacità di migrazione delle cellule trapiantate. Sebbene alcune cellule somatiche possono rappresentare una nuova e promettente via da percorrere, sono ancora necessari altri studi per stabilire sicurezza, efficacia e plasticità *in vivo* di queste cellule, prima di intraprendere ogni futura applicazione sull'uomo. L'attuale grande scommessa consiste nello sviluppo di un approccio affidabile e riproducibile per ottenere un completo ripristino anatomico e funzionale dell'architettura mielinica nei pazienti affetti da SM.

Bibliografia

1. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM et al. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesion. *Brain* 1997; 120: 393-399.
2. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM et al Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278-285.
3. Matthews PM, De Stefano N, Narayanan S et al. Putting magnetic resonance spectroscopy studies in context: axonal damage and disability in multiple sclerosis. *Semin Neurol* 1998; 18: 327-336.
4. Filippi M Multiple sclerosis: a white matter disease with associated gray matter damage. *J Neurol Sci* 2001; 185: 3-4.
5. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A et al. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time *Brain* 2002; 125: 2202-2212.
6. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S et al Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 2000; 123: 1174-1183.
7. Zaffaroni M. Biological indicators of the neurodegenerative phase of multiple sclerosis. *Neurol. Sci.* 2003; 24: S279-S282.
8. Peltola J, Ukkonen M, Moilanen E, Elovaara I. Increased nitric oxide products in CSF in primary progressive MS may reflect brain atrophy. *Neurol* 2001; 57: 195-896.
9. Aboul-Enein F, Rauschka H, Karnek B et al. Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 25-33.
10. Rawes JA, Calabrese VP, Khan OA, De Vries GH. Antibodies to the axolemma-enriched fraction in the cerebrospinal fluid and e serum of patients with multiple sclerosis and other neurological disease. *Mult Sclers* 1997; 3: 363-369.

11. Silber E, Semra YK, Gregson NA, Sharief MK. Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurol* 2002; 58: 1372-1381.
12. Eikelenboom MJ, Petzold A, Lazeron RHC et al. Multiple sclerosis. Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurol* 2003; 60: 219-223.
13. Sadatipour BT, Greer Jm; Pender MP: Increased circulating antiganglioside antibodies in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Ann neurol* 1998; 44: 980-983.
14. Linington C, Engelhardt B, Kapocs G, Lassmann H Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. *J Neuroimmunol* 1992; 40: 219-224.
15. Lucchinetti C, Brusck W, Parisi J et al. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions: a study of 113 cases. *Brain* 1999; 122: 2279-2295.
16. Kalkers NF, Barkhof F, Bergers E. et al. The effect of the neuroprotective agent riluzole on MRI parameters in primary progressive multiple sclerosis: a pilot study. *Mult Scler* 2002; 8: 532-533.
17. Maalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E. Autoimmune T-cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 1999; 5: 49-55.
18. Martino G, Adorini L, Rieckmann P et al. Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. *Lancet Neurology* 2002; 1: 499-509.
19. Maalem G, Gdalyahu A, Shani Y et al. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J Autoimmun* 2000; 15: 331-345.
20. Knoblach SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 1998; 153: 143-151.
21. Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD et al. Interleukin-1 beta promotes repair of the CNS. *J Neurosci* 2001; 21: 7046-7052.
22. Guo X, Dillman JF, Dawson VL, Dawson TM. Neuroimmunophilins: novel neuroprotective and neurodegenerative targets. *Ann Neurol* 2001; 50: 6-16.
23. Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM et al. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125: 1297-1308.
24. Neuhaus O, Archelos JJ, Hartung HP. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 131-138.
25. Byrnes AA, McArthur JC, Karp CL. Interferon-beta therapy for multiple sclerosis induces reciprocal changes in interleukin-12 and interleukin-10 production. *Ann Neurol* 2002; 51: 165-174.
26. Ziemssen T, Kumpfel T, Klinkert WE et al. Glatiramer acetate-specific T-helper 1 and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple scler-

- rosis therapy. Brain-derived neurotrophic factor. *Brain* 2002; 125: 2381-2391.
27. Filippi M, Rovaris M, Rocca MA et al. Glatiramer acetate reduces the proportion of new MS lesions evolving into 'black holes'. *Neurology* 2001; 57: 731-733.
 28. Ransohoff RM, Howe CL, Rodriguez M Growth factor treatment of demyelinating disease: at last, a leap into the light. *Trends Immunol* 2002; 23: 512-516.
 29. Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T et al. BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprospective interactions between immune and neuronal cells? *Brain* 2002; 25: 75-85.
 30. Viehovec A, Miller RH, Park SL et al. Neuregulin: an oligodendrocyte growth factor absent in multiple sclerosis lesions. *Dev neurosci* 2001; 23: 377-386.
 31. Giess R, Maurer M, Linker R et al. A null mutation in the CNTF gene is associated with early onset of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2002; 59: 407-409.
 32. Villoslada P, Hauser SL, Bartke I et al. Human nerve growth factor protects common marmosets against autoimmune encephalomyelitis by switching the balance of T helper cell type 1 and 2 cytokines within the central nervous system. *J Exp Med* 2000; 191: 1799-1806.
 33. Frank JA, Richert N, Lewis B et al. A pilot study of recombinant insulin-like growth factor-I in seven multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2002; 8: 24-29.
 34. Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2002; 346: 165-167.
 35. Wolswijk G. Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain* 2002; 125: 338-349.
 36. Franklin RJ. Remyelination of the demyelinated CNS: the case for and against transplantation of central, peripheral and olfactory glia. *Brain Res Bull* 2002; 57: 827-832.
 37. Pluchino S, Furlan R, Martino G. Cell-based remyelinating therapies in multiple sclerosis: evidence from experimental studies. *Curr. Opin. Neurol.* 2004;17: 247-255.
 38. Groves AK, Barnett SC, Franklin RJ et al. Repair of demyelinated lesions by transplantation of purified O-2A progenitor cells. *Nature* 1993; 362: 453-455.
 39. Blakemore WF, Gilson JM, Crang AJ. Transplanted glial cells migrate over a greater distance and remyelinate demyelinated lesions more rapidly than endogenous remyelinating cells. *J Neurosci Res* 2000; 61: 288-294.
 40. Kato T, Honmou O, Uede T, Hashi K, Kocsis JD. Transplantation of human olfactory ensheathing cells elicits remyelination of demyelinated rat spinal cord. *Glia.* 2000; 30: 209-218.
 41. Brustle O, Jones KN, Learish RD et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 1999; 285: 754-756.

42. Deacon T, Dinsmore J, Costantini LC et al. Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol* 1998; 149: 28-41.
43. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1129-1133.
44. Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 2000; 407: 963-970.
45. Vescovi AL, Parati EA, Gritti A et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* 1999; 156: 71-83.
46. Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 2003; 422: 688-694.
47. Einstein O, Karussis D, Grigoriadis N, Mizrachi-Kol R, Reinhartz E, Abramsky O, Ben-Hur T. Intraventricular transplantation of neural precursor cell spheres attenuates acute experimental allergic encephalomyelitis. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24: 1074-1082.
48. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003; 181: 115-129.
49. Tran PB, Miller RJ. Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 444-455.
50. Mezey E, Key S, Vogelsang G et al. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1364-1369.
51. Mezey E, Nagy A, Szalayova I, Key S, Bratincsak A, Baffi J, Shahar T. Comment on "Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo". *Science* 2003; 299: 1184.

Rigenerazione di tessuto epatico con infusione di cellule staminali: modelli animali

Maurizio Muraca

Laboratorio Analisi, Ospedale Bambino Gesù, Roma

Il possibile utilizzo delle cellule staminali in terapia ha suscitato un crescente interesse nel corso dell'ultimo quinquennio. Il compartimento staminale epatico (costituito dalle cosiddette "cellule ovali") è stato identificato a livello dei dotti di Hering, ma lavori recenti suggeriscono che almeno una sottopopolazione di precursori cellulari epatici possa derivare da cellule emopoietiche residenti nel midollo osseo. Petersen et al. *Science* 284: 1168, 1999) hanno trapiantato con cellule staminali di derivazione midollare ratti irradiati letalmente e sottoposti a danno epatico da 2-acetaminofluorene e CCl₄, un metodo per indurre la proliferazione delle cellule ovali. Utilizzando il cromosoma Y come tracciante, cellule maschili sono state identificate nel fegato di ratti femmina riceventi il trapianto midollo da ratti donatori di sesso maschile. Lagasse e Coll (*Nat Med* 6: 1229, 2000) ha dimostrato che il trapianto di cellule emopoietiche nel topo FAH (-/-), modello animale di tirosinemia tipo I, determinava la sopravvivenza dell'animale (altrimenti affetto da insufficienza epatica letale) e normalizzava le funzioni del fegato. Almeno quattro studi clinici suggeriscono che anche nell'uomo cellule di derivazione midollare possano originare cellule parenchimali epatiche, anche se l'entità del ripopolamento in alcuni studi è molto modesto, tanto da essere stato considerato non significativo dal punto di vista fisiopatologico. Inoltre, studi recenti indicano che il chimerismo osservato da Lagasse non è il risultato di un processo di differenziazione di cellule di derivazione midollare in epatociti, ma piuttosto di una fusione tra la cellule emopoietica (probabilmente allo stato di macrofago) e la cellula epatica. Il risultato comunque sarebbe la terapia del difetto genetico, anche se conosciamo ancora poco sulla biologia delle cellule risultanti dal processo di fusione. Lavorando in collaborazione con il Cedars-Sinai Medical Center di Los Angeles, abbiamo identificato una specifica popolazione di cellule staminali residenti nel midollo osseo in grado di differenziarsi in cellule parenchimali epatiche sia in vitro che in vivo. Queste cellule sono state utilizzate per migliorare la compatibilità donatore-ricevente in un modello animale di trapianto di fegato. Inoltre, abbiamo osservato che l'induzione di un danno epatico reversibile da ischemia/riperfusione determina l'in-

tegrazione di questa popolazione cellulare nel fegato e la loro differenziazione in epatociti. I dati preliminari suggeriscono inoltre assenza di fenomeni di fusione cellulare. Questi risultati potrebbero avere importanti implicazioni nella terapia delle malattie congenite del metabolismo epatico (Biochem Biophys Res Commun. 288: 156-64, 2001 - Surgery 132: 384-90, 2002 - J Hepatol 36: 25, 2002).

Cellule staminali mesenchimali: biologia e applicazioni cliniche

Carmelo Carlo-Stella, Massimo Di Nicola

Unità di Oncologia Medica 'Cristina Gandini', Istituto Nazionale Tumori, Università di Milano

In aggiunta alle cellule staminali emopoietiche (HSCs) in grado di generare progenitori orientati verso la maturazione terminale, il midollo osseo contiene cellule staminali non-emopoietiche di tipo mesenchimale (1) e di tipo epiteliale (2). Le “*cellule staminali mesenchimali*” (MSCs), dotate di capacità di automantenimento e di pleiotropica capacità differenziativa in senso osteoblastico, condrocitario, adipocitario, mioblastico e fibroblastico sono anche denominate “*cellule stromali midollari*”, data la loro capacità di generare le cellule del microambiente midollare (3, 4). Le cellule stromali del microambiente midollare sono fortemente eterogenee essendo costituite oltre che dalla progenie delle MSCs anche da cellule endoteliali e macrofagi (questi ultimi benchè generati dalla HSC vengono considerati componenti funzionali dello stroma) (5, 6).

Dal punto di vista funzionale, le cellule mesenchimali del microambiente midollare e i loro prodotti biosintetici giocano un ruolo fondamentale nella regolazione della proliferazione e differenziazione emopoietica. Le cellule stromali sintetizzano fattori di crescita e citochine regolatrici, esprimono molecole adesive e producono proteine della matrice extracellulare che compartimentalizzano le molecole regolatrici (7, 8). Benchè citochine e fattori di crescita svolgano un ruolo cruciale nella regolazione della proliferazione e differenziazione emopoietica, appare improbabile che l'emopoiesi sia regolata da una miscela casuale di fattori di crescita e cellule target (9). È verosimile che molecole regolatorie e fenomeni di localizzazione a livello dello stroma midollare siano essenziali per regolare l'emopoiesi. Benchè le conoscenze circa i fattori stromali in grado di modulare lo sviluppo di cellule emopoietiche lungo le varie filiere differenziative siano relativamente limitate, appare evidente che le cellule del microambiente midollare sono coinvolte non solo nella regolazione della proliferazione e differenziazione mieloide ma anche in quella T e B linfocidica attraverso tre modalità operative: (i) interazioni cellula-cellula; (ii) interazioni tra cellule emopoietiche e molecole della matrice extracellulare; (iii) interazioni tra cellule emopoietiche e citochine regolatrici (5).

Il ruolo esatto che le cellule del microambiente, le molecole adesive e le proteine della matrice extracellulare svolgono nella localizzazione e organizzazione

spaziale delle cellule emopoietiche e nella regolazione della ricostituzione mieloide e linfoide dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche (SCT) rimane oggetto di ipotesi (10). Studi nel topo hanno dimostrato che cellule staminali e progenitrici emopoietiche hanno una peculiare distribuzione lungo la cavità midollare del femore suggerendo una suddivisione del microambiente midollare in aree funzionalmente distinte (“microambiente primario” e “microambiente secondario”) che condizionano distinte modalità differenziative delle cellule staminali emopoietiche (11). L’esistenza di aree microambientali primarie e secondarie è supportata dagli esperimenti di Schofield (12) che dimostrano un ruolo delle cellule microambientali nel mantenere la cellula staminale emopoietica in condizioni quiescenti e suggeriscono l’esistenza della “nicchia della cellula staminale”. Un altro meccanismo che supporta il concetto di aree specializzate del microambiente è rappresentato dalla produzione compartimentalizzata di fattori di crescita (9). Fattori di crescita prodotti localmente dalle cellule stromali si legano a strutture della matrice extracellulare e vengono presentati alle cellule target che riconoscono ciascun fattore attraverso specifici recettori (9). Questo meccanismo consente di localizzare in aree specifiche del microambiente elevate concentrazioni di specifici fattori di crescita. Allo stato attuale, poco si conosce circa i fattori stromali in grado di modulare la differenziazione emopoietica. Un crescente numero di evidenze suggerisce che la stroma midollare è implicata non solo nella regolazione della proliferazione delle cellule mieloidi ma anche nello sviluppo T e B linfocitario (13-16). Specifiche molecole di adesione e citochine sono in grado di regolare la B e T linfopoiesi stroma-dipendente (17, 18) suggerendo che lo stroma midollare possa funzionare come sede extra-timica di T e B linfopoiesi.

L’esistenza della MSC in grado di auto-mantenersi è supportata da molti dati in vivo e in vitro (19). A livello funzionale, le MSCs che risiedono nel microambiente midollare sono in grado di generare uno stroma midollare complesso sia in vivo che in vitro e hanno capacità differenziativa multilineare essendo infatti capaci di generare progenitori con potenziale differenziativo ristretto alla filiera fibroblastica, osteoblastica, adipocitaria, condrocitaria e mioblastica (20-22). In assenza di un sistema di coltura in grado di quantificare la MSC, l’unica classe di progenitori mesenchimali attualmente saggiabile in vitro è rappresentata dalle CFU-F (fibroblastic colony-forming cells) (23). Le CFU-F generano in vitro colonie di differente taglia e potenziale proliferativo morfologicamente costituite da cellule di tipo fibroblastico le quali sono in grado, in presenza di appropriati stimoli, di differenziare in senso adipocitario (22) o osteoblastico (24) e sono in grado di generare uno spettro completo di cellule mesenchimali se trapiantate sotto la capsula renale di un ricevente singenico (“stromal stem cell hypothesis”) (20, 25-28). Un saggio non clonogenico per lo stroma midollare è rappresentato dalle colture a lungo termine tipo Dexter che generano uno stroma complesso costituito dai diversi tipi di cellule mesenchimali che compongono il microambiente midollare.

Prerequisito per l’uso clinico di cellule mesenchimali è la possibilità di isolare progenitori mesenchimali e di espanderli ex vivo in condizioni di coltura stan-

ardizzate. L'isolamento e l'espansione ex vivo di progenitori mesenchimali risiede nella disponibilità di anticorpi (es., STRO-1, SH-2) non cross-reattivi con l'antigene CD34 e capaci di riconoscere una sottopopolazione di cellule midollari in grado di generare in vitro stromi midollari completi e funzionalmente attivi (29,30). Nessuno degli anticorpi attualmente disponibili è specifico per le MSCs. L'importante ruolo delle cellule mesenchimali nella regolazione del sistema emopoietico è dimostrato da molteplici evidenze cliniche e sperimentali. Nel modello di trapianto in utero (IUT) nella pecora, è stato dimostrato che la reinfusione combinata di cellule staminali emopoietiche e cellule stromali midollari aumenta significativamente i livelli di attecchimento di cellule del donatore (31). Nel modello di IUT nel topo NOD/SCID, il potenziale di attecchimento delle cellule staminali fetali viene abrogato se il ricevente viene irradiato prima del trapianto suggerendo che il microambiente midollare esercita un ruolo cruciale nell'attecchimento mielo-linfo-poietico (32). Nell'uomo, un tipico modello di alterazione del microambiente midollare che condiziona una ridotta elasticità funzionale dell'emopoiesi si realizza dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche. In questa condizione, oltre ad una significativa riduzione della frequenza di progenitori emopoietici primitivi e orientati, si osserva una marcata riduzione della capacità delle cellule mesenchimali di supportare l'emopoiesi allogenica o autologa (33-36).

Il ruolo dello stroma midollare nella regolazione emopoietica e le peculiari caratteristiche funzionali delle cellule mesenchimali consentono di ipotizzare numerose applicazioni cliniche dei progenitori mesenchimali generati ex vivo. Le MSCs potrebbero essere utilizzate in associazione o meno a cellule staminali emopoietiche allo scopo di 'rigenerare' il microambiente midollare danneggiato dalla chemio-radioterapia o per migliorare la ricostituzione mieloide e linfoide dopo trapianto di cellule staminali. Inoltre, le caratteristiche funzionali delle MSCs (radio-resistenza, attività metabolica, capacità di compartimentalizzare la produzione di citochine e di interagire in modo selettivo con le cellule emopoietiche) le rendono un target di rilevante interesse in strategie di terapia genica (es., in pazienti affetti da deficit enzimatici o proteici) (37). Dati recenti dimostrano che le MSCs sono in grado di modulare la risposta proliferativa di linfociti T alloigenici in vitro e suggeriscono un ruolo per le cellule stromali nella modulazione del rigetto e nella prevenzione della malattia da trapianto verso l'ospite (38).

Un numero molto limitato di studi clinici ha sinora esplorato l'uso in vivo delle MSCs. In accordo a dati riportati in uno studio di fase I, la reinfusione di MSCs appare ben tollerata e priva di effetti collaterali (39). Occorre sottolineare che a causa della limitata conoscenza della biologia delle MSCs, le applicazioni cliniche delle MSCs rimangono oggetto di ipotesi che vanno attentamente testate mediante appropriati studi preclinici e programmi clinici. Prerequisiti essenziali per l'uso clinico di cellule mesenchimali sono: (i) la possibilità di isolare progenitori mesenchimali e di espanderli ex vivo in condizioni di coltura standardizzate (40) e (ii) la dimostrazione della trapiantabilità delle MSCs.

In conclusione, lo studio della biologia delle MSC appare ancora ad uno stadio iniziale e molti aspetti devono essere adeguatamente esplorati prima che si possa

procedere, in condizioni cliniche appropriate, a valutare l'impatto terapeutico delle MSC nel contesto di strategie di terapia cellulare e terapia genica.

Bibliografia

1. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
2. Petersen B E, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone Marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170.
3. Scott MA, Gordon MY. In search of the haemopoietic stem cell. *Br J Haematol* 1995; 90: 738-743.
4. Gronthos S, Simmons PJ. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J Hematotherapy* 1996; 5: 15-23.
5. Dexter TM. Regulation of hemopoietic cell growth and development: experimental and clinical studies. *Leukemia* 1989; 3: 469-474.
6. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; 88: 287-298.
7. Trentin JJ. Influence of hematopoietic organ stroma (hematopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation, in Gordon AS (ed): *Regulation of Hematopoiesis* (vol 1). New York, NY, Appleton, 1970; 161-185.
8. Simmons PJ, Zannettino A, Gronthos S, Leavesley D. Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leukemia and Lymphoma* 1994; 12: 353-363.
9. Gordon MY, Riley GP, Watt SM, Greaves MF. Compartmentalization of a haemopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 1987; 326: 403-405.
10. Carlo-Stella C, Tabilio A. Stem cells and stem cell transplantation. *Haematologica* 1996; 81: 573-587.
11. Gordon MY. Physiological mechanisms in BMT and haemopoiesis - revisited. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 193-197.
12. Schofield R. The relationship between the haemopoietic stem cell and the spleen colony-forming cell: a hypothesis. *Blood Cells* 1978; 4: 7-25.
13. McGinnes K, Quesniaux V, Hitzler J, Paige C. Human B-lymphopoiesis is supported by bone marrow-derived stromal cells. *Exp Hematol* 1991; 19: 294-303.
14. Landreth KS, Dorshkind K. Pre-B cell generation potentiated by soluble factors from a bone marrow stromal cell line. *J Immunol* 1988; 140: 845-852.
15. Kierney PC, Dorshkind K. B lymphocyte precursors and myeloid progenitors survive in diffusion chamber cultures but B cell differentiation requires close association with stromal cells. *Blood* 1987; 70: 1418-1424.
16. Touw I, Löwenberg B. Production of T lymphocyte colony-forming units from precursors in human long-term bone marrow cultures. *Blood* 1984; 64: 656-661.

17. Dorshkind K, Johnson A, Collins L, Keller GM, Phillips RA. Generation of purified stromal cell cultures that support lymphoid and myeloid precursors. *J Immunol Methods* 1986; 89: 37-47.
18. Barda-Saad M, Rozenszajn LA, Globerson A, Zhang AS, Zipori D. Selective adhesion of immature thymocytes to bone marrow stromal cells: relevance to T cell lymphopoiesis. *Exp Hematol* 1996; 24: 386-391.
19. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2001; 98: 7841-7845.
20. Owen ME, Cave J, Joyner CJ. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of CFU-F. *J Cell Sci* 1987; 87: 731-739.
21. Owen ME, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *CIBA Found Symp* 1988; 136: 42-60.
22. Bennet JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocyte cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 1991; 99: 131-139.
23. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980; 56: 289-301.
24. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 1994; 84: 4164-4173.
25. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
26. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; 17: 331-340.
27. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop* 1980; 151: 294-307.
28. Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. *J Bone Miner Res* 1985; 3: 1-12.
29. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991a; 78: 55-62.
30. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57-66.
31. Almeida-Porada G, Ascensao JL, Zanjani ED. The role of sheep stroma in human haemopoiesis in the human/sheep chimaeras. *Br J Haematol* 1996; 93: 795-802.
32. Gan OI, Murdoch B, Larochelle A, Dick JE. Differential maintenance of primitive human SCID-repopulating cells, clonogenic progenitors, and long-term culture-initiating cells after incubation on human bone marrow stromal cells. *Blood* 1997; 90: 641-650.

33. Li S, Champlin R, Fitchen JH, Gale RP. Abnormalities of myeloid progenitor cells after "successful" bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1984; 75: 234-241.
34. Domenech J, Gihana E, Dayan A. Haemopoiesis of transplanted patients with autologous marrows assessed by long-term marrow culture. *Br J Haematol* 1994; 88: 488-496.
35. O'Flaherty E, Sparrow R, Szer J. Bone marrow stromal function from patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 207-212.
36. Carlo-Stella C, Tabilio A, Regazzi E, Garau D, La Tagliata R, Trasarti S, Andrizzi C, Vignetti M, Meloni G. Effect of chemotherapy for acute myelogenous leukemia on hematopoietic and fibroblast marrow progenitors. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 465-471.
37. van Beusechem VW, Kukler A, Heidt PJ, Valerio D. Long-term expression of human adenosine deaminase in rhesus monkeys transplanted with retrovirus-infected bone-marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 7640-7644.
38. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or non-specific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-3843.
39. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan A. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 557-564.
40. Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 1995; 85: 929-940.

**IMPIEGO CLINICO:
ATTUALITÀ E PROSPETTIVE**

Terapia trapiantologica con cellule staminali emopoietiche delle malattie autoimmuni gravi/refrattarie, immunosoppressione, immunomodulazione, e/o abrogazione di autoimmunità?

Alberto Marmont

Dipartimento di Emato-Oncologia (DEMO), Azienda Ospedaliera di S. Martino, Genova

Sebbene la terapia delle malattie autoimmuni (MAI) sperimentali mediante il trapianto di midollo risalga a ricerche ormai antiche, la prima proposta di utilizzare procedure trapiantologiche in terapia umana fu effettuata poco più di una decade fa (1). Da allora si sono sviluppati due indirizzi fondamentali: il primo fondato sui risultati empirici (“serendipici”) ottenuti a seguito di trapianti di cellule staminali (CSE) allogeniche effettuati per malattie coincidentali (2), ossia in pazienti affetti da tempo da MAI ed aventi sviluppato una malattia oncematologica necessitante di trapianto, il secondo derivante dai risultati del gruppo di van Bekkum (3) in MAI sperimentali (encefalomielite “allergica” sperimentale-EAE, ed aririte da adiuvante-AA) mediante trapianto di CSE autologhe (più esattamente “pseudoautologhe”). Da tali premesse ha tratto origine uno spettro esteso tanto di segnalazioni di casi di particolare interesse, quanto di studi policentrici, fra i quali i più significativi provengono dal Working Party dell’EBMT, coordinati dapprima da Tyndall ed attualmente da Saccardi. Lo spazio ristretto di questa lettura non consente una disamina sufficientemente ampia della materia, per la quale si rimanda a due trattazioni (monografiche) approfondite e recentissime (4, 5). La presentazione sarà improntata ad una sintetica sineresi fra contributi, soprattutto policentrici, recenti ed esperienza personale. Poiché la biomedicina contemporanea è tutta tesa verso la cosiddetta medicina rigenerativa, è bene evidenziare sin dall’inizio i due aspetti fondamentali della terapia con cellule staminali delle MAI:

1. Sopprimere la catena patogenetica autoimmune all’origine del danno d’organo.
2. Somministrare CS (a prescindere dal loro grado di “stemness”) dotate di plasticità tale da ricreare (indipendentemente dal meccanismo biologico reale) un *pool* di CS specifiche delle linee cellulari distrutte.

Tale duplice linea di intervento deve essere integrata. La seconda riflette il tema fondamentale del corso. Va peraltro ribadito che non risponde ad un orientamen-

to terapeutico definitivo il proposito di somministrare CS “rigenerative” senza avere in precedenza eradicato o quanto meno controllato la sequenza patogenetica autoimmune che è all’origine delle varie patologie.

Trapianti allogenici

Il trapianto di CSE allogeniche, famigliari e/o non famigliari, identiche e/o non identiche, è l’unico trapianto nell’accezione reale del termine.

Questa verità bioimmunologica nulla detrae all’importanza clinica del trapianto autologo, che si avvale per tecnica dell’esperienza del precedente, e che sarà discusso più oltre. I risultati cimici possono essere suddivisi in due sottocapitoli.

Trapianti per malattie coincidentali

Nei 10 casi di artrite reumatoide (RA) raccolti (2) vi fu una mortalità trapiantologica del 30% (casistica pre-1980), una sopravvivenza globale a 10 anni del 70% e una percentuale di ricadute del 40%. Un maggiore ottimismo proviene da un caso recentemente allotrapiantato “primariamente”, ma occorre un follow-up più prolungato. Altri casi sono quelli di psoriasi, LES, sindrome antifosfolipidica ed enterite di Crohn, nei quali si verificarono remissioni persistenti.

Trapianti ad intensità ridotta (“non mieloablativi”)

ed effetto “Graft vs Autoimmunity (GVA)”

Com’è noto, negli ultimi tempi si punta molto sulla riduzione del regime chemioterapico di condizionamento (regimi RICT), allo scopo di ridurre la tossicità peritrapiantologica (TRM), facendo poi molto assegnamento sull’azione biologica del sistema immune del donatore. Tale effetto, ben noto in oncematologia, è stato anche dimostrato per alcune MAI, specie a seguito di infusioni linfocitarie del donatore (DLI).

Trapianti autologhi

Sono ormai oltre 500 i casi di MAI trattati con autotrapianto di CSE e raccolti dal WP dell’EBMT, e non è certo prospettabile farne qui una disamina anche solo riassuntiva. In via generale va ricordato che la TRM è stata dell’ordine del 7%, che si è fatto ricorso a CSE mobilizzate nel sangue periferico, e che i condizionamenti più intensivi sono stati seguiti sì da una maggiore durata della remissione, ma anche da una maggiore TRM. Sebbene si sia prospettato un effetto immunomodulante dell’autotrapianto (6), si deve pur ammettere che tali risultati Io avvicinano, per quanto riguarda il meccanismo d’azione, alla procedura con ciclofosfamide da sola (200 mg/kg), propugnata e perseguita dal Johns Hopkins (7). Le MAI per le quali è stato maggiormente utilizzato l’autotrapianto di CSE sono la sclerosi multipla (MS), la sclerosi sistemica (SSc), la RA, il lupus (LES) e le emopatie autoimmuni. Sarà dato un cenno su alcune.

Non c’è dubbio che i risultati più incoraggianti si vanno ottenendo nella MS, al punto che ha avuto inizio un *trial* prospettico europeo in fase II noto come

ASTIMS, coordinato da G.L. Mancardi. è di estremo interesse la cancellazione totale e durevole delle lesioni gadolinio-assumentanti già dopo la dose mobilizzante di ciclofosfamide (8), anche se ovviamente la sola terapia immunodepressiva non è in grado di riparare il danno assonico secondario.

Per quanto riguarda il LES, il primo caso mondiale è stato autotrapiantato a Genova nel 1996 (9), e la paziente è in buona remissione con minima corticoterapia. Altri 3 casi sono stati trapiantati con buon esito. Una casistica europea include 53 pazienti trapiantati in 23 centri (10): la sopravvivenza globale fu di 84% a 12 mesi, con remissione completa (SLEDAI<3) nel 66%, ma con un 32% di ricadute. Ben s'intende che si tratta di un raggruppamento nosologico all'apice dell'*iceberg* di gravità. Sempre l'EBMT ha raccolto i dati di 36 pazienti affetti da emocitopenie autoimmuni refrattarie (11): il primo trapianto fu allogenico in 9 pazienti ed autologo in 27. Dei 26 pazienti valutabili dopo l'autologo 3 morirono per TRM, 1 morì per progressione di malattia, 7 furono refrattari, 6 ebbero risposte transitorie e 9 risposte permanenti (38%). Dei 7 pazienti valutabili dopo l'allogenico 1 morì di TRM e 1 di progressione di malattia, ma 5 ebbero una remissione continuata (71%). Lo spazio non concede di trattare i risultati nella SSC e nella RA.

Stato dell'arte e considerazioni conclusive

Tutte le terapie immunosoppressive intensive si sono dimostrate efficaci nelle MAI severe, refrattarie e fortemente aggressive. Il trapianto di CSE autologhe, benefico in tante situazioni anche di emergenza, non è peraltro in grado di conseguire la tanto desiderata tolleranza. Ricerche recentissime nella MS hanno dimostrato che, sebbene il sistema immune sia alterato significativamente dopo l'autotrapianto, le caratteristiche funzionali, fenotipiche e clonali delle cellule T ricostituite portano l'impronta ("carry the imprint") del sistema immune originale che era stato inizialmente distrutto (12). Tuttavia è anche possibile prolungare la remissione utilizzando in maniera particolare il Rituximab (13).

Il trapianto allogenico, che favorisce un sistema immune "nuovo e sano" (ancorchè generalmente HLA - identico) ha indubbiamente un potenziale curativo maggiore, anche grazie all'effetto Grafi - versus - Autoimmunity (14). Tuttavia esso non abroga la componente autoantigenica, tranne nelle emielopatie autoimmuni, nelle quali l'allograpianto muta intieramente entrambe le causali dell'autoimmunità, quella antigenica e quella autoaggressiva. La dimostrazione recente che la tiroidectomia è seguita dalla graduale scomparsa degli anticorpi antitiroidei (15) è un insegnamento importante per la complessa terapia radicale delle MAI.

Bibliografia essenziale

1. Marmont AM. Perspective: Immunoablation with stem cell rescue: A possible cure for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1993; 2: 151-156.
2. Marmont AM. Coincidental autoimmune disease in patients transplanted for

- conventional indications. *Best Practice & Research, Clinical Haematology*, of 2004; 17: 223-232.
3. van Bekkum DW. Preclinical experiments. *Best Practice & Research, Clinical Haematology* 2004; 17: 201-222.
 4. Burt RK, Marmont AM. (eds): *Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease*. Landes Bioscience, Georgetown, USI 2004.
 5. Gratwohl A, Tyndall A. (eds): *Stem cell transplantation for autoimmune diseases*. *Best Practice & Research, Clinical Haematology* 2004; 17: 199-358.
 6. Burt RK, Slavin S, Burns WH, Marmont AM. Induction of tolerance in autoimmune diseases by haematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 92: 1471-1490.
 7. Petri M: Cyclophosphamide: new approaches for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13: 366-371.
 8. Mancardi GL, Saccardi R, Filippi M et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses Gadolinium-enhanced MRI activity in multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 57: 62-69.
 9. Marmont AM, Van Lint MT, Gualandi F et al. Autologous marrow stem cell transplantation for severe systemic lupus erythematosus of long duration. *Lupus* 1997.
 10. Jayne D, Passweg JR, Marmont A et al. Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004; 13: 168-176.
 11. Passweg JR, Rabusin M, Musso M et al. Haematopoietic stem cell transplantation for refractory autoimmune cytopenia. *Br J Haematol* 2004; 125: 749-755.
 12. Sun W, Popat U, Hutton G et al. Characteristics of T-cell receptor repertoire myelin - reactive T-cell reconstituted from autologous haematopoietic stem-cell grafts in multiple sclerosis. *Brain* 2004; 127: 996-1008.
 13. Moore J, Ma D, Will R et al. A phase II study of Rituximab in rheumatoid arthritis patients with recurrent disease following haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34: 241-247.
 14. Marmont AM, Gualandi F, Van Lint MT, Bacigalupo A. Refractory Evans' syndrome treated with allogeneic SCT followed by DLI. Demonstration of a graft-versus autoimmunity effect. *Bone Marrow Transplant* 2002; 31: 399-402.
 15. Chiovato L, Latrofa F, Braverman LE et al. Disappearance of humoral thyroid autoimmunity after complete removal of thyroid antigens. *Ann Intern Med* 2003; 139: 346-353.

Trapianto di cellule staminali nelle distrofie muscolari

Nereo Bresolin

Istituto di Clinica Neurologica, Milano

Le cellule staminali umane isolate dai muscoli possono rappresentare l'oggetto di uno studio preclinico per ottimare nuove strategie terapeutiche nelle distrofie muscolari. Queste cellule devono essere selezionate in origine per l'espressione di markers specifici di staminalità che il nostro gruppo ha identificato e pubblicato (Torrente et al. *J. Cell Biol* 2001). Queste cellule inoltre sono in grado di correggere il difetto muscolare dopo trapianto diretto o per via sistemica (El Fahime et al., *Exp Cell Res* 2002; Torrente et al. *J. Cell Biol* 2003). Un'importante caratteristica biologica di queste cellule che emerge da diversi studi è che le cellule staminali mostrano una importante plasticità nel loro differenziamento dando quindi la possibilità di ottenere un fenomeno di "interconversione" tra progenitori derivanti dal medesimo e/o differente foglietto embrionale. Il nostro gruppo ha inoltre isolato cellule staminali umane muscolari e circolanti in grado di differenziare correttamente in tessuto muscolare sano (Torrente et al., *J. Clin. Inv.* 2004). In questa parte di studio abbiamo messo a punto una metodica capace di isolare ed arricchire, a partire dal muscolo, il numero di cellule staminali umane AC133/CD34 doppie positive che in vitro sembra essere ben capace di differenziare in tessuto muscolare. Queste cellule si sono dimostrate capaci di esprimere markers di progenitori muscolari tramite studi di SAGE quali Pax7 marker di cellule satelliti quiescenti ed attivate (Seale et al., 2000) e Myf 5 marker di cellule satelliti attivate (Cornelison & Wold 1997). Queste cellule sono state iniettate (5×10^4) direttamente nel muscolo Tibiale Anteriore (TA) di 15 topi immunodepressi SCID. Gli animali così trattati sono stati caratterizzati 60 giorni dopo l'iniezione intramuscolare. Queste cellule sono state iniettate (5×10^4) direttamente nel muscolo Tibiale Anteriore (TA) di 15 topi immunodepressi SCID. Gli animali così trattati sono stati caratterizzati 60 giorni dopo l'iniezione intramuscolare. La differenziazione muscolare è stata testata usando i anticorpi umani. Le cellule AC133 positive muscolari umane sono capaci di formare correttamente tessuto muscolare umano. Infatti abbiamo evidenziato fibre esprimenti la distrofina umana (Dys 3) (7 + 1 per sezione). Abbiamo dimostrato quindi le capacità differenziative muscolari in vivo delle cellule staminali muscolari umane isolate in base all'espressione dell'antigene di superficie AC133.

Bibliografia

1. Y. Torrente, M. Belicchi, M. Sampaolesi, F. Pisati, M. Meregalli, G. D'Antona, R. Tonlorenzi, L. Porretti, M. Gavina, K. Mamchaoui, M. A. Pellegrino, D. Furling, V. Mouly, G.S. Butler-Browne, R. Bottinelli, G. Cossu, N. Bresolin. Human circulating AC133+ stem cells replenish the satellite cell pool, restore dystrophin expression and ameliorate function upon transplantation in murine dystrophic skeletal muscle. *Journal Clinical Investigation*, July 2004.
2. Yvan Torrente, Geoffrey Camirand, Federica Pisati, Marzia Belicchi, Barbara Rossi, Fabio Colombo, Mosthapha El Fahime, Nicolas J. Caron, Gabriela Constantin, Jacques P. Tremblay, Nereo Bresolin. Identification of a putative pathway for the muscle homing of stem cells in a muscular dystrophy model. *J. Cell. Biol.* August 2003.
3. El Fahime E, Millis P, Lafreniere JF, Torrente Y, Tremblay JP. The urokinase plasminogen activator: an interesting way to improve myoblast migration following their transplantation. *Exp Cell Res.* 2002 Nov 1; 280(2): 169-78.
4. Torrente Y, Tremblay JP, Pisati F, Belicchi M, Rossi B, Sironi M, Fortunato F, El Fahime M, D'Angelo MG, Caron NJ, Constantin G, Paulin D, Scarlato G, Bresolin N. Intraarterial injection of muscle-derived CD34(+)Sca-1(+) stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J Cell Biol.* 2001 Jan 22; 152(2): 335-48.

Possibilità di intervenire con protesi biologiche nella terapia della malattia di Parkinson

Alberto Albanese

Istituto Nazionale Neurologico "Carlo Besta", Milano

Anatomia funzionale e fisiopatologia dei sintomi nella malattia di Parkinson

Nel corso degli ultimi decenni, le conoscenze sulla neuroanatomia chimica si sono arricchite di numerosi dettagli sul funzionamento dei gangli della base e sulle loro connessioni anatomiche intrinseche ed estrinseche. Le diverse strutture che compongono i gangli della base sono altamente interconnesse con diversi circuiti a retroazione che elaborano un importante flusso di informazioni prima di reindirizzarle all'esterno dei gangli stessi. I principali nuclei dei gangli della base, che svolgono un ruolo di rilievo nel controllo motorio, sono: il nucleo caudato, il putamen, il globo pallido (parte interna e parte esterna), il nucleo subtalamico e la sostanza nera (parte compatta e parte reticolata). Nel corso degli anni recenti è stata svolta una dettagliata mappatura delle connessioni che connettono queste diverse strutture e delle proiezioni che esse hanno all'esterno dei gangli della base. Ciononostante, esistono ancora molte domande irrisolte sull'organizzazione anatomofunzionale dei gangli della base.

È oggi chiaro, che le diverse componenti dei gangli della base funzionano in modo integrato e che le alterazioni anche di una sola di esse provocano alterazioni del trasferimento dei dati all'interno dei gangli e, conseguentemente, anche all'esterno. La principale alterazione patologica della malattia di Parkinson (MP) è la degenerazione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali. Tali neuroni costituiscono l'ossatura intorno alla quale il corpo striato si assembla nel corso dello sviluppo embrionario. La perdita dei neuroni dopaminergici costituisce un fenomeno lento e progressivo, che causa variazioni sia a livello del corpo striato (ove le terminazioni dopaminergiche degenerate non stimolano più i recettori dopaminergici su cui agire), che a livello delle proiezioni afferenti alla sostanza nera (che non trovano più il sito post-sinaptico su cui normalmente agiscono) (Fig. 1). Gli assoni dei neuroni nigrostriatali sono molto lunghi; costituiscono il fascio nigrostriatale che si dirige rostralmente per diversi centimetri fino a raggiungere il corpo striato. Lì i terminali dopaminergici si sfioccano con un'arborizzazione

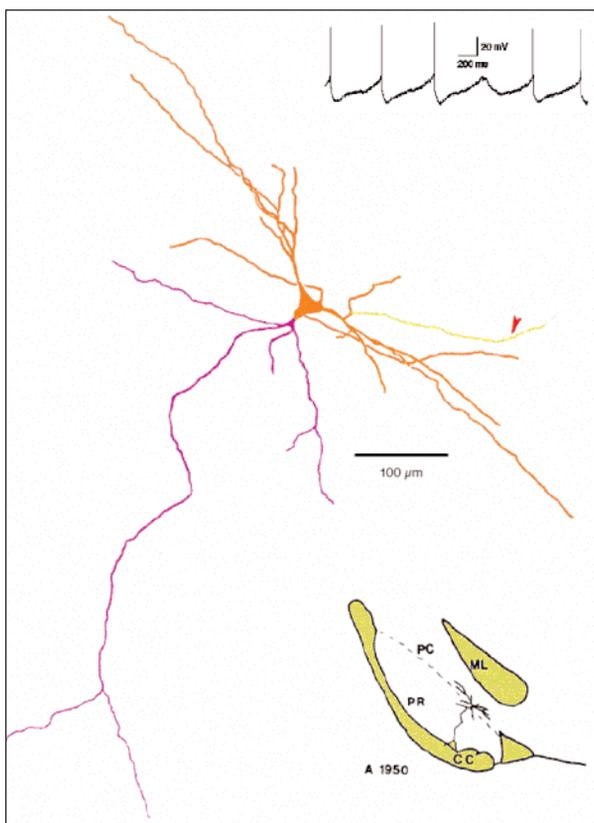


Figura 1 - Ricostruzione di un neurone dopaminergico nigrostriatale identificato con metodiche elettrofisiologiche. Il corpo cellulare e i dendriti che proiettano lateralmente sono colorati in arancio; i dendriti ventrali che proiettano nella parte reticolata sono colorati in viola; la porzione iniziale dell'assone, che è troncato e normalmente si estende fino al corpo striato, è colorata in giallo (freccia). La posizione del neurone nella regione mesencefalica è indicata in basso a destra; si nota come il dendrite color viola si estende per un'ampia porzione del mesencefalo, oltre la parte reticolata, fino al fascio corticospinale. Da (21)

molto ricca, tanto che i terminali di un singolo neurone occupano fino ad un terzo del volume del nucleo caudato o del putamen. Senza considerare la presenza dei fenomeni degenerativi all'esterno dei gangli della base (che anche caratterizzano la MP), la terapia ideale della MP consisterebbe nel ripristino dei neuroni nigrostriatali degenerati e delle loro connessioni afferenti ed efferenti.

Terapie cellulari nei pazienti con malattia di Parkinson

Uno dei veri miracoli della medicina moderna è consistito nell'introduzione della levodopa, il precursore della dopamina, nella terapia della MP. Tuttavia, fin dai primi studi clinici sulla levodopa sono state osservate complicazioni inattese, quali movimenti coreoatetotici (discinesie) e fluttuazioni da una condizione di buona mobilità (il periodo *on*), spesso accompagnato da discinesie, a uno stato di grave parkinsonismo (il periodo *off*), che compare spesso più volte nella stessa giornata. Queste complicanze sono divenute sempre più comuni e invalidanti man mano che la durata di malattia si è accresciuta e la durata dell'esposizione alla levodopa è aumentata.

Gli esperimenti basati sull'impianto di cellule dopaminergiche si sono a lungo

incentrati sulla possibilità di reinnervare direttamente il corpo striato, che è un obiettivo chirurgico facile e ha un volume ampio. Gli studi in pazienti con MP che hanno ricevuto trapianti intra-striatali di tessuto fetale mesencefalico umano, ricco di neuroni dopaminergici post-mitotici, hanno fornito la prova del principio che, dal punto di vista tecnico, la reintegrazione di neuroni può funzionare nel cervello dell'uomo. I neuroni trapiantati sopravvivono e reinnervano lo striato per almeno 10 anni nonostante non sia interrotto il processo morboso in corso, che distrugge i neuroni dopaminergici propri del paziente (1;2). I trapianti sono in grado di normalizzare la liberazione striatale di dopamina (2) e di annullare la riduzione di attivazione corticale, che è il correlato funzionale dell'acinesia (3). In sostanza, i neuroni dopaminergici trapiantati possono integrarsi funzionalmente nei circuiti nervosi del cervello (3). Diversi studi in aperto hanno riferito del beneficio clinico (4;5). In alcuni casi i pazienti hanno potuto interrompere per diversi anni la terapia con levodopa e riprendere una vita indipendente (2).

Due recenti studi controllati con impianto chirurgico vero o finto hanno invece mostrato solo miglioramenti modesti (6;7), indicando così che le metodiche di impianto cellulare attualmente impiegate sono lungi dall'essere ottimali. È possibile spiegare la pochezza dei risultati di uno di questi due studi con l'esiguità del numero di neuroni trapiantati e sopravvissuti (6) a paragone di quanto osservato negli studi in aperto (1;8;9). Nell'altro dei due studi, invece, al momento dell'arruolamento i pazienti erano in condizioni di disabilità alquanto grave e quindi presentavano presumibilmente un quadro degenerativo più esteso. Infine, l'immunosoppressione attuata nei pazienti dei due studi controllati è stata di breve durata o assente, il che costituisce una variabile non secondaria.

Un aspetto importante è dato dalla scoperta, effettuata per la prima volta mediante gli studi controllati, che dopo il trapianto possono svilupparsi discinesie (7;10), che sono invalidanti nel 7-15% dei pazienti trapiantati (6;7;10). Si ritiene che questo effetto collaterale non sia causato da un'eccessiva crescita di terminali dopaminergici (7;10;11), ma piuttosto da una irregolarità di reinnervazione (11), che causa livelli bassi o intermedi di dopamina in alcuni punti dello striato, o dalla presenza di una risposta immunitaria e infiammatoria cronica intorno al trapianto (7). Un'interpretazione alternativa è che le discinesie indotte dal trapianto possano essere spiegate con una composizione sfavorevole del tessuto impiantato in rapporto al contenuto cellulare prevalente: neuroni dopaminergici provenienti dalla sostanza nera, neuroni dopaminergici provenienti dall'area segmentale ventrale, neuroni non dopaminergici (12).

Neurostimolazione nei pazienti con malattia di Parkinson

Nel 1995, un gruppo di ricercatori di Grenoble, in Francia, hanno per la prima volta osservato che la "sindrome da levodopa" rispondeva alla stimolazione ad alta frequenza del nucleo subtalamico (13) (Fig. 2). Da allora, numerosi altri gruppi hanno confermato questa osservazione. È rimasta, però, a lungo un'incertezza rispetto alla durata di efficacia di questo approccio, finché non è stato osservato che i risultati osservati a breve termine permangono anche 5 anni dopo l'im-

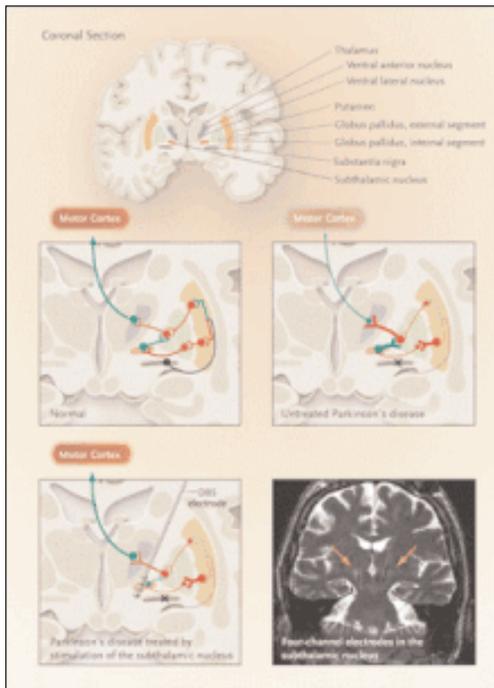


Figura 2 - Malattia di Parkinson e stimolazione del nucleo subtalamico. La sezione coronale mostra la localizzazione dei nuclei dei gangli della base che sono implicati nella malattia di Parkinson. Gli schemi anatomici illustrano in modo molto semplificato le connessioni dei gangli della base. Le linee rosse mostrano le connessioni inibitorie, le linee verdi quelle eccitatorie. Lo spessore delle linee indica il livello di attività in rapporto alla condizione normale. La stimolazione del nucleo subtalamico può risultare nella normalizzazione delle proiezioni efferenti inibitorie dalla parte interna del globo pallido al talamo e quindi così causare il miglioramento dei sintomi parkinsoniani. La figura illustra una delle possibili spiegazioni di questo effetto: l'inibizione di un nucleo subtalamico reso iperattivo dalla malattia. Le sezioni coronali di risonanza magnetica mostrano la localizzazione degli elettrodi con quattro contatti (freccie) impiantati bilateralmente nel nucleo subtalamico. Abbreviazioni: DBS, stimolazione cerebrale profonda. Da (22)

pianto (14). In questi pazienti si osserva un marcato miglioramento delle condizioni motorie che rispondono alla levodopa, senza gli effetti collaterali della terapia con levodopa. Le discinesie indotte da levodopa sono migliorate considerevolmente e sono spesso scomparse, soprattutto poiché le dosi di farmaci dopaminergici sono state ridotte.

I risultati a lungo termine hanno però anche mostrato che non tutti i sintomi parkinsoniani migliorano con l'impianto di neurostimolatori profondi. I pazienti hanno sviluppato nel corso degli anni alcuni sintomi refrattari alla neurostimolazione, quali instabilità posturale, la *freezing* della marcia, difficoltà della parola, e acinesia. Inoltre, la metodica espone al rischio di complicanze psichiatriche, quali ipomania, apatia e depressione (15).

Come sviluppare una terapia con protesi biologiche nella malattia di Parkinson

Una terapia cellulare che possa essere utilmente impiegata in clinica deve fornire vantaggi tangibili rispetto le terapie correnti per la MP. Le terapie cellulari devono produrre miglioramenti rilevanti e di lunga durata delle condizioni motorie e devono curare le discinesie. In alternativa, le nuove terapie cellulari devono essere in grado di migliorare i sintomi non controllati con altri trattamenti, ad esempio l'impegno posturale. I miglioramenti clinici osservati dopo il trapianto di cellule fetali (4;6;7) non hanno superato (né almeno eguagliato) gli effetti prodotti

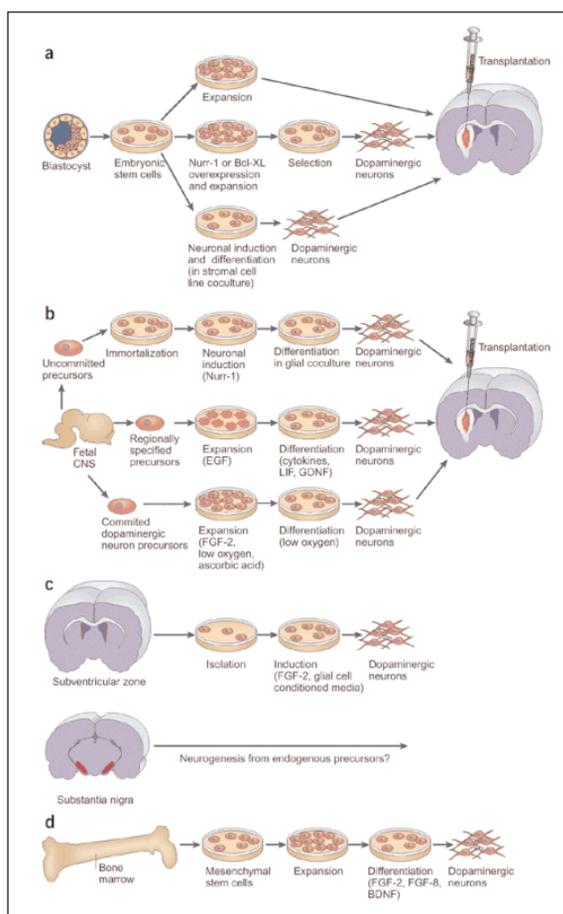


Figura 3 - Generazione di neuroni dopaminergici per la malattia di Parkinson. È illustrato il cervello di un ratto, nel cui neostriato vengono impiantate cellule staminali embrionali (a), cellule staminali da tessuto fetale (b), cellule staminali provenienti da cervello adulto (c) o da altri tessuti. Da (23).

dall'impianto di neurostimolatori profondi (14), e non vi è evidenza che possano migliorare i sintomi resistenti alla terapia farmacologica (4). È possibile che i risultati solo parzialmente soddisfacenti ottenuti finora con gli impianti cellulari siano conseguenti al fatto che lo striato è reinnervato soltanto parzialmente (4;9). D'altra parte, però, anche negli esperimenti con animali, in cui si ottiene una reinnervazione adeguata dello striato, i miglioramenti osservati sono soltanto parziali (16); ciò induce a supporre che sia proprio la scelta di effettuare l'impianto in una sede ectopica (quale lo striato) la causa del parziale insuccesso. In effetti, è stato osservato in animali da esperimento che è possibile ottenere miglioramenti clinici mediante trapianti posizionati nella sostanza nera (16;17); questa procedura, che è stata tentata anche in clinica (18), non è in grado di ricostruire la via nigrostriatale (16).

In linea di principio, l'uso di cellule staminali può agevolmente rimpiazzare gli impianti di tessuto mesencefalico (Fig. 3); si ritiene, però, che tale tipo di impianti ponga problemi e abbia limiti del tutto analoghi a quelli evidenziati dagli studi

Tab. 1 - Possibili meccanismi funzionali responsabili del miglioramento clinico osservato dopo trapianto cellulare.

Meccanismo	Modo d'azione
Danno tissutale	Stimolazione delle risposte plastiche dell'ospite indotta dall'infiammazione
Correzione del deficit biochimico	Interferenza con l'attività neurale dell'ospite
Secrezione di fattori di crescita	Liberazione di neurotrasmettitori mancanti (effetto "minipompa")
Reinnervazione locale	Stimolazione delle risposte plastiche e miglioramento della sopravvivenza e del funzionamenti dei neuroni dell'ospite
Ricostruzione dei circuiti nervosi	Restaurazione della capacità di liberare trasmettitori sinaptici
	Ristabilimento di connessioni afferenti ed efferenti funzionali

clinici basati sull'uso di tessuto embrionario. L'esperienza accumulata nel campo degli impianti cellulari per la malattia di Parkinson può essere riassunta finora in pochi dati essenziali. La linea di ricerca preclinica è stata avviata oltre trenta anni fa ed ha dato risultati molto interessanti sul piano scientifico, ma del tutto inadeguati sul piano clinico. Le sperimentazioni cliniche sono state condotte inizialmente fuori delle tradizionali metodologie degli studi controllati e randomizzati. I risultati di quest'ultimo tipo di studi non hanno confermato le osservazioni degli studi in aperto ed hanno anzi permesso di osservare la comparsa di un importante effetto collaterale, costituito dalle discinesie.

All'opposto, la scoperta della neurostimolazione profonda si è sviluppata direttamente sull'uomo, senza una fase di ricerca animale preliminare, e ha portato risultati clinici eccellenti e in breve tempo. Il confronto tra i due approcci non regge e fa sorgere il dubbio che l'approccio cellulare nella MP sia limitato da ragioni precipuamente anatomiche. Per questa ragione, non sorprende che oggi si dedichi molto impegno all'uso di fattori trofici in grado di arrestare (o perfino prevenire) a degenerazione dei neuroni dopaminergici. I primi esperimenti con liatermina (GDNF) in condizioni di sperimentazione aperta hanno fornito risultati incoraggianti (19), ma un successivo studio controllato di fase II non ha confermato le aspettative (20). Sembra replicarsi la discrepanza osservata a proposito degli impianti cellulari tra studi in aperto e studi controllati. Questi dati nel loro insieme indicano, pertanto, che è indispensabile attuare una corretta metodologia clinica per poter dimostrare l'efficacia delle protesi biologiche nella malattia di Parkinson e in altre malattie neurodegenerative.

Bibliografia

1. Kordower JH, Freeman TB, Snow BJ, Vingerhoets FJ, Mufson EJ, Sanberg PR et al. Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1995; 332: 1118-1124.
2. Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O et al. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 1999; 2: 1137-1140.

3. Piccini P, Lindvall O, Bjorklund A, Brundin P, Hagell P, Ceravolo R et al. Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann Neurol* 2000; 48: 689-695.
4. Lindvall O, Hagell P. Clinical observations after neural transplantation in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2000; 127: 299-320.
5. Polgar S, Morris ME, Reilly S, Bilney B, Sanberg PR. Reconstructive neurosurgery for Parkinson's disease: a systematic review and preliminary meta-analysis. *Brain Res Bull* 2003; 60: 1-24.
6. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 710-719.
7. Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 54: 403-414.
8. Kordower JH, Freeman TB, Chen EY, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA et al. Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 13: 383-393.
9. Kordower JH, Rosenstein JM, Collier TJ, Burke MA, Chen EY, Li JM et al. Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies. *J Comp Neurol* 1996; 370: 203-230.
10. Hagell P, Piccini P, Bjorklund A, Brundin P, Rehncrona S, Widner H et al. Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2002; 5: 627-628.
11. Ma Y, Feigin A, Dhawan V, Fukuda M, Shi Q, Greene P et al. Dyskinesia after fetal cell transplantation for parkinsonism: a PET study. *Ann Neurol* 2002; 52: 628-634.
12. Isacson O, Bjorklund LM, Schumacher JM. Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells. *Ann Neurol* 2003; 53(Suppl. 3): S135-S146.
13. Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E et al. Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 1995; 345: 91-95.
14. Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, Ardouin C et al. Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003; 349: 1925-1934.
15. Romito LM, Raja M, Daniele A, Contarino MF, Bentivoglio AR, Barbier A et al. Transient mania with hypersexuality after surgery for high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2002; 17: 1371-1374.
16. Winkler C, Kirik D, Bjorklund A, Dunnett SB. Transplantation in the rat model of Parkinson's disease: ectopic versus homotopic graft placement. *Prog Brain Res* 2000; 127: 233-265.
17. Mukhida K, Baker KA, Sadi D, Mendez I. Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral,

- and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *J Neurosci* 2001; 21: 3521-3530.
18. Mendez I, Dagher A, Hong M, Gaudet P, Weerasinghe S, McAlister V et al. Simultaneous intrastriatal and intranigral fetal dopaminergic grafts in patients with Parkinson disease: a pilot study. Report of three cases. *J Neurosurg* 2002; 96: 589-596.
 19. Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 2003; 9: 589-595.
 20. GDNF Withdrawn by Manufacturer; A vs B in CD (ANA 2004). <http://www.mdvu.org/efove/article.asp?ID=762>. 2004.
 21. Tepper JM, Sawyer SF, Groves PM. Electrophysiologically identified nigral dopaminergic neurons intracellularly labeled with HRP: light-microscopic analysis. *J Neurosci* 1987; 7: 2794-2806.
 22. Lang AE. Subthalamic stimulation for Parkinson's disease-living better electrically? *N Engl J Med* 2003; 349: 1888-1891.
 23. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 2004; 10(Suppl.): S42-S50.

Treatment of ischemic heart disease with adult stem cells

Christof Stamm, MD

University of Rostock, Department of Cardiac Surgery, Germany

Cardiovascular diseases, especially ischemic heart disease, remain the No. 1 cause of death in industrialised countries. When preventive measures fail and myocardial infarction occurs, myocardium is subject to - supposedly - irreversible necrosis. Because the consequences are often hazardous, strategies for regeneration of necrotic myocardium are under intensive investigation. One of the most promising approaches is the implantation of progenitor cells or pluripotent stem cells in infarcted myocardium. The ability of bone marrow-derived adult stem cells to trans-differentiate into cells of various target-organ phenotypes is a matter of current and very controversial discussion. While accumulating evidence obtained in a variety of experimental models as well as clinical pilot studies clearly indicates that adult stem cells can indeed improve heart function after myocardial infarction, the cellular mechanism remains unclear. The initial euphoria regarding the capacity of unmodified bone marrow or blood-derived stem cells to trans-differentiate into cells of cardiomyocyte phenotype has faded. A beneficial impact on angiogenic processes in ischemic tissue is more consistently observed, but it remains controversial whether this reflects true stem cell trans-differentiation along the angiogenesis axis, growth factor and cytokine release by stem cells, stress response of the target tissue to implanted cells, or a combination of those.

Since 2001, our group focuses on myocardial transplantation of hematopoietic stem cells that are injected in the infarct border zone of patients with previous myocardial infarction who undergo an aorto-to-coronary bypass operation. So far, we have treated 27 patients and observed a significant improvement of regional myocardial blood flow as well as increased global left ventricular contractility, without procedure-related complications. Based on our successful phase-I dose-escalation safety trial, we recently started a controlled phase II trial that will facilitate assessment of the clinical efficacy of myocardial stem cell therapy.

Cellule staminali come cura per l'insufficienza renale acuta

Marina Morigi

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri

Le cellule staminali adulte sono state identificate in diversi tessuti dell'organismo come una sottopopolazione cellulare capace di mantenere, generare e sostituire cellule differenziate in risposta a processi di rinnovamento cellulare fisiologico o in seguito a danno tissutale. Poco è noto circa la presenza di cellule staminali nel rene adulto, ma è stato documentato che in particolari condizioni, come per esempio durante l'insufficienza renale acuta, il rene può rigenerare se stesso attraverso un processo di proliferazione delle cellule renali residenti. L'origine di queste cellule non è stato ancora ben definita ma si ipotizza che possano essere progenitori cellulari o cellule staminali renali mantenute fin dalle fasi più precoci della nefrogenesi. Inoltre recenti evidenze sia nei pazienti che nei modelli sperimentali animali indicano che cellule di origine extrarenale, le cellule staminali del midollo osseo, sono in grado di migrare al sito di danno, differenziare e promuovere la riparazione strutturale del tessuto tubulare renale danneggiato durante il processo di l'ischemia e riperfusione del rene.

La notevole plasticità delle cellule staminali isolate dal midollo osseo ci ha spinto a valutare la possibilità che cellule staminali mesenchimali potessero rappresentare una cura per l'insufficienza renale acuta indotta da cisplatino in un modello murino. I risultati hanno mostrato che la somministrazione di cellule mesenchimali staminali, isolate dal midollo di topi maschi, proteggeva in modo rilevante dalla perdita di funzione renale e dal danno tubulare osservato in topi femmina trattati con cisplatino. Cellule positive per il cromosoma Y e per la lectina *Lens culinaris* sono state identificate nell'epitelio tubulare renale indicando che le cellule mesenchimali staminali si localizzavano nel rene danneggiato e differenziavano in cellule epiteliali tubulari, ristabilendo la struttura e la funzione renale. Inoltre, il trattamento con le cellule staminali accelerava la proliferazione delle cellule tubulari in risposta al danno da cisplatino. Questi risultati aprono nuove prospettive per esplorare nell'uomo la possibilità che le cellule mesenchimali staminali, grazie alla loro capacità renotropica e al loro potenziale rigenerativo, abbiano un ruolo nel trattamento dell'insufficienza renale acuta.



Tipografia Viscontea
Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382/526253 r.a. - Fax 0382/423120

