



**Collegio Ghislieri**

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

*Progetto "Progressi in Biologia e Medicina"*

---

*8° Corso di formazione avanzata*

**Cellule staminali e medicina rigenerativa 2009:  
attualità e prospettive**

16 - 20 marzo 2009, Collegio Ghislieri, Pavia

*A cura di Carlo Bernasconi*

*8° Corso di formazione avanzata*

**Cellule staminali e medicina rigenerativa 2009:  
attualità e prospettive**





**Collegio Ghislieri**

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

*Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”*

---

*8° Corso di formazione avanzata*

**Cellule staminali e medicina rigenerativa 2009:  
attualità e prospettive**

16 - 20 marzo 2009, Collegio Ghislieri, Pavia

*A cura di Carlo Bernasconi*

© Copyright 2009



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

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

Prefazione ..... pag. IX

## Attualità sulle cellule staminali

1. Cellule staminali: progresso delle conoscenze ..... » 3  
*Carlo Alberto Redi*
2. Telomeri e invecchiamento cellulare ..... » 9  
*Fabrizio d'Adda di Fagagna*

## Cellule staminali somatiche

3. Il sistema delle cellule staminali del midollo osseo ..... » 13  
*Gianluigi Castoldi, Gian Matteo Rigolin*
4. Il modello delle cellule staminali ematopoietiche:  
meccanismi di self-renewal ..... » 22  
*Sergio Ferrari*
5. Cellule staminali tessuto-specifiche ..... » 31  
*Carlo Bernasconi*

## Il trapianto di midollo osseo: 50 anni dopo

6. Nicchie di cellule staminali nel midollo osseo e meccanismi  
della loro mobilizzazione ..... » 37  
*Carlo Bernasconi*
7. Strategie per l'induzione della tolleranza nei trapianti allogenici ..... » 44  
*Franco Aversa*
8. NK cell immunotherapy in haploidentical transplantation ..... » 50  
*Andrea Velardi*
9. Importanza clinica della malattia minima residua post-trapianto ..... » 57  
*Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano,  
Silvia Calatroni, Barbara Rocca, Ilaria Giardini, Rita Zappatore,  
Irene Dambrosio, Marilena Caresana*

10. Priming dei linfociti del donatore come vaccinoterapia per il ricevente ..... » 73  
*Rita Maccario*
11. Terapia cellulare per le malattie autoimmuni ..... » 80  
*Riccardo Saccardi, M. Di Gioia, P. Maggi*
12. Il trapianto per via intra-ossea di cellule di cordone ombelicale (CBT) consente di superare il problema del mancato/ritardato attecchimento nei pazienti adulti con neoplasie ematologiche anche in presenza di bassa cellularità e disparità HLA ..... » 87  
*Francesco Frassoni, Marina Podestà, Francesca Gualandi, Anna Maria Raiola, Teresa Lamparelli, GianLuca Ubezio, Riccardo Varaldo, Marco Gobbi, Nicoletta Sacchi, Myriam Labopin, Andrea Bacigalupo*
13. Trapianto allogenico di midollo osseo: passato, presente e futuro ..... » 91  
*Alberto Bosi, Benedetta Bartolozzi*

### **Riparazione delle ferite e rigenerazione dei tessuti**

14. Progenitori postnatali e riparazione dei tessuti mesodermici ..... » 99  
*Paolo Bianco*
15. Caratterizzazione e induzione di pre-adipociti umani ..... » 102  
*Edoardo Raposio, Chiara Guida, Eleonora Canini*
16. Cellule staminali midollari e riparazione del danno tissutale ..... » 106  
*Roberto M. Lemoli*
17. Impiego di cellule staminali del midollo osseo e del tessuto adiposo per la ricostruzione ossea..... » 115  
*Francesco Benazzo, G. Gastaldi, M.G. Cusella De Angelis, G. Magenes, L. Visai, E. Saino, L. Fassina*
18. Le norme di buona fabbricazione per l'impiego di cellule staminali a scopo terapeutico..... » 124  
*Paolo Rebutta, Rosaria Giordano, Francesca Chelli, Valentina Parazzi*

### **Cellule staminali e rigenerazione del miocardio**

19. Quali cellule utilizzare per la rigenerazione del miocardio? ..... » 131  
*Caterina Frati, Gallia Graiani, Costanza Lagrasta, Francesca Ferraro, Mirca Lazzaretti, Alice Belletti, Francesco Fagnoni, Eugenio Quaini, Lucia Prezioso, Carlotta Reni, Roberto Sala, Federico Quaini*

20. Differenziazione delle cellule staminali verso il fenotipo cardiomiocitario ..... » 133  
*Antonio Paolo Beltrami*
21. Neoformazione vascolare e riparazione del danno miocardico .... » 138  
*Paolo Madeddu*
22. Segnali di danno e funzione delle cellule staminali nell'infarto miocardico acuto e nell'insufficienza cardiaca cronica ..... » 142  
*Maurizio C. Capogrossi*
23. Il rischio di aritmia nella terapia cellulare del danno miocardico ..... » 147  
*Carlo Napolitano*
24. Effetti paracrini esercitati dalle cellule staminali nella riparazione del danno miocardico..... » 150  
*Massimiliano Gnechi, Elisabetta Cervio, Patrizia Danieli*
25. La terapia cellulare della cardiopatia ischemica ..... » 162  
*Giulio Pompilio*
26. Prospettive di terapia cellulare in cardiologia ..... » 167  
*Ciro Indolfi, Sabato Sorrento, Iolanda Aquila, Daniele Torella*

### **Cellule staminali e riparazione di altri organi e tessuti**

27. Cellule staminali per riparare un danno renale ..... » 177  
*Marina Morigi, Barbara Imberti e Cinzia Rota*
28. Terapia cellulare per il diabete mellito di tipo 1 ..... » 184  
*Lorenzo Piemonti*
29. Ruolo delle cellule staminali mesenchimali nella terapia della sclerosi laterale amiotrofica ..... » 192  
*Franca Fagioli, Ivana Ferrero, Katia Mareschi, Deborah Rustichelli, Madalina Mereuta, Alessandro Vercelli, Letizia Mazzini*



# Prefazione

La capacità della maggior parte dei tessuti a rigenerare deriva dalle cellule staminali; ma, fatta eccezione per gravi malattie ematologiche, ci sono tuttora grandi ostacoli all'impiego clinico di terapie basate sulle cellule staminali.

Infatti, se nella seconda metà del secolo scorso il trapianto di midollo osseo ha rappresentato l'inizio clinico della medicina rigenerativa, il progresso delle conoscenze biologiche sulle cellule staminali ottenuto nell'ultimo decennio in colture cellulari e modelli sperimentali è stato enorme; tuttavia, prima di poter attuare una sicura ed efficace terapia rigenerativa cellulare rimangono ancora irrisolti parecchi problemi, differenti nei vari ambiti di applicazione.

Si tratta di problemi importanti che, considerando anche le attuali aspettative da parte dell'opinione pubblica, coinvolgono fortemente le responsabilità del Ricercatore.

Nell'affrontare la trattazione dell'argomento è stato quindi seguito il seguente criterio: fornire innanzitutto le più aggiornate conoscenze di ordine biologico sulle cellule staminali; riesaminare il percorso del trapianto del midollo osseo nei 50 anni dalla sua introduzione, discutendone soprattutto gli aspetti attuali e i problemi ancora aperti; analizzare i meccanismi di riparazione delle ferite e di rigenerazione dei tessuti, ed anche quelli coinvolti nell'invecchiamento cellulare; come modello di medicina rigenerativa considerare quello della terapia cellulare in cardiologia, sia per l'enorme sforzo di ricerca sperimentale e clinica negli ultimi anni in questo settore, sia per la grande importanza sociale dell'argomento; infine, considerare brevemente l'impiego delle cellule staminali nella riparazione di altri organi e tessuti.

Il razionale generale di tutto il Corso è quello di volere "andare al sodo" per ogni singolo argomento trattato. In altre parole che ogni partecipante al Corso, e lettore di questo volume di atti, possa trarre obiettive informazioni sullo stato attuale delle conoscenze, ed avere elementi precisi per distinguere la realtà dalla speranza.

Guida sicura in questo difficile percorso sono i Docenti particolarmente qualificati, che a nome del Collegio Ghislieri e mio personale ringrazio per aver con generosità e puntualità affrontato la fatica alla quale li abbiamo invitati.

*Carlo Bernasconi*

Pavia, 16 marzo 2009



**ATTUALITÀ  
SULLE CELLULE STAMINALI**



# Cellule staminali: progresso delle conoscenze

*CarloAlberto Redi*

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università di Pavia, Direttore Scientifico Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

## **Nuovi sviluppi nell'analisi delle cellule staminali**

Da circa dieci anni la ricerca sulle cellule staminali (SC) cerca di far luce sui meccanismi molecolari alla base della staminalità, quella singolare proprietà delle cellule che permette loro di rinnovarsi in modo permanente mentre, contemporaneamente, vanno incontro a specifici programmi di differenziazione cellulare. Così, a partire dagli approcci storici prevalentemente dovuti alle conoscenze legate agli studi sulla ematopoiesi si è via via giunti a comprendere che la staminalità è una funzione più che una caratteristica temporalmente legata ad un gruppo di cellule ed in un momento fisiologico di un tessuto. Ciò ha costituito una svolta paradigmatica nelle riflessioni sulle strategie da impiegarsi per giungere ad ottenere quantità utili (per le terapie) di cellule, di tipi cellulari specifici, per la sostituzione di quelle danneggiate o morte a causa sia di processi fisiologici o patologici o traumatici.

Il cambio di paradigma concettuale ha avuto conseguenze chiare per la biologia delle SC: dalla ricerca di sempre nuovi sorgenti di SC (a partire da quelle classicamente conosciute) si è giunti alla convinzione che sia possibile evocare la staminalità anche in cellule terminalmente differenziate grazie all'impiego di alcuni geni (con lo sviluppo di tutta una serie di protocolli basati sull'impiego di virus per la loro introduzione *de novo* nella cellula) o di miscele di fattori citoplasmatici estratti da cellule uovo o da cellule staminali embrionali (ES). Prendendo a prestito alcune nozioni fondamentali da altre discipline si è inoltre capito che la staminalità è frutto della interazione genoma-ambiente: vale per tutti l'esempio del paradigma *nicchia* delle SC, concetto derivato dalla ecologia dei sistemi. Grazie a questa contaminazione di saperi si è capito, per analogia con l'ecologia dei sistemi, che ciò che diviene cruciale per il mantenimento o l'acquisizione della staminalità da parte di una cellula è l'interazione tra la cellula ed il suo microambiente.

## Geni specifici delle cellule staminali e self-renewal

La ricerca dei fattori legati alla pluripotenza ed alla capacità di rinnovo (la ricerca della fontana della giovinezza!) iniziò con l'impiego di studi di genomica funzionale tesi ad individuare i patterns di espressione di geni che potessero in qualche modo essere legati alla funzione di staminalità (studio dei fenotipi knockout). Con scarso successo! Alcuni anni orsono si passò, grazie all'impiego di tecnologia microarrays, ad analizzare la espressione genica in diverse linee embrionali (sia SC che ES) con la idea, necessaria ma quanto mai naïve (*a posteriori*), che un semplice diagramma di Venn avrebbe permesso di identificare quei geni (separabilmente solo pochissimi) sempre presenti nel caratterizzare la staminalità delle linee cellulari studiate: ne risultarono migliaia! ed anche le analisi più stringenti lasciarono sul campo diverse centinaia di geni coinvolti. Le lunghe liste di geni presenti nelle linee di staminali, e meno rappresentati nelle linee non-staminali esaminate, diedero però un altro importante risultato (come spesso accade nella ricerca): suggerirono una gerarchia di rilevanza dei geni certamente coinvolti nella staminalità indicando un attivo ruolo per altri geni che non si riteneva potessero essere coinvolti.

È così che si chiari il coinvolgimento di geni certamente stemness, quali Oct3/4 e Sox2, come pure quello di proto-oncogeni, c- e N-myc, nella staminalità. E si poterono attuare studi tesi a chiarire il ruolo di ciascuno di questi geni. Per esempio, il ruolo dei geni c- e N-myc risultò chiaro da studi su topi knockout come essenziale per lo sviluppo corretto delle SC neurali; inoltre, c-myc risultò influenzare lo sviluppo delle SC ematopoietiche. Senza questi studi non sarebbe possibile comprendere l'avanzamento delle conoscenze che ha portato a quella che è forse la più rilevante delle scoperte recenti: l'impiego, da parte di Yamanaka, dei *fantastici quattro* (due dei meglio conosciuti fattori di staminalità, Oct3/4 e Sox2, ed anche due novità, Klf4 e c-myc) per indurre la pluripotenza in cellule terminalmente differenziate.

Questo avanzamento delle conoscenze ha enormi implicazioni terapeutiche per la medicina rigenerativa poichè apre le porte alle *terapie personalizzate*. Le prime linee di cellule indotte alla pluripotenza (cellule iPS) non presentavano la capacità di contribuire alla linea germinale: ora siamo in grado di produrre linee di iPS capaci di una simile operazione, sempre impiegando gli stessi quattro fattori ma con l'aggiunta della espressione di Nanog. Quest'ultimo contribuisce fondamentalmente a modificazioni epigenetiche della conformazione della cromatina (sebbene in un modo ancora poco chiaro), permettendo una accessibilità diversa alla espressione di altri geni, aprendo cioè la via a quella regolazione della staminalità basata sulle circuiterie geniche. In base a questa regolazione è possibile comprendere come un gene (Oct4) possa essere necessario alla funzione di staminalità, un altro (Nanog) non essere indispensabile *per se*, ma necessario, ad esempio, per la riprogrammazione piena delle funzioni del genoma verso la staminalità. Ed ancora, comprendere i ruoli duali che altri geni possono svolgere: è questo il caso di c-myc. Quest'ultimo è soprannominato il "Dr. Jekyll/Mr. Hyde" della riprogrammazione genetica.

Un minimo livello di espressione di c-myc è essenziale per la crescita rigenerativa di un tessuto basata sull'attivazione del suo comparto staminale; comunque, anche solo un piccolo eccesso di questa espressione, sia endogena che esogena, può causare la formazione di tumori nelle SC trapiantate, probabilmente promuovendo la formazione di SC cancerose (per ovviare a quest'ultimo pericolo senza rinunciare alla necessaria espressione del proto-oncogene è possibile ricorrere alla sua espressione condizionata con un sistema inducibile, un costrutto transgenico controllata da sensibilità alla tetraciclina). Il ruolo di c-myc è di estremo interesse per capire i molti problemi ancora in studio della Biologia delle SC; per questo saranno analizzati in dettaglio. È possibile riassumerli brevemente indicando i tre modelli proposti ad oggi per comprenderne il ruolo sulla base della domanda di base: come è possibile che un proto-oncogene possa contribuire alla pluripotenzialità!? Ebbene, si ritiene che possa:

- 1) indurre un ciclo cellulare SC-specifico per il rinnovo (self-renewal);
- 2) indurre la modificazione di programmi epigenetici capaci di promuovere la dedifferenziazione o di bloccare la ulteriore differenziazione cellulare;
- 3) selezionare una rara popolazione di cellule prona al rinnovo.

Questi tre modelli non sono mutualmente esclusivi ma, anzi, alcuni specifici aspetti di ciascuno di essi possono essere integrati in una visione complessiva del ruolo di c-myc.

### **Riprogrammazione terapeutica delle funzioni del genoma**

L'ottenimento di cellule iPS "OSKC" (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) è una delle due strategie di riprogrammazione disponibili per generare SC pluripotenti adatte alle terapie di medicina rigenerativa "personalizzate". L'altra è la classica via del trasferimento nucleare di nuclei di cellule terminalmente differenziate (clonazione terapeutica). L'insieme delle due strategie è utile per capire quali siano i fattori cruciali in gioco e per capire la cascata di eventi che si accende nel momento in cui si rimodella la cromatina e si accende la riprogrammazione genetica del nucleo. I dati più recenti portano a formulare la seguente cascata: entro 2-3 giorni dalla induzione di cellule OSKC viene represso il gene Thy1 (specifico dei fibroblasti); a ciò consegue la sovraespressione della fosfatasi alcalina e del gene SSEA1 (Stage Specific Embryonic Antigen1) tra il 3 e il 4 giorno e quella di Oct4 tra il 10 e il 12 giorno. Poco dopo la attivazione di Oct4 la espressione esogena di OSKC decresce. Quest'ultimo evento pare essere la pietra miliare che marca l'irreversibile inizio della riprogrammazione epigenetica verso l'acquisizione del fenotipo iPS. In altre parole, gli eventi che governano la transizione dal fenotipo somatico a quello di iPS avvengono nello spazio temporale di 10-12 giorni dall'iniziale stimolo. Questo è quanto, in breve, è oggi noto.

È chiaro che 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. Tutti questi scenari sono sempre più presenti nelle prospettive delle ricerche sulle SC ed attuali nella ricerca di terapie paziente-specifiche (il definitivo traguardo delle terapie di medicina rigenerativa basate sull'impiego di SC).

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, Embryonal Germ Cells) 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 SC 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 SC 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 era già fortemente auspicata 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](http://www.doh.gov.uk)) per la ricerca sulle SC, aveva già sottolineato il fatto che il sostegno alla ricerca sul differenziamento cellulare al fine di ottenere cellule e tessuti fosse centrale per lo sviluppo delle politiche sanitarie basate sulla medicina rigenerativa. 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 sempre più 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 muscoloscheletriche (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 embrio/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. E sarà la via delle iPS (ottenute per trasduzione virale dei geni stemness o per azione dei citoplasti: incoraggianti anche queste ultime tecniche che saranno presentate in dettaglio: la loro resa è nell'ordine di quella della trasduzione virale!) quella che probabilmente porterà a soluzione il dibattito etico sull'impiego delle ES.

## **Il futuro della ricerca sulle cellule ES**

Uno dei fattori essenziali nel futuro delle ricerche sulle SC sarà senza dubbio il ruolo svolto dagli USA, al di là di specifici aspetti di indirizzi di ricerca. Ad oggi,

il paese che è tradizionalmente leader nella ricerca scientifica è stato bloccato da scelte di tipo politico con la storica decisione del 9 Agosto 2001 da parte del presidente George W. Bush di concedere ai National Institutes of Health (NIH) fondi federali solo per le ricerche su linee ES già esistenti a quella data. La comunità scientifica internazionale, in definitiva, è stata bloccata da scelte di tipo politico, giuste o sbagliate che siano, condivisibili o meno. È una realtà il fatto che gli USA non hanno contribuito, come è loro abitudine, in modo sostanziale nell'avanzamento delle conoscenze. E dunque, l'elezione di Barack Obama con la proclamata intenzione di cancellare tale proibizione viene ad assegnare un ruolo di prima importanza all'NIH, con i suoi 30 miliardi di dollari di bilancio. Ad oggi solo 3-4 linee di ES possono essere studiate con fondi NIH: dai prossimi mesi sarà possibile anche a livello federale compiere studi che già a livello di singoli stati vengono portati avanti con fondi privati e su basi regolatorie molte frammentate. Ci si augura che gli NIH siano ora in grado di promuovere un necessario censimento di ciò che sta già svolgendosi negli USA, su quali basi di legislazione, quali siano le più gravi lacune di studi da realizzarsi, per poter svolgere un ruolo di primo piano nel coordinamento delle ricerche, nella assegnazione dei fondi e nello stabilire le priorità di ricerca su questioni ancora del tutto non risolte nell'ambito della Biologia delle SC:

- a) Quante cellule sono al minimo capaci di indurre la formazione di un tumore?
- b) Quando e come è definibile una cellula essere pluripotente? In che modo può variare lo stato di pluripotenza?
- c) Come è possibile impiegare modelli animali per predire il comportamento di SC in pazienti umani?

### **Bibliografia essenziale**

1. Knoepfler PS. (2008). Why Myc? An Unexpected Ingredient in the Stem Cell Cocktail. *Cell Stem Cell*. 2, 18-21.
2. Spencer Currel D. and Gilbertson RJ. The Niche Revealed. *Cell Stem Cell*. 2008; 3, 234-235.
3. Tada T. Genetic Modification-free Reprogramming to Induced Pluripotent Cells: Fantasy or Reality? *Cell Stem Cell*. 2008; 3, 121-122.
4. Takahashi K, and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126, 663-676.
5. Gordana Vunjak-Novakovic G. Patterning Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell*. 2008; 3, 362-363.

## Telomeri e invecchiamento cellulare

*Fabrizio d'Adda di Fagagna*

IFOM-IEO Campus, Milano

Storicamente il concetto di senescenza cellulare è associato all'accorciamento dei telomeri, strutture specializzate composte da sequenze ripetute di DNA che rappresentano le regioni terminali dei cromosomi. Le cellule cresciute in coltura, infatti, non proliferano in maniera illimitata ma smettono di proliferare dopo un certo numero di divisioni cellulari proprio a seguito dell'erosione dei telomeri e tale processo è conosciuto come senescenza replicativa. Esistono però anche meccanismi alternativi che innescano senescenza indipendentemente dallo stato dei telomeri; ad esempio fattori esterni, come le condizioni di coltura cellulari, agenti che inducono danno al DNA o stimoli oncogenici, possono causare arresto del ciclo cellulare. Importanti studi hanno dimostrato che la sola espressione in cellule umane primarie della forma attivata dell'oncogene Ras, una piccola proteina ad attività GTPasica che controlla i processi di proliferazione e trasformazione cellulare, causa, sorprendentemente, la senescenza. Infatti, a seguito dell'espressione dell'oncogene attivato, le cellule cambiano la loro morfologia, diventano molto più grandi e assumono caratteristiche simili a quelle delle cellule senescenti a causa dell'accorciamento telomerico. Di recente è stato scoperto che cellule senescenti a causa dei telomeri troppo corti accumulano danno al DNA e attivano una serie di proteine del pathway di risposta al danno note come proteine del checkpoint, veri e propri allarmi molecolari responsabili dell'arresto del ciclo cellulare. La senescenza indotta dall'oncogene Ras è stata studiata nel nostro gruppo di ricerca come modello per comprendere i meccanismi con cui la cellula risponde ad oncogeni attivati e per studiare un potenziale ruolo della senescenza indotta da oncogeni come meccanismo di soppressione tumorale in vivo. Recentemente abbiamo scoperto che l'oncogene Ras attivato induce nelle cellule umane primarie danno al DNA e ciò costringe le cellule a smettere di proliferare dopo pochi passaggi in coltura. I nostri dati indicano che in seguito al danno al DNA si attivano le proteine del checkpoint necessarie per mantenere e stabilire la senescenza: infatti, se queste proteine non sono più funzionali le cellule che esprimono l'oncogene evitano la senescenza, continuano a dividersi in maniera incon-

trollata e possono formare tumori se iniettate sottocute in topi, indicando quindi che la senescenza indotta da oncogeni è una barriera alla trasformazione cellulare e perciò un importante meccanismo antitumorale. La cosa più interessante è stata cercare di capire i meccanismi molecolari che causano danno al DNA in cellule che esprimono oncogeni. Utilizzando l'overespressione dell'oncogene attivato Ras come modello, con una serie di esperimenti abbiamo dimostrato che questo oncogene è capace di alterare il macchinario della replicazione del DNA. Ras infatti causa un aumento del numero delle origini di replicazione e una alterazione anche della velocità di progressione della forca replicativa. Il processo di replicazione del DNA è normalmente un processo finemente regolato nella cellula; in condizioni normali infatti, le origini di replicazione possono attivarsi e replicare il DNA una sola volta durante l'intero ciclo cellulare.

Sorprendentemente, in presenza dell'oncogene, viene perso il controllo della replicazione del DNA e anche le origini che stanno già replicando possono riattivarsi in maniera anomala causando in questa maniera danno al DNA e instabilità genomica. Come un oncogene possa causare alterazioni al macchinario di replicazione del DNA è ancora una affascinante questione che rimane aperta. Nel caso specifico dell'oncogene Ras sospettiamo che i radicali liberi dell'ossigeno possano essere i principali mediatori dell'alterazione della replicazione del DNA e del conseguente danno accumulato nelle cellule. L'obiettivo della nostra ricerca è quello di investigare i meccanismi molecolari che controllano la senescenza e la trasformazione indotta da oncogeni.

# **CELLULE STAMINALI SOMATICHE**



## Il sistema delle cellule staminali del midollo osseo

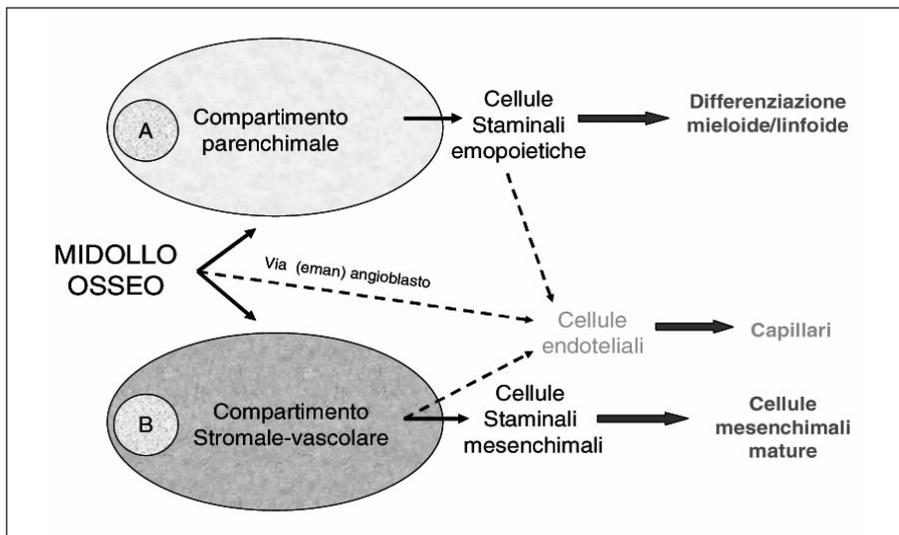
Gianluigi Castoldi, Gian Matteo Rigolin

Sezione di Ematologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Arcispedale S. Anna, Università di Ferrara

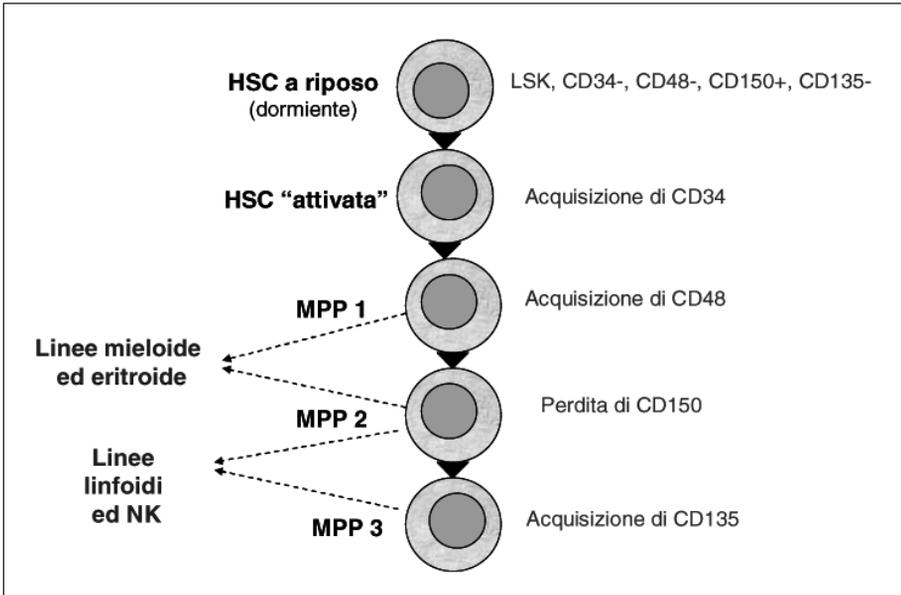
È noto come il tessuto midollare risulti attualmente costituito da due distinte serie di elementi cellulari rispettivamente deputati alla produzione di cellule del sangue (*Compartimento parenchimale, emopoietico*) e al loro supporto funzionale (*Compartimento stromale-vascolare*) (Fig. 1).

### Compartimento delle cellule staminali ematopoietiche

Le nostre conoscenze sulle cellule staminali emopoietiche derivano in gran parte da studi in modelli animali (topo) di cellule selezionate dal midollo osseo in base

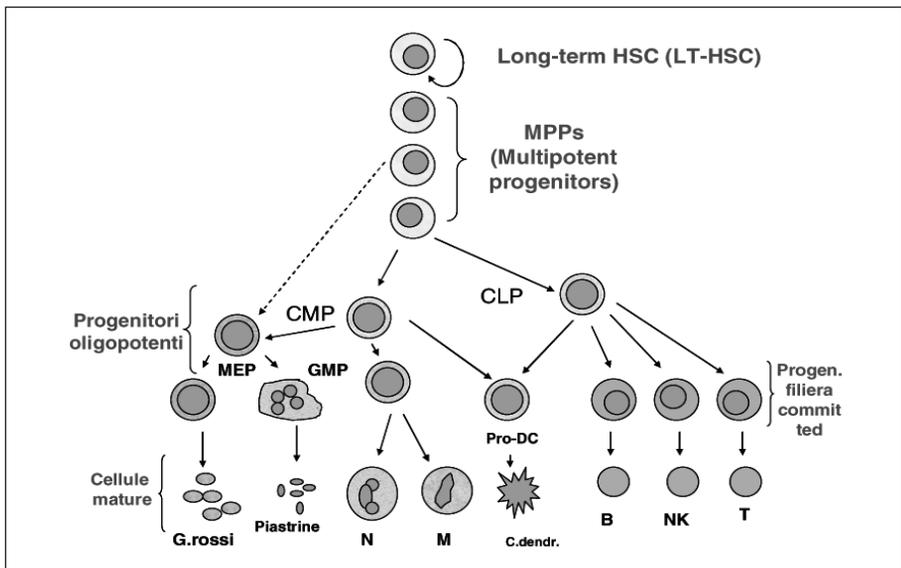


**Fig. 1** - Schema dimostrante la coesistenza nel tessuto midollare di due principali compartimenti: l'uno dedicato al sistema emopoietico (a) e l'altro al sistema mesenchimale di supporto (b). L'esistenza di un terzo compartimento (endoteliale) rimane argomento controverso, potendo le cellule endoteliali derivare dal tessuto mesenchimale a formare il sistema stromale-vascolare, oppure da progenitori emopoietici attraverso la via dell'angioblasto.



**Fig. 2** - Schema della gerarchia dei diversi tipi di cellula staminale identificati nel modello animale (topo) (modificato da Wilson A. et al. Ann. N.Y Acad. Sci., 2007). Le cellule HSC a riposo (“dormienti”) possono “attivarsi” acquisendo CD34, e dare origine a diversi tipi di MPP perdendo in sequenza l’espressione di CD48, quindi di CD150 e acquisendo, successivamente, CD135.

Legende: HSC: Hemopoietic stem cell; LSK: Cellule Lin-, Sca1+, CD117/c-kit+; MPP: Multipotent stem cell.



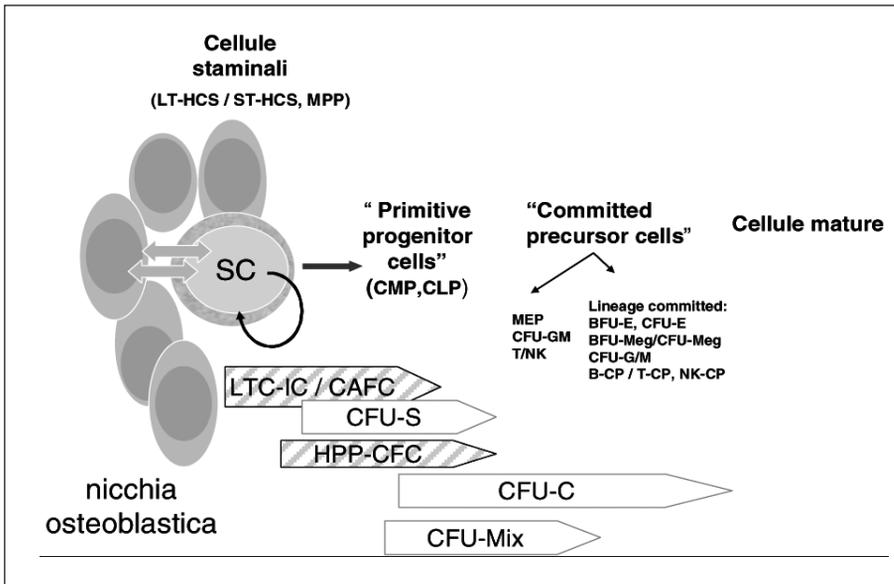
**Fig. 3** - Schema della distribuzione delle cellule staminali nel modello della emopoiesi umana.

Legende: LT-HSC: Long-term hemopoietic stem cell; MPP: Multipotent progenitor cell; CMP: Common myeloid progenitor; CLP: Common lymphoid progenitor; GMP: granulo-monocytic progenitor; MEP: Megakaryocytic-erythroid progenitor; Pro-DC: Cellula pro-dendritica.

alla caratterizzazione con anticorpi monoclonali e da linee cellulari embrionali umane coltivate in vitro (“*colony assays*”) in grado di dimostrare la potenzialità evolutiva di singole cellule progenitrici (Shizuru et al., 2005, Wilson et al., 2007). A questo riguardo numerosi esperimenti sono stati condotti su cellule midollari di topo deplete di ogni riferimento cellulare (lin<sup>-</sup>) mediante separazione immunomagnetica con un *cocktail* di anticorpi monoclonali e, successivamente analizzate in citofluorimetria per CD117 (c-kit), Scf (stem cell antigen -1), CD48/CD150 (SLAM: “*signal lymphocyte activating molecule receptors*”), CD34, CD135 (“*FLT3 receptor*”) (Fig. 2).

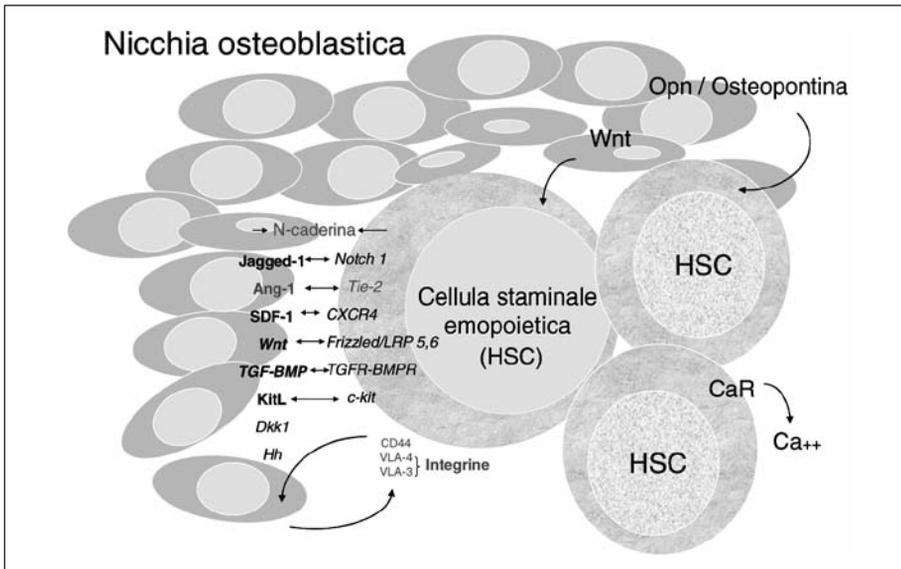
Esiste oggi una scala gerarchica di cellule staminali in grado di evidenziare, sia nell’uomo che nel modello animale, (Wilson et al., 2007, Bhatia et al., 2007, Weissman e Shizuru, 2008) le diverse potenzialità evolutive del sistema emopoietico (Fig. 3). Il modello concernente lo sviluppo delle cellule staminali nell’uomo si è giovato di numerosi saggi sperimentali che hanno adottato nomenclature diverse (Fig. 4) per designare cellule dotate di una più o meno estesa potenzialità differenziativa.

Le cellule ematopoietiche iniziano molto precocemente il loro sviluppo a livello del “*sacco vitellino*” e della regione “*aorto-gonado-mesonefro*” (14°-19° giorno) per passare quindi al fegato (5<sup>a</sup>-8<sup>a</sup> settimana), dal quale raggiungono le cavità ossee a formare il midollo definitivo (12<sup>a</sup> settimana).



**Fig. 4** - Modello di sviluppo della emopoiesi illustrante diversi saggi indirizzati alla identificazione di cellule staminali (riquadri in bianco: saggi nel modello animale o in vitro; riquadri tratteggiati: saggi riferiti alla identificazione di cellule nell’uomo).

Legende: LTC-IC: Long-term culture-Initiating cell; CAFC: Cobblestone area-forming cell; CFU-S: Colony forming unit-spleen; HPP-CFC: High proliferative potential-colony forming cell; CFU-C: Colony forming Unit- cell; CFU-mix: Colony forming unit- mix.



**Fig. 5** - Schema della nicchia osteoblastica: gli osteoblasti producono fattori di crescita e sono dotati di recettori che regolano l'adesione e la funzione delle cellule staminali (moltiplicazione ed automantenimento, differenziazione). I meccanismi di autorinnovo delle cellule staminali e di commitment alle diverse filiere ematopoietiche sono governati dalla interazione con segnali quali Notch-1 e Wnt (Wingless). L'espressione costituzionale o indotta di Notch-1 (che interagisce con il suo ligando Jagged-1) promuove l'automantenimento delle cellule staminali emopoietiche e dei loro progenitori nella nicchia osteoblastica.

Legende: Jagged-1 ligando di Notch-1; Ang-1 (angiopietina-1) ligando di Tie-2 (recettore ad attività tirosinchinasi); SDF-1 (Stromal cell derived factor 1) ligando del recettore CXCR4 (CD184); TGF-BMP (Transforming growth factor  $\beta$ -family / Bone morphogenetic protein); (R: receptor); KitL (kit ligand), DKK1 (Dickkopf); Hh: Hedgehog; Molecole di adesione (N-caderina, integrine); CaR: Ca<sup>++</sup> sensing receptor; HSC: Hematopoietic stem cell.

A questo riguardo l'abbozzo iniziale dell'osso viene infiltrato da parte di vasi e da cellule fagocitiche (condroclasti) finalizzate al rimodellamento cartilagineo. Il successivo arrivo degli osteoblasti precede l'impianto delle cellule staminali ematopoietiche che possono localizzarsi in prossimità degli osteoblasti a livello della superficie endostea soltanto quando la matrice extracellulare ha cominciato a mineralizzarsi (Ca<sup>2++</sup>).

Questa constatazione ha portato ad elaborare il concetto di "nicchia" e di "microambiente induttivo" (Schofield 1978, Moore 2004) per designare siti e meccanismi deputati al sostegno meccanico e funzionale delle cellule emopoietiche staminali (Fig. 5).

I meccanismi di autorinnovo delle cellule staminali e di commitment alle diverse filiere ematopoietiche sono governati dalla interazione con segnali esterni quali Notch-1, e Wnt.

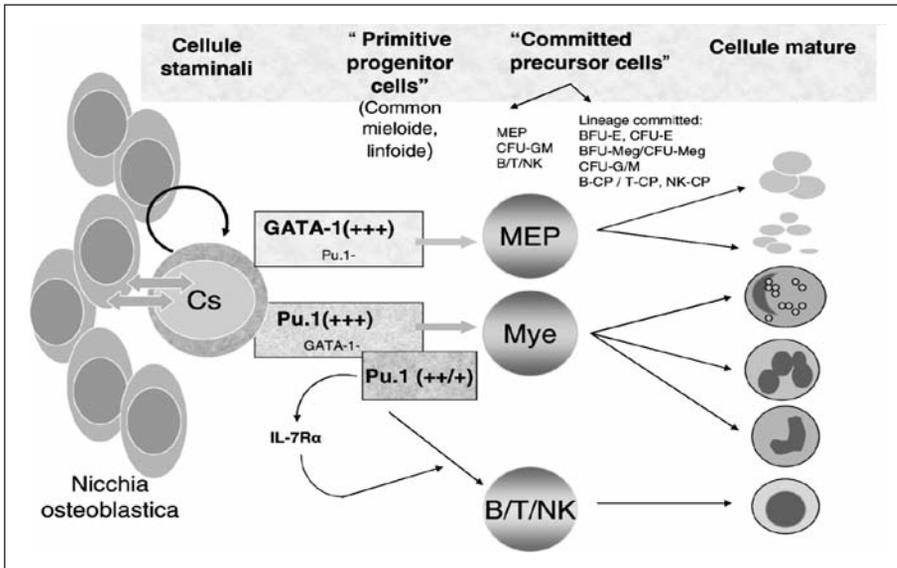
Per quanto attiene a Wnt, questa famiglia di molecole espresse a livello di diversi tessuti, e' in grado di interreagire con recettori "frizzled" e co-recettori LRP 5,6 ("low-density-lipoprotein-receptor-related protein") delle cellule staminali ini-

bendo la fosforilazione della  $\beta$ -catenina. Lungo questa via di trasmissione del segnale (*Wnt /  $\beta$ -catenina*) possono essere attivati almeno quattro distinti percorsi intracellulari di cui il principale è rappresentato dal “*canonical  $\beta$ -catenin-pathway*”. Normalmente il livello della  $\beta$ -catenina citoplasmatica è mantenuto basso per mezzo della sua continua fosforilazione e degradazione ad opera del sistema ubiquitina-proteasoma.

In condizioni normali, in assenza della attivazione da parte di Wnt della via di trasmissione del segnale viene consentito alla  $\beta$ -catenina di associarsi alle caderine, promuovendo l’adesione delle cellule staminali nella nicchia e di interagire con microfilamenti di actina del citoscheletro, controllando la foggia cellulare.

Se tuttavia, in seguito alla aberrante attivazione di Wnt o a mutazioni del gene della  $\beta$ -catenina che stabilizzano la trasmissione del segnale lungo la via Wnt/ $\beta$ -catenina, viene a mancare una degradazione intracellulare da parte del proteasoma, si produce un accumulo di  $\beta$ -catenine (nonfosforilate) che traslocano nel nucleo formando un complesso con la famiglia di geni LEF/TCF (“*Lymphoid enhancer factor/T-cell factor*”) e inducendo l’espressione a valle di geni target (TCF e altri fattori trascrizionali), oltre a geni quali c-myc e ciclina D1 che possono portare all’accumulo di cellule staminali patologiche. In questa circostanza le cellule staminali hanno una ridotta capacità clonogenica (“*stem cell potency*”) ed il risultato è una diminuita produzione di cellule del sangue.

L’evenienza che cellule staminali emopoietiche possano contribuire a localizzazioni extramidollari (come nel caso di alcune malattie mieloproliferative) lascia adito all’esistenza di altre nicchie per le cellule staminali in tessuti diversi dal midollo osseo ed in assenza di strutture osteoblastiche di supporto. In questi tes-



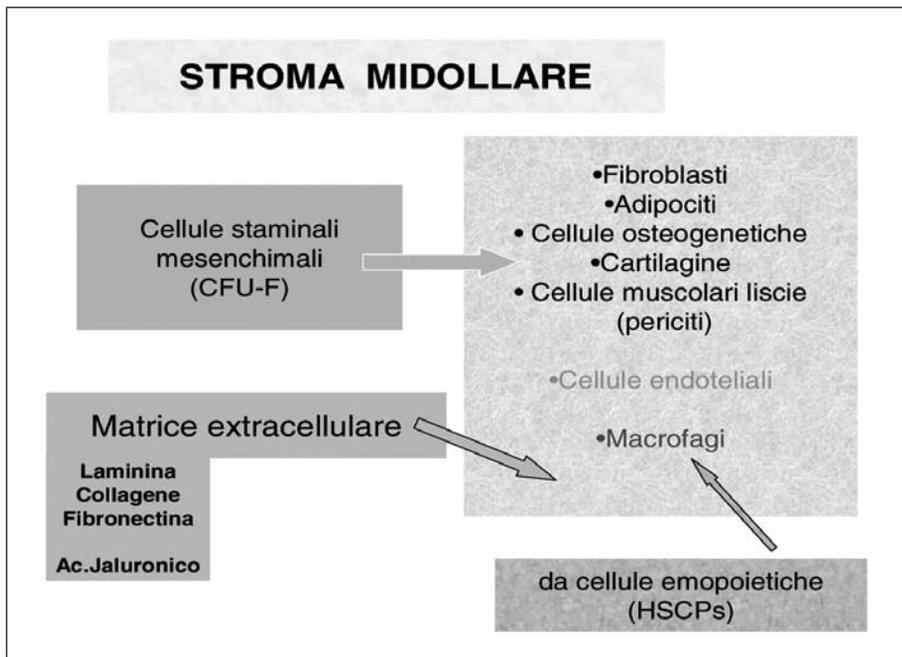
**Fig. 6** - Schema della influenza di varie molecole sulla differenziazione delle cellule staminali emopoietiche lungo varie filiere cellulari.

suti le cellule staminali potrebbero essere reclutate, come nel midollo in “*nicchie vascolari*” (Heissig, 2002, Kiel et al., 2005). Poiché le cellule staminali esprimono un recettore sensibile al calcio (CaR: “*calcium sensing-receptor*”) che le guiderebbe nella nicchia osteoblastica (Fig. 5), l’assenza di questo recettore consentirebbe la localizzazione delle cellule staminali in tessuti diversi dall’osso e quindi indipendenti da una matrice mineralizzata.

Per quanto attiene al sistema emopoietico diverse molecole sono in grado di promuovere la differenziazione verso diverse filiere differenziative (Fig. 6).

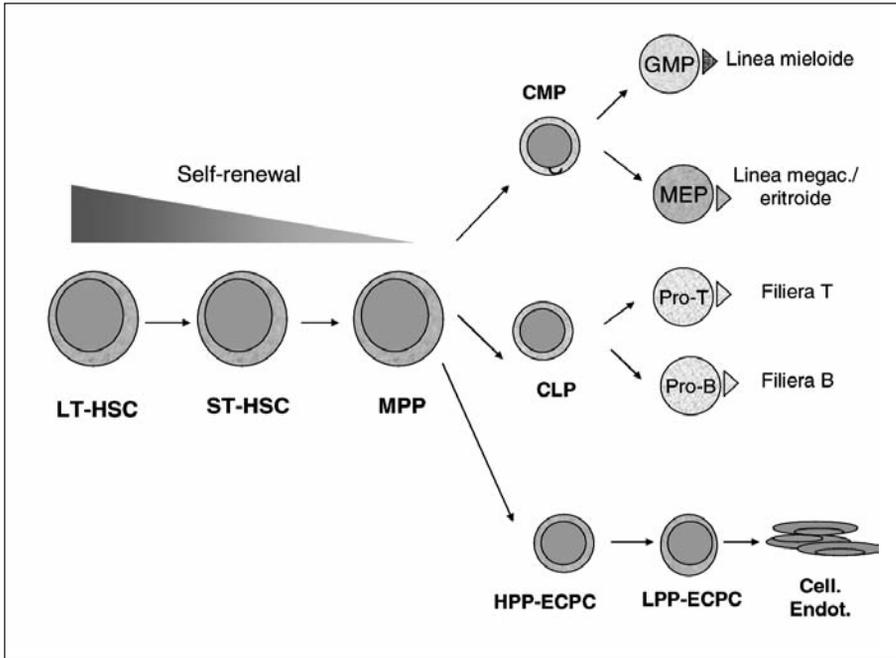
### Compartimento delle cellule stromali-vascolari

Accanto alle cellule staminali emopoietiche va identificato anche il *compartimento stromale* costituito da una popolazione di cellule estremamente eterogenea (Fig. 7). Il microambiente osteo-midollare risulta quindi costituito da un complesso di elementi eterogenei in grado di fornire non soltanto un supporto strutturale alle cellule emopoietiche, ma di provvedere anche alla elaborazione di fattori di crescita in grado di favorire una serie di interazioni fra cellula e cellula e fra le stesse cellule e la matrice extracellulare.



**Fig. 7** - Composizione dello stroma midollare: fanno parte di questa struttura elementi di derivazione mesenchimale, quali fibroblasti, adipociti, osteoblasti, cellule cartilaginee, cellule muscolari lisce e componenti della matrice extracellulare (laminina, fibre collagene, fibronectina, ac. ialuronico). In senso lato fanno parte dello stroma anche gli endoteli e le cellule macrofagiche (queste ultime di derivazione dai monociti del sistema emopoietico).

Legende: CFU-F: Colony forming unit - Fibroblast; HSCPs: Hematopoietic stem cell progenitors.



**Fig. 8** - Schema della possibile gerarchia di precursori delle cellule endoteliali lungo una linea di differenziazione specifica, individuata mediante “clonogenic assays”.

Legende: LT-HSC: Long-term hemopoietic stem cell; ST-HSC: Short term-hemopoietic stem cell; MPP: Multipotent progenitor; HPP-ECPC: High-proliferative potential endothelial colony forming cell (cellule formanti macrocolonie); LPP-ECPC: Low-proliferative potential endothelial colony forming cell.

Il sistema stromale di supporto costituisce quindi un complesso cellulare la cui organizzazione può essere considerata del tutto simile a quella, meglio definita, del sistema emopoietico classico. A questo riguardo, fanno funzionalmente parte del microambiente stromale, oltre alle cellule mature di origine mesenchimale, anche le cellule reticolari (macrofagi), peraltro di derivazione dagli elementi del sistema ematopoietico (filiera monocitaria) e gli endoteli dei sinusoidi capillari, la cui origine tuttora controversa coinvolgerebbe cellule emopoietiche midollari, o, in alternativa, cellule mesenchimali (Castoldi et al., 2006, Rigolin et al., 2006). Jiang et al. (2002) e Lakshmipathy e Verfaillie (2005) hanno fornito la dimostrazione della esistenza nel tessuto midollare di un progenitore comune (*MAPC*: “*Multipotent adult progenitor cell*”) delle cellule mesenchimali in grado di generare, attraverso la via dell’angioblasto, anche cellule endoteliali.

Recentemente Ingram et al. (2004) hanno identificato, mediante una tecnica di saggi clonogenici da singola cellula, una *progenie di cellule progenitrici anche nell’ambito delle cellule endoteliali*, contribuendo al concetto di una filiera distinta da quelle classiche emopoietiche e mesenchimali (Fig. 8). Molti di questi progenitori (EPCs: *Endothelial progenitor cells*) sebbene abbiano in comune alcuni marcatori propri sia delle cellule endoteliali che di quelle ematopoietiche, probabilmente sono di derivazione monocitaria (CD14+, CD45+).

Pertanto è possibile che queste cellule non rappresentino reali cellule progenitrici endoteliali (EPCs), ma piuttosto cellule in grado di promuovere l'angiogenesi attraverso la secrezione di fattori specifici (Bessler, 2004). Elsheikh et al. (2005) hanno fornito evidenza che l'espressione di VEGF-R2 identifica nell'ambito di una subpopolazione CD14+, cellule in grado di provvedere ad una riparazione endoteliale.

In campo clinico, l'adozione di CSF in pazienti infartuati è in grado di mobilitare cellule dotate di capacità rigenerativa endoteliale (Valgimigli et al., 2006). Negli ultimi anni vari studi hanno contribuito all'idea che cellule con caratteristiche endoteliali, dotate dello stesso fenotipo degli elementi facenti parte della popolazione tumorale, siano operative in alcune con condizioni neoplastiche come, ad esempio, nel mieloma multiplo (Rigolin et al., 2006).

Sebbene non esistano dimostrazioni univoche dell'intervento di cellule con fenotipo endoteliale nell'ambito di popolazioni neoplastiche, tuttavia l'esistenza di analogie fra i sistemi tumorali e quelli ematopoietici è servito a proporre il concetto di una cellula staminale neoplastica a capo di ogni proliferazione, analogamente a quanto avviene nei modelli gerarchici del midollo osseo. L'eradicazione di questi elementi dotati di autorinnovamento è divenuto un possibile "target" della applicazione di farmaci antineoplastici.

## Bibliografia

1. Adams GB, Scadden DT. The haemopoietic stem cell in its place. *Nature Immunol.* 7: 333-337, 2006.
2. Bessler M. Endothelial progenitor cells: reporting for duty. *Blood.* 104: 2616-2617, 2004.
3. Castoldi GL, Cuneo A, Rigolin GM. Biological and clinical implications of recruitment of stem cells into angiogenesis. In: Staton C, Lewis C, Bicknell R. (eds.): *Angiogenesis assays: A critical appraisal of current techniques.* J Wiley London. 2006, 327-340.
4. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 20: 161-171, 2006.
5. Elsheikh E, Uzunel M, He Z, Holgersson J, Nowak G, Sumitran-Holgersson S. Only a specific subset of human peripheral blood monocytes has endothelial-like functional capacity. *Blood.* 106: 2347-2355, 2005.
6. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade VB, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood.* 104: 2752-2780, 2004.
7. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 418: 41-49, 2002.
8. Moore KA, Lemischka R. Stem cells and their niches. *Science.* 311: 1880-1885, 2006.

9. Papayannopoulou T, Scadden DT. Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood*. 111: 3923-3930, 2008.
10. Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells: An historical review. *Leukemia Res*. 31: 439-444, 2007.
11. Rigolin GM, Fraulini C, Ciccone M, Mauro E, Bugli AM, De Angeli C, Negrini M, Cuneo A, Castoldi GL. Neoplastic circulating endothelial cells in multiple myeloma with 13q14 deletion. *Blood*. 107: 2531-2535, 2006.
12. Scadden DT. The stem-cell niche a an entity of action. *Nature*. 441: 1075-1079, 2006.
13. Shizuru JA, Negrin RS, Weissmann IL. Hematopoietic stem and progenitor cells: Clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med*. 56: 509-538, 2006.
14. Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, Malagutti R, Curello S, Percolo G., Bugli AM, Della Porta M, Zenone Bragotti L, Ansani L, Mauro E, Lanfranchi A, Giganti M, Feggi, Castoldi GL, Ferrari R. Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization. *Europ Heart J*. 26: 1838-1845, 2005.
15. Weissmann IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 112: 3543- 3553, 2008.
16. Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, Essers MA, Robson McDonald H, Trumpp A. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann NY Acad Sci*. 1106: 64-75, 2007.
17. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 109: 1801-1809, 2007.

## Il modello delle cellule staminali emopoietiche: meccanismi di self-renewal

*Sergio Ferrari*

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Chimica Biologica,  
Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

### Proprietà biologiche delle cellule staminali dell'adulto

Le cellule staminali dell'adulto condividono alcune proprietà biologiche quali:

- 1) la capacità di autorinnovamento o self-renewal;
- 2) la capacità di adesione ad altre cellule del microambiente o alla matrice extracellulare per formare le cosiddette nicchie;
- 3) la capacità di entrare nella fase di commitment, differenziare e quindi di andare in apoptosi.

Le cellule staminali emopoietiche umane dell'adulto risiedono nel midollo osseo, nel così detto microambiente emopoietico, a stretto contatto con il tessuto osseo. All'interno di questo microambiente possiamo distinguere schematicamente il compartimento emopoietico e lo stroma (Grove JE et al., *Stem Cells* 2004). Lo stroma è costituito da diversi tipi cellulari (adipociti, fibroblasti, cellule endoteliali), dai vasi, dai nervi e dalla matrice extracellulare, mentre il compartimento emopoietico è costituito dalle cellule staminali, dai progenitori e precursori e da almeno otto tipi diversi di cellule terminalmente differenziate (Huang X et al. *Cell Death and Differentiation* 2007). Il microambiente midollare è completamente autonomo, è capace infatti di rinnovarsi nel tempo per la compresenza di diversi tipi di cellule staminali. Le cellule staminali emopoietiche sono multipotenti, esse danno origine, cioè, a tutte le cellule del sangue ed anche agli osteoclasti; le cellule staminali mesenchimali (Dazzi F et al., *Blood Reviews* 2006) danno origine alle cellule stromali ed in particolare ai fibroblasti ed agli adipociti ed inoltre possono differenziare efficientemente a osteoblasti, mentre le cellule endoteliali deriverebbero da un precursore comune alle cellule staminali emopoietiche chiamato emoangioblasto (Choi K et al. *Development* 125: 725-732, 1998). L'interdipendenza del microambiente midollare con il tessuto osseo è dimostrata dalla possibilità di rimodellamento del tessuto osseo da parte degli osteoblasti e osteoclasti e dai contatti che la cellula staminale emopoietica ha con gli osteoblasti dell'endostio, nicchia osteblastica (Taichman RS, *Blood* 2005). La cellula staminale emopoietica può aderire ad altri tipi cellulari, come quello endoteliale generando la nicchia vascolare (Kopp HG et al., *Physiology* 2005), con quello adipocitario (Corre J et al. *British Journal of Haematology* 2004) o con quello stromale (Bianco

P. et al. Stem cells 2001). I contatti che la cellula staminale emopoietica stabilisce con gli altri tipi cellulari insieme agli stimoli micro-ambientali, ne determinano lo stato di quiescenza, di proliferazione o di differenziamento. È quindi evidente che il controllo genetico di questi stati è fondamentale per l'omeostasi fisiologica della produzione delle cellule del sangue (Wilson A et al., Cell 2008). La maggior parte delle cellule staminali emopoietiche nell'uomo non sono stimulate da una concentrazione sufficiente di fattori di crescita è perciò in uno stato di quiescenza, cioè nella cosiddetta fase G0 del ciclo cellulare. Tale stato di quiescenza può perdurare a lungo e consente alla cellula staminale emopoietica di essere molto meno sensibile allo stress ossidativo od agli agenti genotossici. Il ritorno della cellula staminale emopoietica nelle altre fasi del ciclo cellulare può avvenire in seguito a stimoli microambientali e/o in seguito a stimoli derivanti dal contatto cellula/cellula o cellula/matrice (Blank U et al., Blood 2007). Il controllo genetico dell'entrata della cellula nel ciclo cellulare si definisce transizione G0/G1. La proliferazione cellulare è regolata dai meccanismi molecolari che permettono la progressione attraverso le diverse fasi del ciclo, che ha due punti di controllo chiamati check-points, il primo che regola la transizione G1/S, e il secondo che regola la transizione G2/M (Sherr CJ and Roberts JM, Genes and Development 2004). Esistono evidenze sperimentali che suggeriscono che la regolazione della proliferazione che garantisce l'autorinnovamento è diversa rispetto alla regolazione della proliferazione che porta alla fase di commitment e quindi al differenziamento. Un anomalo controllo della proliferazione nel processo di autorinnovamento può generare un grandissimo numero di cellule progenitrici capaci di alterare la struttura del tessuto fino a determinarne la trasformazione tumorale. Al contrario, una diminuita capacità di autorinnovamento delle cellule staminali può portare all'ipoplasia o all'aplasia del tessuto stesso (Orford KW and Scadden DT. Nature Review in Genetics 2008).

### **Il modello cinetico dell'emopoiesi**

Come è già stato accennato, le cellule staminali emopoietiche dell'adulto possono essere quiescenti, proliferanti o possono attivare i diversi programmi differenziativi per poi andare in apoptosi. L'equilibrio omeostatico del tessuto emopoietico è garantito dai rapporti quantitativi fra le cellule in questi diversi stati funzionali, una qualsiasi alterazione dell'equilibrio tra cellule quiescenti, proliferanti, in differenziamento o in apoptosi può generare patologie ematologiche neoplastiche, ipoplastiche o aplastiche, come già anticipato nel paragrafo precedente. Il modello cinetico dell'emopoiesi suggerisce che siano di fondamentale importanza lo stato di quiescenza, l'entrata in ciclo e la fase di progressione in G1 per l'attivazione da parte della cellula staminale emopoietica dei diversi programmi genetici che regolano l'autorinnovamento, il commitment e quindi il differenziamento (Manfredini R et al., Stem Cells 2005; Quesenberry PJ Current Opinion in Hematology 2006). La fase G1 del ciclo è la più permissiva alla trascrizione genica ed alla traduzione proteica ed è fortemente condizionata dagli stimoli microambientali, dai fattori di crescita o morfogeni, dall'adesione cellula/cellula o cellula/matrice che si realizzano nei diversi tipi di nicchie (Ross J, Li

L. Current Opinion in Hematology 2006; Li L, Xie T. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2005). La concentrazione delle sostanze bioattive è fondamentale per l'auto-rinnovamento e per l'attivazione della proliferazione e del differenziamento. Alcuni aspetti non sono ancora stati completamente chiariti:

- 1) l'identificazione di tutti gli stimoli microambientali che determinano la transizione G0/G1 delle cellule staminali emopoietiche dell'adulto;
- 2) gli stimoli inibitori che mantengono la cellula staminale emopoietica quiescente o che ne determinano la progressione inversa da G1 a G0;
- 3) la diversa regolazione del ciclo cellulare nella proliferazione che garantisce l'auto-rinnovamento rispetto alla proliferazione che porta le cellule a divenire precursori e poi cellule differenziate;
- 4) i geni ed il controllo epigenetico in grado di attivare od inibire questi programmi genetici.

### **Il controllo della transizione G0/G1**

È possibile purificare le cellule staminali emopoietiche umane adulte, utilizzando biglie immunomagnetiche coniugate con anticorpi in grado di riconoscere e legare alcune molecole di superficie o mediante cell sorting citofluorimetrico. Le cellule staminali emopoietiche adulte possono essere isolate dal midollo osseo, dal sangue periferico o dal sangue di cordone ombelicale.

Le cellule staminali possono essere coltivate in vitro, ne può essere valutata la capacità differenziativa mediante saggio clonogenico, od anche la capacità di engraftment ed autorinnovamento se trapiantate serialmente nei topi irradiati. La proliferazione di cellule staminali può essere stimolata in vitro mediante l'aggiunta di un cocktail di fattori di crescita in grado di attivare la via mitogenica classica delle MAP chinasi o la via di trasduzione mediata da recettori non tirosin chinasi e da JAK/STAT. L'espansione delle cellule staminali, in queste condizioni sperimentali, è limitata temporalmente in quanto le cellule attivano il programma differenziativo, permettendo quindi lo studio dei meccanismi di "commitment" ma non quelli di autorinnovamento. Un cocktail di fattori di crescita composto da Stem Cell Factor, Trombopoietina, IL-1, IL-3, IL-6, Flt3 ligand ed IL-11 è in grado di far proliferare le cellule staminali emopoietiche in vitro (Gemelli C et al., Journal of Immunology 2008), mentre altre citochine, come il TGFβ l'IL-10 o l'IL-17, sono in grado di inibirne la proliferazione (Manfredini R. et al., Stem Cells 2005; Larsson J. et al., Oncogene 2005).

Il mantenimento dell'insieme delle cellule staminali emopoietiche quiescenti e quello delle cellule proliferanti è fondamentale nell'equilibrio omeostatico e questo sembra assicurato da un continuo scambio fra i due insiemi cellulari (Wilson A et al., Cell 2008).

### **La regolazione del ciclo cellulare nella progressione G1 e nella transizione G1/S**

Entrata nel ciclo cellulare, la cellula staminale emopoietica deve progredire attraverso la fase G1 fino al punto di restrizione. Questa progressione è complessa e

dipende tanto dagli stimoli extracellulari microambientali quanto dalla regolazione trascrizionale endogena, essa deve consentire la trascrizione delle cicline D ed E che, in associazione alle corrispondenti chinasi (rispettivamente CDK4, 6 e 2), ne assicurano il controllo. Il superamento del punto di restrizione è invece controllato solo a livello endogeno ed è legato all'attività del complesso cicline E/CDK2 e da una serie di geni inibitori fra cui la famiglia Rb (Rb, p107 e p130), p53 e gli inibitori del complesso cicline/chinasi (CDKI) appartenenti alle famiglie geniche INK4 (p16 e p18, inibiscono il complesso cicline D/CDK 4,6) e CIP (p21, p27, p57, che inibiscono il complesso cicline E/CDK2) (Sherr CJ and Roberts JM, *Genes and Development* 2004). La regolazione di questa fase del ciclo sembra essere importante per assicurare la proliferazione che permetta l'autorinnovamento invece che la proliferazione associata al commitment e quindi al differenziamento.

### **Una diversa regolazione della fase G1 del ciclo cellulare è alla base della proliferazione che porta all'autorinnovamento o al differenziamento delle cellule staminali embrionali di topo dei primati e dell'uomo**

Le cellule staminali embrionali in coltura proliferano rapidissimamente e in presenza di Leukemia Inhibitory Factor (LIF) non differenziano. In queste cellule si ha un notevole accorciamento della fase G1 e quindi del ciclo cellulare nel suo complesso, che risulta essere di 11-16 invece che di 24 ore. I livelli di espressione delle cicline D sono inferiori, non vi è espressione di CDK4, mentre si ha un'espressione costitutiva del complesso Cicline E/CDK2 che si mantiene attivo in tutte le fasi del ciclo. Il gene Rb è mantenuto fosforilato e quindi inattivo, in tutte le fasi del ciclo. Questa particolare situazione indica che la proliferazione delle cellule embrionali è associata alla mancanza della fase G1 precoce e al rapido superamento del punto di restrizione assicurato dal complesso costitutivamente attivo delle cicline E/CDK2 e dalla fosforilazione costitutiva di Rb. Inoltre, la mancanza della fase G1 precoce impedisce alla cellula di rispondere agli stimoli differenziativi indotti dai fattori di crescita e la conseguente attivazione della via di trasduzione del segnale mediata dalla MAPK (Burdon T et al. *Trends in Cell Biology* 2002). Questo particolare modo di progredire nella fase G1 è alla base della capacità di autorinnovamento delle cellule staminali embrionali di topo. Quando in coltura non viene addizionalato il LIF si ha una drammatica diminuzione della capacità di autorinnovamento ed una aumentata capacità differenziativa di queste cellule, che ripristinano completamente l'espressione delle cicline D/CDK, hanno Rb defosforilato ed recuperano la risposta differenziativa ai mitogeni e l'attivazione della cascata delle MAPK, con conseguente allungamento della fase G1 e ripristino della regolazione della fase G1 precoce. I risultati di questi esperimenti hanno permesso di ipotizzare che la proliferazione legata all'autorinnovamento sia diversa dalla proliferazione che porta al differenziamento. Una ulteriore conferma di questa ipotesi è stata ottenuta dagli esperimenti condotti nei topi knockout per i tre membri della famiglia Rb, in cui le cellule staminali embrionali sono in grado di autorinnovarsi ma non di differenziare (Dannenbergh JH et al., *Genes Development* 2000). Nelle cellule staminali embrionali umane e

dei primati in generale non è stato possibile confermare questi risultati perchè non rispondono al LIF, esprimono le cicline D e il CDK4, hanno Rb iperfosforilato ma comunque conservano le peculiarità di una fase di progressione G1 più breve ed una insensibilità al siero o ai mitogeni con mancata attivazione della cascata delle MAPK e del differenziamento (Beker KA et al., *J. Cell Physiology* 2006; Orford KW, Scadden DT, *Nature Review in Genetics* 2008).

### **La regolazione del ciclo cellulare nel self-renewal delle cellule staminali emopoietiche dell'adulto**

Diversamente dal contesto staminale embrionale, nell'adulto circa il 75% delle cellule è in uno stato di quiescenza e non è quindi reclutato nel ciclo cellulare.

È possibile studiare il self-renewal delle cellule staminali in diversi modi, e per quanto riguarda le cellule staminali emopoietiche dell'adulto il saggio più largamente utilizzato è quello dei trapianti seriali in modelli murini. Ciò che si valuta in questi esperimenti è per quanti trapianti seriali le cellule staminali, ottenute ad esempio da topi knock-out o topi transgenici, sono in grado di mantenere la propria capacità di self-renewal e quindi di ripopolamento del midollo osseo. Simili saggi hanno posto in evidenza una serie di geni coinvolti nel meccanismo di self-renewal delle cellule staminali emopoietiche adulte, come riassunto di seguito.

In animali **p21**<sup>-/-</sup> (ricordiamo che P21WAF/CIP è un CDKI indotto da p53) la proporzione di cellule staminali primitive che si trovano in quiescenza è ridotta, mentre aumentano le cellule staminali che in vitro danno origine a colonie multipotenti a lungo termine. Esperimenti di trapianti seriali dimostrano come queste cellule prive di p21 si esauriscano più rapidamente delle cellule normali. Un comportamento analogo si verifica anche in seguito a trattamento dei topi con l'agente mielotossico 5FU (van Os, R et al. *Stem Cells*, 2007). Un fenotipo molto simile a quello dei topi p21<sup>-/-</sup>, si ottiene anche nei modelli **Gfi1**<sup>-/-</sup> (fattore di crescita indipendente 1; Hock, H et al. *Nature* 2004), **Pten**<sup>-/-</sup> (omologo a fosfatasi e tensina; Zhang, J et al. *Nature* 2006), **Foxo 1,3,4** <sup>-/-</sup> (forkhead box 1, 3 e 4; Miyamoto K et al. *Cell Stem Cell*, 2007; Tothova Z. et al. *Cell* 2007). In particolare, nei topi Gfi1 <sup>-/-</sup> le cellule staminali emopoietiche esprimono il gene p21, con conseguente blocco in G1. Nei topi Pten <sup>-/-</sup> invece le cellule staminali emopoietiche entrano in ciclo determinando una transitoria sindrome mieloproliferativa che poi sfocia in una loro deplezione, e ciò si spiega con il fatto che la normale funzione di Pten, e cioè la regolazione negativa della Fosfo Inositolo 3 Chinasi PI3K mantiene lo stato di quiescenza nel compartimento delle cellule staminali emopoietiche. Ulteriori mutazioni possono poi portare all'insorgenza di leucemie. Infine, la famiglia dei fattori trascrizionali Foxo è responsabile del blocco della proliferazione cellulare e nelle cellule staminali emopoietiche favorisce uno stato di quiescenza come meccanismo di protezione dallo stress ossidativo, cioè dall'aumento dei radicali liberi dell'Ossigeno (ROS). Un'altro modello genetico che illustra i rapporti fra quiescenza e proliferazione delle cellule staminali emopoietiche dell'adulto è quello dei topi **Mef**<sup>-/-</sup> (fattore trascrizionale anche denominato ELF4; Lacorazza HD et al. *Cancer Cell*, 2006), in cui da un

lato viene favorito lo stato di quiescenza e dall'altro, paradossalmente, una maggiore capacità di self-renewal nei trapianti seriali, indice di un mantenimento della popolazione staminale nel tempo. Tali cellule staminali Mef<sup>-/-</sup> sono notevolmente meno sensibili all'effetto mieloablativo del 5FU. L'evidenza sperimentale che deriva dai modelli genetici sopra riportati rafforza il concetto che sia l'aumentata proliferazione delle cellule staminali emopoietiche dell'adulto sia la conseguente progressiva diminuzione del pool delle cellule quiescenti, determinano un esaurimento della funzione di self-renewal e quindi della capacità di ripopolamento del midollo in esperimenti di trapianti seriali. Spesso in biologia accade che alcune evidenze sperimentali risultino discordanti, come succede ad esempio in quei modelli in cui ad un aumento dell'attività proliferativa delle cellule staminali dell'adulto non corrisponde un loro progressivo esaurimento in trapianti seriali competitivi. Tali casi "atipici" risultano interessanti per valutare i rapporti fra ciclo cellulare e funzioni delle cellule staminali. Un primo modello genetico è quello dei topi **p18INK4c** <sup>-/-</sup> (p18 è un CDKI in grado di inibire l'attività dei complessi cicline D/CDK4 e CDK6). Le cellule staminali emopoietiche di questi animali mostrano un aumento sia numerico che in termini di attività proliferativa, e funzionalmente possiedono una maggiore capacità di ripopolamento nei saggi di ripopolamento competitivo (Yuan Y et al., *Nature Cell Biology*, 2004; Yu H et al., *Blood*, 2006). L'interpretazione più convincente è che la mancata funzione di p18 permetta una più rapida progressione nella fase G1 tardiva in cui si ha l'attivazione del complesso Cicline E/CDK2 e un aumento dell'attività di self-renewal. Risultati simili sono stati ottenuti anche in modelli animali in cui si ha l'overespressione dell'omeogene **HoxB4**. In questi topi si riscontra un aumento della proliferazione delle cellule staminali emopoietiche, pur in mancanza di un accorciamento significativo della fase G1 del ciclo cellulare. Le cellule staminali emopoietiche overesprimenti HoxB4 si espandono in vivo molto più efficientemente delle cellule wild-type e in saggi di ripopolamento competitivo dopo trapianto di midollo ripristinano efficientemente l'emopoiesi. Anche in questo caso l'interpretazione è che l'up-regolazione dell'espressione delle cicline D ed E permetta una rapida transizione dal G1 precoce al G1 tardivo, favorendo il self-renewal (Antonchuk J, et al., *Experimental Hematology*, 1999). In entrambi questi modelli l'accelerazione della progressione G1 impedisce l'attivazione della finestra differenziativa in G1 precoce, favorendo l'attività di self-renewal.

### **Il ruolo della nicchia osteoblastica nei meccanismi di quiescenza, self-renewal, commitment e differenziamento**

È sempre più evidente l'importanza delle nicchie microambientali nella regolazione delle funzioni delle cellule staminali emopoietiche dell'adulto, in particolare nei meccanismi di quiescenza, self-renewal e differenziamento (Wilson A., Trumpp A. *Nature reviews in Immunology* 2006). Per quanto riguarda lo stato di quiescenza, sembrano essere di fondamentale importanza i meccanismi di adesione cellulare. Nel modello genetico dei topi **CDC42** <sup>-/-</sup> (CDC42 è un gene che regola la polimerizzazione dei microfilamenti di actina e l'adesione cellula-cellula) le cellule sta-

minali emopoietiche si trovano in una localizzazione aberrante rispetto alla nicchia osteoblastica, e in seguito a trapianto questa ridotta adesione determina un aumento dell'attività proliferativa e un rapido esaurimento di ripopolamento con conseguente perdita della capacità emopoietica (Yang L, et al. Proc Natl. Acad. Sci USA, 2007). Un altro modello genetico è quello dei topi **Tie2** *-/-* (Tie2 codifica per un recettore tirosin chinasi trans membrana che riconosce come ligandi i membri della famiglia ANG, angiopoietine, ed è espresso sulla superficie sia delle cellule staminali emopoietiche che endoteliali).

La via di trasduzione del segnale Tie2/ANG1 impone alle cellule staminali emopoietiche uno stato di quiescenza inducendo l'espressione delle molecole di adesione N-Caderina. A riprova di ciò, le cellule staminali emopoietiche Tie2 *-/-* sono altamente proliferanti e sia in vivo che in vitro vanno rapidamente incontro a deplezione.

Proliferazione e self-renewal delle cellule staminali dell'adulto permettono quindi l'automantenimento del pool staminale, e a tal fine risultano importanti le vie di trasduzione del segnale mediate da morfogeni quali **Wnt** (Reya T, et al. Nature 2003), **Notch** (Carlesso N et al., Blood 1999) e **Hedgehog** (Jennifer J et al., PNAS 2006), che accorciano la fase G1 del ciclo cellulare. La proliferazione risulta quindi indipendente dagli stimoli citochinici e non si ha attivazione né delle MAPK che mediano l'entrata in ciclo (transizione G0/G1) né delle fasi di commitment e differenziamento. Un altro gene particolarmente importante nei meccanismi di self-renewal è **Bmi1**, appartenente alla famiglia dei geni Polycomb (PcG). Infatti nel modello dei topi Bmi1 *-/-* le cellule staminali emopoietiche vanno incontro a blocco proliferativo, differenziamento ed apoptosi e non sono quindi funzionalmente rilevanti nei modelli di trapianto (Lessard J, Sauvageau G, Nature 2003). Più in generale i geni polycomb nelle cellule embrionali staminali mediano il silenziamento di geni pro-differenziativi.

Un ruolo particolare è rivestito dal protooncogene **c-Myc**, che risulta importante per la fase di progressione G1 e che può favorire, se la cellula non supera il punto di restrizione, le fasi di commitment e differenziamento in associazione all'attivazione della via di trasduzione del segnale mediata da fattori di crescita, recettori tirosin chinasi e attivazione delle MAPK (Wilson A. et al., Genes Development 2004). Questo particolare comportamento delle cellule staminali emopoietiche si verifica quando le cellule escono dalla nicchia emopoietica per perdita della loro capacità di adesione o per divisione asimmetrica (Beckman J et al., Blood 2007). Infine vorrei concludere questa breve e sicuramente incompleta trattazione evidenziando la possibilità di riprogrammare cellule somatiche differenziate in cellule pluripotenti con caratteristiche simili a quelle delle cellule staminali embrionali agendo sull'assetto nucleare. Tali risultati sono stati ottenuti mediante trasferimento genico in fibroblasti del derma umano di quattro geni codificanti per fattori trascrizionali: **Oct3/4**, **Sox2**, **Klf4** e **c-Myc**. Le risultanti cellule geneticamente modificate sono molto simili alle cellule staminali embrionali quanto a morfologia, proliferazione, immunofenotipo, espressione genica e attività telomerasica, e sono in grado sia di differenziare in tipi cellulari specifici dei tre foglietti embrionali sia di dare origine a teratomi (Takahashi K et al., Cell 2007).

## Bibliografia

1. Antonchuk J, et al. HoxB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and cooperative repopulation. *Experimental Hematology*. 29: 1125-1134, 1999.
2. Becker KA, et al. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *Journal of Cell Physiology*. 209: 883-893, 2006.
3. Beckman J, et al. Asymmetric cell division within the human hemopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood*. 109: 5494-5501, 2007.
4. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 19: 180-192, 2001.
5. Blank U, et al. Signaling pathways governing stem cell fate. *Blood*. 111: 492-503 2008.
6. Burdon T, et al. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in Cell Biology*. 12: 432-438, 2002.
7. Carlesso N, et al. Notch-1 induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation in association with altered cell cycle kinetics. *Blood*. 93: 838-848, 1999.
8. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hemopoietic and endothelial cells. *Development*. 125: 725-732, 1998.
9. Orre J, et al. Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34+ cells. *British Journal of Haematology*. 127: 344-347, 2004.
10. Dannenberg JH, et al. Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G1 control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes and Development*. 14: 3051-3064, 2000.
11. Gemelli C, et al. The vitamin D3/Hox-A10 pathway supports MafB function during the monocyte differentiation of human CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunology*. 181: 5660-5672, 2008.
12. Grove JE, et al. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*. 22: 487-500, 2004.
13. Hock H, et al. Gfi1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature*. 431: 1002-1007, 2004.
14. Huang X, et al. Hemopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell death and Differentiation*. 14: 1851-1859, 2007.
15. Jennifer J, et al. Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cell to control hemopoietic regeneration. *PNAS*. 103: 14134-14139, 2006.
16. Kopp HG, et al. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology*. 20: 349-356, 2005.
17. Lacorazza HD. The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hemopoietic cells. *Cancer Cell*. 9: 175-187, 2006.

18. Larsson J, Karlsson S. The role of Smad signaling in hemopoiesis. *Oncogene*. 24: 5676-5692, 2005.
19. Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukemic stem cells. *Nature*. 423: 255-260, 2003.
20. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annual Review in Cell Development and Biology*. 21: 605-631, 2005.
21. Manfredini R, et al. The kinetic status of hemopoietic stem cells subpopulations underlies a differential expression of genes involved in self-renewal. Commitment and engraftment. *Stem Cells*. 23: 496-306, 2005.
22. Miyamoto K, et al. FOXO3a is essential for maintenance of hemopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*. 1: 101-112, 2007.
23. Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cells self-renewal: genetic insights into cell cycle regulation. *Nature Review in Genetics*. 9: 115-128, 2008.
24. Quesenberry PJ. The continuum model of marrow stem cell regulation. *Current Opinion in Hematology*. 13: 216-221, 2006.
25. Reya T, et al. A role for Wnt signaling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 423: 409-414, 2003.
26. Ross J, Li L. Recent advances in understanding extrinsic control of hemopoietic stem cell fate. *Current Opinion in Hematology*. 13: 237-242, 2006.
27. Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes and Development*. 18: 2699-2711, 2004.
28. Taichman RS. Blood and Bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hemopoietic stem-cell niche. *Blood* 105: 2631-2639, 2005.
29. Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131: 1-12, 2007.
30. Tothova Z, et al. FOXOs are critical mediators of hemopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*. 128: 325-339, 2007.
31. Van OS R, et al. A limited role for p21 Cip1/Waf1 in maintaining normal hematopoietic Stem cell function. *Stem Cells*. 25: 836-843, 2007.
32. Wilson A, et al. c-Myc controls the balance between hemopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Development*. 18: 2747-2763, 2004.
33. Wilson A, Trumpp A. Bone marrow haematopoietic-stem-cells niches. *Nature Reviews in Immunology*. 6: 93-106, 2006.
34. Wilson A, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 135: 1118-1129, 2008.
35. Yang L, et al. Rho GTPase CDC42 coordinates hemopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA*. 104: 5091-5096, 2007.
36. Yuan Y, et al. In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1 phase inhibitor, p18 INK4C. *Nature Cell Biology*. 6: 436-442, 2004.
37. Yu H, et al. Hemopoietic stem cell exhaustion impacted by p18INK4C and p21 Cip1/Waf1 in opposite manner. *Blood*. 107: 1200-1206, 2006.

## Cellule staminali tessuto-specifiche

*Carlo Bernasconi*

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia.  
Consulente ematologo e coordinatore della ricerca sulle cellule staminali,  
IRCCS Fondazione "Salvatore Maugeri", Pavia

Le cellule staminali (CS) somatiche possono essere classificate in base ai tessuti da cui vengono isolate e raccolte. L'elenco delle cellule staminali tessuto-specifiche sinora identificate comprende cellule di origine ectodermica (cellule staminali cutanee, dei follicoli piliferi, della cornea, cellule staminali del tessuto nervoso), mesodermica (cellule staminali ematopoietiche, mesenchimali, del muscolo scheletrico, del muscolo cardiaco), endodermica (cellule ovali del fegato, cellule staminali dell'epitelio intestinale, dell'epitelio polmonare, cellule staminali pancreatiche). Classificate secondo le loro caratteristiche fenotipiche, sono elencate in Tab. 1.

**Tab. 1** - Cellule staminali somatiche adulte tessuto-specifiche e loro primaria direzione di differenziazione.

Fenotipo cellulare	Localizzazione tessuto-specifica	Cellule o tessuti prodotti
CS cutanee	Strato basale dell'epidermide	Epidermide
CS dei follicoli piliferi	Bulbo del follicolo pilifero	Follicolo pilifero
CS della cornea	Limbo corneale	Epitelio corneale
CS neurali	Cellule ependimali, astrociti (zona subventricolare) del SNC	Neuroni, astrociti, oligodendrociti
CS ematopoietiche	Midollo osseo, sangue periferico	Cellule linfoematopoietiche osteomidollari ed ematiche
CS mesenchimali	Midollo osseo, sangue periferico, tessuto adiposo	Osso, cartilagine, tendini, t. adiposo, stroma midollare
CS del musc. scheletr. (cellule satelliti)	Fibre muscolari	Fibre muscolari scheletriche
CS / progenitori cardiaci endogeni?	CS cardiache e cardioblasti (cellule isI+) residenti nel cuore adulto?	Cardiomiociti
CS epatiche	Vicino ai dotti terminali biliari (canali di Hering)	Cellule ovali che generano epatociti e cellule duttali
CS pancreatiche	C. nestin-pos. intransulari, c. ovali, c. duttali	Cellule beta
CS dell'epitelio intestinale	Cellule epiteliali alla base delle cripte intestinali	C. di Paneth, enterociti, c.mucose, enteroendocrine
CS dell'epitelio polmonare	C. bronchiolari di Clara, pneumociti alveolari tipo II, c. basali e mucose della trachea	Pneumociti di tipo I e II, Cellule ciliate e mucose

Le CS adulte tessuto-specifiche hanno la capacità di continuo autorinnovamento, per tutta la durata della vita, e danno origine a vari tipi di cellule mature con funzioni ben specializzate. Le CS attraverso una serie di divisioni cellulari, che generano progenitori e precursori cellulari sempre più differenziati, alla fine del processo proliferativo producono le cellule mature caratteristiche di un determinato organo o tessuto. Usualmente i progenitori e i precursori sono considerati come cellule “commissionate” lungo un prestabilito percorso differenziativo cellulare. La funzione primaria delle CS tessuto-specifiche è quindi quella di provvedere a mantenere l’omeostasi di un tessuto, rimpiazzando le cellule mature andate distrutte per danno o malattia, oppure anche per semplice senescenza.

Un complesso sistema di meccanismi cellulari intrinseci ed estrinseci regola e bilancia l’autorinnovamento e la differenziazione di tutte le CS tessuto-specifiche. Le cellule staminali, la loro progenie e gli elementi del loro microambiente compongono una struttura anatomica che coordina la normale produzione omeostatica di cellule funzionali mature. In questo contesto si inquadra il concetto di “nicchia di cellule staminali”, una unità strutturale interattiva, organizzata per facilitare le decisioni sul destino cellulare secondo appropriate modalità spazio-temporali (Moore e Lemischka, 2006).

Il concetto di nicchia è stato proposto per la prima volta da Schofield nel 1978 studiando l’ematopoiesi dei mammiferi. Per parecchi anni rimase poi completamente negletto, probabilmente per la complessità strutturale anatomica dei mammiferi stessi. Più recentemente è stato ripreso e sviluppato, grazie soprattutto agli studi condotti sulla *Drosophila* e sul *Caenorhabditis elegans*. Oggi comunque sono state individuate in mammiferi nicchie di CS somatiche adulte appartenenti a vari tessuti (Watt et al., 2000; Doetsch, 2003; Scadden, 2006).

Le più studiate e meglio conosciute sono le nicchie di CS che, per tutta la durata della vita, provvedono alla regolare ematopoiesi e al rinnovo dell’epitelio intestinale e delle strutture epiteliali. Sono stati così precisati alcuni meccanismi che proteggono le CS dall’azione di stimoli differenziativi, stimoli apoptotici e altri stimoli che potrebbero compromettere la riserva delle CS stesse. La nicchia costituisce anche una salvaguardia contro l’eccessiva produzione di CS, che potrebbe generare tumori. Le CS debbono periodicamente venir attivate e produrre progenitori e cellule di transito amplificanti (*transit amplifying cells*), che sono commissionate a produrre linee di cellule mature. Così, il mantenere un bilanciamento fra CS quiescenti e attive è la caratteristica fondamentale di una nicchia funzionale. Secondo i criteri classici della biologia dello sviluppo le CS somatiche adulte sono tradizionalmente ristrette nel loro potenziale differenziativo verso la progenie del loro specifico tessuto di residenza. Parecchi studi pubblicati negli ultimi anni avrebbero però indotto a modificare questo dogma biologico fondamentale, fornendo prove apparenti che cellule staminali tessuto-specifiche possano presentare una considerevole plasticità, oltrepassando i confini della restrizione lineare per dare origine a tipi cellulari di altre linee, anche derivate da foglietti germinali differenti. Tuttavia, la mancanza di una precisa definizione del termine “plasticità” ha generato molte controversie, poiché parecchie ricerche hanno fallito nel dimostrare che veramente una singola cellula abbia potuto dif-

ferenziare lungo molteplici linee cellulari. Per porre ordine in tali controversie Verfaillie et al. (2003, 2004) hanno proposto tre criteri principali per definire la plasticità delle cellule staminali:

1. una singola cellula può differenziare lungo molteplici linee cellulari;
2. le cellule differenziate debbono svolgere le loro proprietà funzionali *in vitro* e *in vivo*;
3. l'attecchimento del trapianto deve essere robusto e persistente.

Sono stati proposti parecchi possibili meccanismi per spiegare la plasticità delle cellule staminali (specie quelle derivate dal midollo osseo) e un meccanismo necessariamente non preclude le altre possibilità (Herzog et al., 2003; Körbling e Estrov, 2003; Kucia et al., 2005; Lemoli et al., 2005). Attualmente si deve però concludere che tutti gli studi condotti sulla plasticità delle CS, e sui possibili meccanismi di transdifferenziazione, debbono essere sottoposti a una critica rigorosa e sostenuti da ricerche condotte su popolazioni di CS altamente purificate.

### **Bibliografia essenziale**

1. Doetsch. A niche for adult stem cells. *Current Opinion in Genetics and Development*. 13, 543, 2003.
2. Herzog EL, Chai L, Krause DS, et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 102, 3483, 2003.
3. Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept? *N Engl J Med*. 349, 570, 2003.
4. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ, et al. Are bone marrow stem cells plastic or heterogeneous - That is the question. *Exp Hematol*. 33, 613, 2005.
5. Lakshminpathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev*. 19, 29, 2004.
6. Lemoli RM, Bertolini F, Cancedda R, et al. Stem cell plasticity: time for a reappraisal? *Haematologica*. 90, 360, 2005.
7. Moore KA, Lemischka R. Stem cells and their niches. *Science*. 311, 1880, 2006.
8. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 441, 1075, 2006.
9. Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, et al. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sc*. 996, 231, 2003.
10. Watt, et al. Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science*. 287, 1427, 2000.



**IL TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO:  
50 ANNI DOPO**



## Nicchie di cellule staminali nel midollo osseo e meccanismi della loro mobilizzazione

*Carlo Bernasconi*

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia.  
Consulente ematologo e coordinatore della ricerca sulle cellule staminali,  
IRCCS Fondazione "Salvatore Maugeri", Pavia

Le nicchie di cellule staminali (CS) sono strutture composte da cellule del microambiente tessutale che fanno da sostegno, nutrimento e protezione per le CS stesse, rendendole capaci di provvedere all'omeostasi di un determinato tessuto. Le CS maggiormente studiate e meglio conosciute sono quelle ematopoietiche, che hanno la capacità di generare le molteplici linee cellulari del sangue e di mantenere per tutta la vita la proprietà dell'autorinnovamento cellulare, dimostrata dall'abilità di ricostituire e mantenere un sistema ematopoietico funzionante dopo trapianto in ricevente irradiato a dosi letali.

È oggi noto che anche il sangue circolante, specie dopo l'attivazione di determinati meccanismi di mobilizzazione, contiene CS che possono recuperare completamente l'ematopoiesi dopo ablazione del midollo osseo. Attualmente CS ematopoietiche raccolte dal sangue periferico vengono correntemente utilizzate per trapianti autologhi e allogenici nella terapia di pazienti affetti da emopatie maligne, con risultati almeno comparabili a quelli ottenuti con l'impiego di midollo osseo (Besinger et al., 2001; Stem Cell Trialist' Collaborative Group, 2005). Inoltre, negli ultimi anni sono stati raccolti dati convincenti, anche se controversi, che indicano come il sangue circolante possa contenere CS con un potenziale multidifferenziativo, e rappresentare quindi una sorgente di CS per la medicina rigenerativa di danni tessuti ischemici o degenerativi (Romagnani et al., 2006).

L'origine e l'esatta natura delle CS derivate dal sangue circolante sono soltanto parzialmente conosciute, e non è chiaro il modo in cui esse generano molteplici tipi cellulari a diversa differenziazione. Parecchi studi in anni abbastanza recenti hanno suggerito il concetto che le CS ematopoietiche possano essere capaci di "transdifferenziare" oltre i confini delle singole linee differenziative, grazie ad una "plasticità" delle CS stesse (Grove et al., 2004). È stata però acutamente formulata anche l'ipotesi che questa apparente plasticità possa invece essere dovuta ad una primitiva eterogeneità delle CS derivate dal midollo osseo, e quindi dal sangue periferico (Kucia et al., 2005). A tal riguardo si deve considerare che il G-CSF (fattore di crescita granulocitario umano) è in grado di mobilizzare nel san-

gue circolante, oltre le CS ematopoietiche, anche cellule clonogeniche di differente origine tessutale (Brugger et al., 1994). Infine, sembra giustificato ritenere che nel midollo osseo e nel sangue periferico possano essere contenute, anche se in quantità molto piccola, CS adulte primitive multipotenti atte a generare CS più mature linea-commissionate, pronte per essere reclutate in risposta ad un danno tessutale.

Dal midollo osseo, e dopo mobilizzazione dal sangue periferico, possono essere derivati diversi tipi di cellule staminali: CS ematopoietiche classiche, CS mesenchimali, progenitori endoteliali, CS tessuto-commissionate. Esistono senz'altro ampie zone di sovrapposizione riguardanti i marcatori fenotipici e le funzioni di questi vari tipi cellulari, però esiste anche una serie di caratteristiche differenziali che li definiscono come entità biologicamente distinte. Appare quindi importante riassumere tali distinzioni.

### **Cellule staminali ematopoietiche**

Le CS ematopoietiche vengono ordinate secondo una gerarchia che inizia con la cellula più indifferenziata e pluripotente, a basso ritmo proliferativo, di recente indicata come "dormiente" (Wilson et al., 2007). Nel midollo osseo le CS dormienti sono localizzate nelle nicchie dell'endostio, mentre le CS ematopoietiche attivate sono maggiormente in contatto con i sinusoidi vascolari del microambiente midollare. Test clonogenici in vitro e in vivo dimostrano che per queste cellule si possono raggiungere elevati gradi di purezza, e la loro funzione è normalmente quella di generare e mantenere tutte le cellule mature delle varie linee ematiche. Come già ricordato, il concetto che le CS ematopoietiche adulte funzionino unicamente per mantenere un'omeostasi ematologica è stato più recentemente contestato da una serie di studi, che hanno suggerito come cellule del midollo osseo non frazionate, o in qualche modo arricchite per un'attività ematopoietica, possano contribuire in basso grado anche ad una multipla attività rigenerativa non-ematopoietica. Per spiegare tale multipotenzialità sono state prospettate diverse possibilità, riportate in ottime rassegne (Herzog et al., 2003; Lakshminpathy e Verfaillie, 2004).

Una serie di legami citochine/recettori tiene più o meno adese le CS ematopoietiche alle strutture del microambiente midollare. Fra questi legami un ruolo senz'altro importante è svolto dall'asse SDF-1/CXCR4. SDF-1 è una chemochina espressa dalle cellule stromali e endoteliali osteomidollari, ed è stato dimostrato che la migrazione di CS 34+ umane attraverso un gradiente di SDF-1 correla con il potenziale di ripopolazione midollare svolto da queste cellule. Quindi l'interazione di SDF-1 con il suo recettore CXCR4, espresso sulle CS ematopoietiche, è l'asse principale che governa l'homing o la mobilizzazione (quando tale asse è ostacolato) delle CS stesse.

Usualmente la mobilizzazione delle CS ematopoietiche viene indotta mediante chemioterapia sola o associata a somministrazione di G-CSF (nel setting di trapianti autologhi), oppure con solo G-CSF (nel setting di trapianti allogenici). Il processo di mobilizzazione è allora indiretto poiché il G-CSF induce un rilascio

di metalloproteinasi, che rompe l'asse SDF-1/CXCR4 e provoca il passaggio delle CS nel sangue circolante (Cottler-Fox et al., 2003). Come possibilità di mobilitazione alternativa è stato sviluppato un antagonista diretto dell'asse SDF-1/CXCR4; si tratta dell'AMD3100 (Plerixafor; Genzyme, Cambridge, MA) una piccola molecola che funziona come un inibitore reversibile di SDF-1 legandosi al CXCR4 (Broxmeyer et al., 2005). L'ADM3100 somministrato da solo induce in poche ore una rapida mobilitazione di cellule CD34+; in pazienti pretrattati con G-CSF lo stesso farmaco aumenta in modo significativo il numero delle cellule CD34+ mobilizzate, se aggiunto all'ultimo giorno di somministrazione del G-CSF. Trapianti sia autologhi che allo genici, eseguiti con CS così mobilizzate, hanno mostrato un rapido attecchimento (Di Persio et al., 2007; Devine et al., 2008).

### Cellule staminali mesenchimali

Accanto alle CS ematopoietiche il midollo osseo contiene CS mesenchimali. Queste sono indicate nella letteratura internazionale con l'acronimo MSC (*mesenchymal stem cell*). Sono cellule multipotenti di origine mesodermica, esistenti in parecchi organi e tessuti connettivi; soprattutto nel midollo osseo, ma anche nei polmoni, intestino, fegato, tessuto adiposo, polpa dentale, sangue placentare e di cordone ombelicale. La loro posizione tipica è quella delle nicchie perivascolari, dove fanno da supporto ad altri tipi cellulari (ad esempio, alle CS ematopoietiche nelle nicchie osteomidollari).

Note da tempo come supporto indispensabile alla normale ematopoiesi (Dexter et al., 1984), la ricerca sulle MSC ha avuto negli ultimi anni un enorme impulso per il loro intervento nei meccanismi di riparazione tissutale. Al riguardo è però da sottolineare che i risultati di questi studi sono di non agevole e univoca interpretazione, a causa della difformità delle procedure utilizzate per l'isolamento e la caratterizzazione delle cellule, e anche per la loro denominazione. Infatti, la mancanza di un preciso criterio di definizione delle MSC ha causato in passato una certa confusione di terminologia, e rappresentato un ostacolo in questo campo di ricerca. Per questo motivo la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) ha emanato una normativa per precisare la definizione delle MSC, raccomandando a tutti i ricercatori di utilizzare in futuro una terminologia corretta e uniforme (Horwitz et al., 2005). Il gruppo dell'ISCT ha anche fornito i criteri minimi per il riconoscimento delle MSC. Tali criteri sono:

- 1) aderenza alla plastica in condizioni colturali standard;
- 2) espressione di CD105, CD73, CD90 e mancanza di espressione di CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19, HLA-DR;
- 3) differenziazione in vitro in osteoblasti, adipociti e condroblasti.

La procedura tradizionale di isolamento delle MSC dal midollo osseo è basata sulla separazione delle cellule mononucleate mediante gradiente di densità e successiva coltura in piastre di plastica. Le cellule mesenchimali sono aderenti alla plastica, e quindi possono venir facilmente separate dalle cellule ematopoietiche non-aderenti. In condizioni colturali appropriate le cellule aderenti formano colo-

nie di varia morfologia, indicate come CFU-F (*colony forming unit-fibroblast*), usualmente composte da una miscela di cellule staminali e di progenitori. In realtà le colonie ottenute da cellule aderenti alla plastica sono abbastanza eterogenee, e sono contaminate da cellule non-mesenchimali (ad es. macrofagi e cellule endoteliali) (Gronthos et al., 2003).

Per evitare le limitazioni dovute alla eterogeneità e contaminazione della procedura tradizionale di isolamento delle MSCs, recentemente sono state sviluppate più precise strategie di immunoselezione ed espansione di sottogruppi di cellule staminali/progenitori mesenchimali osteomidollari. L'immunoselezione consiste nell'isolamento di precursori mesenchimali altamente purificati mediante la loro reazione con specifici anticorpi monoclonali, che sono stati preparati immunizzando topi con precursori di linee mesenchimali umane. Per isolare ed arricchire le MSC dal midollo osseo, e da altri tessuti, sono state utilizzate combinazioni di differenti anticorpi monoclonali diretti verso i seguenti antigeni: STRO-1 (*stromal precursor antigen-1*), CD49a/CD29 (VLA-1,  $\alpha_1\beta_1$  integrine), CD106 (*vascular cell adhesion molecule-1*), CD 146 (MUC-18, *S-endo*), NGFR (*nerve growth factor receptor*), PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*), IGFR (*insuline-like growth factor receptor*) e STRO-3 (*bone-specific alkaline phosphatase*). Le cellule ottenute mediante immunoselezione sono prive di elementi contaminanti ematopoietici, endoteliali e fibroblastici, e presentano molti marcatori caratteristici delle cellule staminali. I sostenitori della immunoselezione affermano che con questa procedura è possibile ottenere colture di popolazioni di MSC omogenee, pure e riproducibili.

Un problema ancora controverso riguarda la presenza di MSC nel sangue periferico dopo mobilitazione con G-CSF. Infatti, secondo i dati comunicati dal gruppo di Hows, le MSC vengono facilmente isolate dal midollo osseo (Wexler et al., 2003; Hows, 2005), mentre sono contenute in quantità molto scarsa (o del tutto assenti) nel sangue periferico mobilitato. Altri studi suggeriscono invece che MSC possono essere ottenute anche dal sangue periferico (Kuwana et al., 2003; Tondreau et al., 2005). In qualsiasi caso, anche per nostra esperienza diretta il midollo osseo appare essere la miglior sorgente di MSC, di cui oggi sono ben note le peculiari caratteristiche di bassa immunogenicità, particolarmente interessanti per procedure trapiantologiche di riparazione tissutale anche allogeniche.

### **Progenitori endoteliali circolanti**

Parecchi studi dimostrano la presenza nel sangue periferico di *endothelial progenitor cells* (EPC), originate dal midollo osseo, che svolgono un importante ruolo nella neovascolarizzazione endogena di tessuti ischemici e nella riparazione endoteliale di danni vascolari (Romagnani et al., 2006). Si ritiene che tali cellule originino da un comune precursore emangioblastico nel midollo osseo (Asahara et al., 1999); inoltre, precursori mesenchimali non-ematopoietici nel midollo osseo (*multipotent adult progenitor cells*, MAPC) in coltura possono transdifferenziare in EPC (Reyes et al., 2002). Altri studi hanno riportato che cellule midollari della linea monocitaria (CD14+) possono differenziare in cellule con caratteristiche di

EPC, e che uno specifico sottogruppo di monociti circolanti può generare EPC. Quindi i progenitori endoteliali circolanti costituiscono un gruppo eterogeneo di cellule originanti nel midollo osseo da molteplici precursori, e presenti nel sangue periferico a differenti stadi di differenziazione.

Un'accurata caratterizzazione delle EPC è difficile, poiché molti dei marcatori fenotipici sono condivisi dalle CS ematopoietiche e dai progenitori endoteliali. Tipicamente, questi ultimi sono definiti in base all'espressione di alcuni marcatori di superficie, quali CD34, Flk-1 e AC133 (Boyer et al., 2000), cui si aggiungono durante la differenziazione altri marcatori endoteliali specifici.

In condizioni basali il contenuto di EPC nel sangue periferico è basso. Il numero dei progenitori endoteliali nel sangue circolante aumenta però di parecchie volte dopo stimolazione esogena con citochine e ormoni; anche le statine e l'esercizio fisico stimolano la mobilizzazione delle EPC. E' però necessario sottolineare che i meccanismi che regolano in vivo la mobilizzazione, l'homing e la differenziazione delle EPC sono ancora in gran parte sconosciuti.

### **Cellule staminali tessuto-commissionate (CSTC)**

Parecchi studi condotti alcuni anni fa avevano suggerito che le CS ematopoietiche adulte potessero essere capaci di transdifferenziare oltre i confini tessuto-specifici, e su tali basi è stato formulato il concetto di una loro plasticità differenziativa. Questo argomento aveva creato molte aspettative nella comunità scientifica, con la prospettiva dell'impiego delle stesse CS ematopoietiche per la rigenerazione di organi e tessuti (dopo un infarto cardiaco, per riparare danni neurologici, ecc.) come alternativa alle CS multipotenti embrionali (Körbling e Estrov, 2003). Studi più recenti non hanno però potuto sostenere il concetto di plasticità delle CS ematopoietiche, sostituito da altre spiegazioni alternative (fusione cellulare, modificazioni epigenetiche, ecc.).

Fra queste la più interessante e convincente appare quella formulata e sostenuta con dati sperimentali dal gruppo di ricerca di Ratajczak e Kucia (2004, 2005), che considera il midollo osseo come sorgente di una popolazione eterogenea di CS tessuto-commissionate (CSTC) CXCR4+. Utilizzando una procedura di isolamento di queste cellule basata sulla migrazione chemiotattica verso un gradiente di SDF-1, combinata con analisi RT-PCR per l'espressione di mRNA per marcatori tissutali e con analisi istochimiche, questi Autori sono riusciti a dimostrare che il midollo osseo contiene una popolazione di cellule CXCR4+ facilmente mobilizzabile, esprimente marcatori di varie CSTC. Sulla base di questi dati hanno quindi formulato il concetto che il midollo osseo possa essere la sede non solo di CS ematopoietiche, ma anche il "nascondiglio" per CXCR4+ CSTC eterogenee non-ematopoietiche che si sono accasate nel midollo osseo durante l'ontogenesi.

Altre recenti ricerche sono state rivolte allo studio dei meccanismi che regolano il traffico delle CS del midollo osseo da e verso il microambiente midollare, e verso i tessuti/organi non-ematopoietici specie dopo un danno (Lapidot et al., 2005; Papayannopoulou e Scadden, 2008). È stato identificato il ruolo di alcuni meccani-

smi chemiotattici (come SDF-1/CXCR4) e di alcune interazioni fondamentali (come VLA-4/VCAM-1), ma è possibile anche che il coinvolgimento di citochine/chemochine e di segnali cellulari tessuto-specifici possa spiegare perché TCSC circolanti abbiano un'elevata affinità, oltre che per le nicchie nel midollo osseo, anche per le nicchie negli organi verso cui esse sono commissionate.

## Bibliografia

1. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 85, 221, 1999.
2. Besinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with haematological cancers. *N Engl J Med.* 344, 175, 2001.
3. Boyer M, Townsend LE, Vogel LM, et al. Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood. *J Vas Surg.* 31, 181, 2000.
4. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med.* 201, 1307, 2005.
5. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, et al. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumor. *Blood.* 83, 636, 1994.
6. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, et al. Stem cell mobilization. *ASH Educ. Program.* 2003, 419-437.
7. Devine SM, Vij R, Rettig M, et al. Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using ADM3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood.* 112, 990, 2008.
8. Dexter TM, Spooncer E, Schofield E, et al. Hematopoietic stem cells and problem of self-renewal. *Blood Cells.* 10, 315, 1984.
9. Di Persio J, Stadtmauer EA, Nademance AP, et al. A phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled comparative trial of ADM3100 (Plerixafor) + G-CSF versus G-CSF + placebo for mobilization in multiple myeloma (MM) patients for autologous hematopoietic stem cell (aHSC) transplantation. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 110, 445, 2007.
10. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sc.* 116, 1827, 2003.
11. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells.* 22, 487, 2004.
12. Herzog EL, Chai L, Krause DS, et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 102, 3483, 2003.
13. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 7, 393, 2005.

14. Hows J. Adult stem cell therapy beyond haematopoietic stem cell transplantation? An update. *Transplant Immunol.* 14, 221, 2005.
15. Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept? *N Engl J Med.* 349, 570, 2003.
16. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ, et al. Are bone marrow stem cells plastic or heterogeneous - That is the question. *Exp Hematol.* 33, 613, 2005.
17. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ, et al. Bone marrow as a source of circulating CXCR4(+) tissue-committed stem cells. *Biol Cell.* 97, 133, 2005.
18. Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, et al. Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 74,833, 2003.
19. Lakshminpathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev.* 19, 29, 2004.
20. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood.* 106, 1901, 2005.
21. Papayannopoulou T, Scadden DT. Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood.* 111, 3923, 2008.
22. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 109, 337, 2002.
23. Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, et al. 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.
24. Romagnani P, Lasagni L, Romagnani S. Peripheral blood as a source of stem cells for regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther.* 6, 1, 2006.
25. Stem Cell Trialist' Collaborative Group. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *J Clin Oncol.* 23, 5074, 2005.
26. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* 23, 1105, 2005.
27. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilicalcord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol.* 121, 368, 2003.
28. Wilson A, Oser GM, Jaworski M, et al. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann NY Acad Sci.* 1106,64, 2007.

## Strategie per l'induzione della tolleranza nei trapianti allogenici

*Franco Aversa*

Ematologia e Immunologia Clinica, Centro Trapianti Midollo Osseo, Ospedale Santa Maria della Misericordia, Università di Perugia

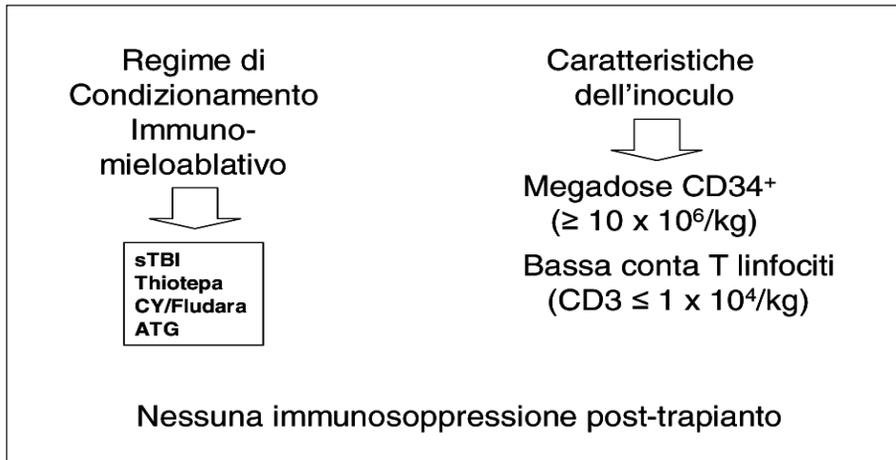
Il trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE) da donatore HLA-identico utilizza, almeno in pazienti affetti da emopatie maligne, una strategia che è fondamentalmente basata su:

1. un regime di condizionamento mieloablativo, che deve garantire l'eradicazione:
  - a) dell'ematopoiesi normale (effetto graft-vs-marrow),
  - b) dell'ematopoiesi patologica (effetto graft-vs-leukemia),
  - c) delle cellule mature del sistema immunitario dell'ospite (effetto graft-vs-host);
2. un inoculo contenente, accanto a progenitori emopoietici, un rilevante numero di T linfociti maturi;
3. una terapia immunosoppressiva post-trapianto per la prevenzione della graft-vs-host disease (GvHD).

In questo contesto trapiantologico, l'alloreattività dei T-linfociti del donatore nei confronti degli alloantigeni del ricevente contribuisce all'attecchimento e all'eradicazione della malattia di base attraverso un effetto graft-vs-leukemia (GvL) correlato all GvHD stessa. L'attivazione della risposta alloimmune è favorita dal regime di condizionamento che, attraverso il danno provocato nei tessuti del paziente e la conseguente liberazione di citochine pro-infiammatorie (TNF- $\alpha$  ed IL-1), comporta attivazione delle antigen-presenting cells (APCs) e aumentata espressione delle molecole di istocompatibilità e di adesione.

Al fine di inibire la reattività GvH delle cellule T mature del donatore presenti nell'inoculo sono stati utilizzati vari immunosoppressori in grado di interferire con la cascata di eventi che dal riconoscimento dell'antigene conduce alla proliferazione clonale di cellule effettrici. Purtroppo nella maggior parte dei pazienti la terapia immunosoppressiva deve essere protratta per mesi o anni fino al raggiungimento della tolleranza attraverso lo sviluppo di cellule T del donatore nel timo del ricevente.

L'induzione, in assenza di terapia immunosoppressiva cronica, di tolleranza specifica nei confronti degli antigeni del donatore - ma non di una terza parte - rimane l'obiettivo primario nel trapianto allogenico di CSE. La tolleranza risulta in

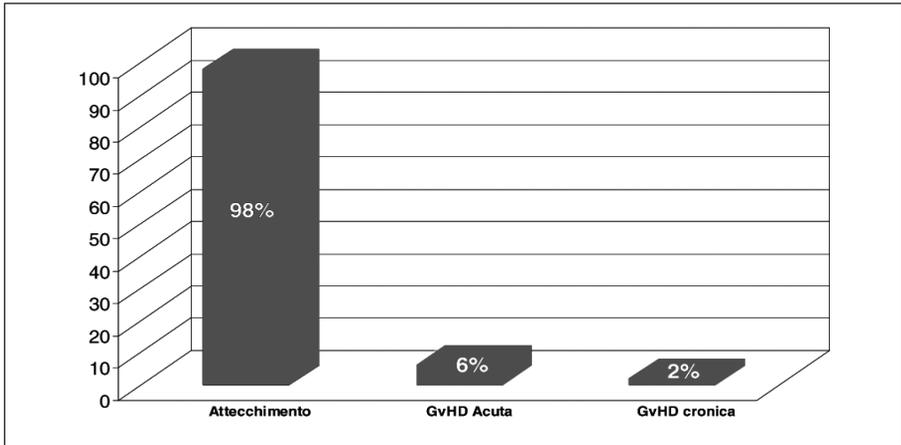


**Fig. 1** - Procedura trapianto HLA-incompatibile.

effetti la cura definitiva del trapianto mentre gli immunosoppressori comunemente utilizzati in clinica controllano l'alloreattività T linfocitaria bidirezionale (GvH e HvG) attraverso un controllo non specifico dell'attivazione T cellulare, dell'espansione clonale e della differenziazione in cellule effettrici. Inoltre, il prolungato impiego di questi farmaci da un lato compromette l'integrità di organi vitali con conseguente maggior rischio tossico e dall'altro rallenta la ricostituzione immunologica con conseguente maggior rischio di infezioni. Entrambi concorrono alla morbidità e mortalità correlate al trapianto.

Una modalità di trapianto di CSE con induzione di tolleranza specifica senza necessità di profilassi farmacologica della malattia trapianto-contro-ospite (Graft-vs-host disease-GvHD) è rappresentata dall'infusione di cellule staminali ematopoietiche mobilizzate nel sangue periferico mediante somministrazione al donatore di G-CSF, raccolte tramite leucaferesi produttiva e quindi immuno-selezionate con separatore cellulare Clinimacs in modo da ottenere un inoculo molto arricchito in cellule CD34<sup>+</sup> (da 5 a 30 x 10<sup>6</sup>/kg) e decisamente scarso in T-linfociti (<3 x 10<sup>4</sup>/kg). Nella nostra esperienza, l'infusione di un siffatto inoculo dopo condizionamento immuno-mieloablativo (Fig. 1) ha consentito di raggiungere, in 276 pazienti con leucemia acuta trapiantati da donatore HLA-incompatibile per un intero aplotipo, l'attecchimento primario nel 95% dei casi e la prevenzione pressochè completa della GvHD sia acuta che cronica in assenza di qualsivoglia immunosoppressione post-trapianto (Tab. 1) (1-4).

In modelli sperimentali è stato recentemente dimostrato che le stesse cellule CD34<sup>+</sup> purificate dal sangue periferico contribuiscono all'attecchimento attraverso l'induzione di anergia nei precursori linfocitari del ricevente che sopravvivono al regime di condizionamento (effetto "veto") (5, 6). Questa spiccata attività tollerizzante dipende dal contatto cellulare e può essere bloccata da inibitori di caspasi suggerendo l'ipotesi che gli effettori cellulari T del ricevente vengono eliminati attraverso l'induzione di apoptosi dei precursori citotossici diretti contro i



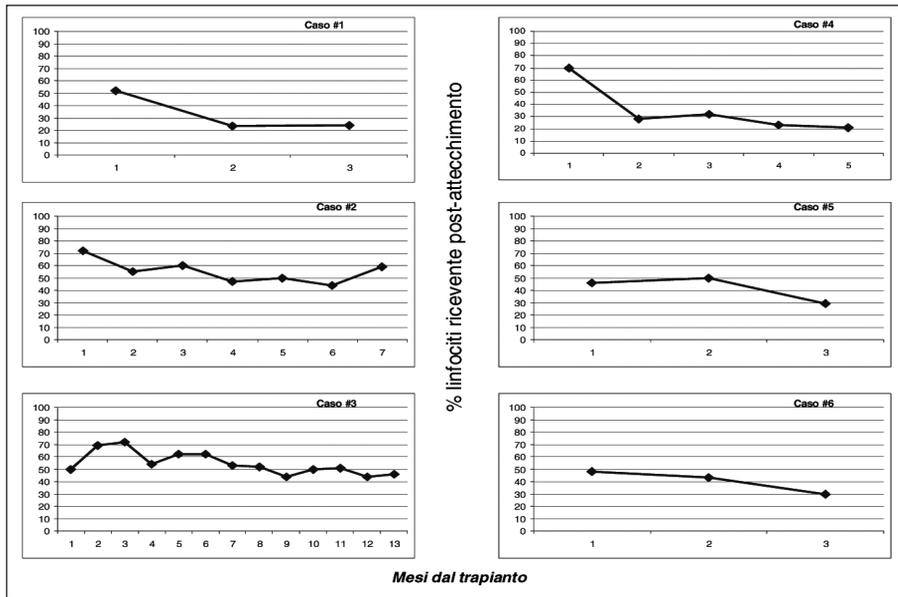
**Tab. 1** - Attecchimento e GvHD in 276 pazienti con leucemia acuta trapiantati da familiare HLA-incompatibile.

loro antigeni dopo interazione con le stesse cellule CD34<sup>+</sup>. Un'azione veto è parimenti esercitata dalla progenie delle CD34<sup>+</sup> che esprime fenotipi mieloidi precoci (CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>; CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>) (7).

Sulla base di queste evidenze, abbiamo testato il ruolo immunologico della megadose di cellule CD34<sup>+</sup> immunoselezionate nel setting del trapianto da donatore HLA-identico dopo un condizionamento non comprensivo di ATG e, nei pazienti di età >60 anni, non basato sulla TBI ma sulla sola chemioterapia (fludarabina, tiotepa, L-PAM). Rigetto e GvHD, nonostante la profonda T-deplezione dell'inoculo, sono stati efficacemente prevenuti in una serie di 41 pazienti adulti-anziani (età mediana 50 anni, range 20-67) con emopatie maligne in fase avanzata (Tab. 2). La ricostituzione linfocitaria post-trapianto è stata rapida e in parte rappre-

<p><b>TBI (n=14)</b>  età: 49 (range: 26-63) anni  Malattia  - AML/ALL: n= 8  - HD/NHL: n= 4  - Altre: n= 2  Stato al trapianto  - CR1/CR2: n= 10  - Avanzata: n= 4</p> <p><b>No TBI (n=17)</b>  età: 58 (range: 20-67) anni  Malattia  - AML/ALL: n= 1  - HD/NHL/MM: n= 12  - Altre: n= 4  Stato al trapianto  - CR1/CR2: n= 1  - Avanzata: n= 16</p>	<b>Regimi di condizionamento</b>																
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Con TBI</th> <th>Senza TBI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>sTBI 8 Gy Thiotepa 10 mg/kg Fludarabina 40mg/m<sup>2</sup> x 4</td> <td>Thiotepa 10 mg/kg Fludarabina 40mg/m<sup>2</sup> x 4 L-PAM 140 mg/m<sup>2</sup></td> </tr> </tbody> </table>	Con TBI	Senza TBI	sTBI 8 Gy Thiotepa 10 mg/kg Fludarabina 40mg/m <sup>2</sup> x 4	Thiotepa 10 mg/kg Fludarabina 40mg/m <sup>2</sup> x 4 L-PAM 140 mg/m <sup>2</sup>												
Con TBI	Senza TBI																
sTBI 8 Gy Thiotepa 10 mg/kg Fludarabina 40mg/m <sup>2</sup> x 4	Thiotepa 10 mg/kg Fludarabina 40mg/m <sup>2</sup> x 4 L-PAM 140 mg/m <sup>2</sup>																
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Risultati</th> <th>TBI</th> <th>No-TBI</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>rigetto</td> <td>0/14</td> <td>0/17</td> </tr> <tr> <td>GvHD</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>  Acuta ? II</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>  Cronica Estesa</td> <td>1</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>		Risultati	TBI	No-TBI	rigetto	0/14	0/17	GvHD			Acuta ? II	0	0	Cronica Estesa	1	0
Risultati	TBI	No-TBI															
rigetto	0/14	0/17															
GvHD																	
Acuta ? II	0	0															
Cronica Estesa	1	0															

**Tab. 2** - Trapianto T-depletato da familiare HLA-identico.



Tab. 3 - Chimerismo linfoide periferico.

sentata da cellule T del ricevente tolleranti verso le CSE del donatore e in grado di proteggere il paziente dalle infezioni nei primi mesi post-trapianto. La Tab 3 mostra l'andamento nel tempo del chimerismo linfoide misto nel sangue periferico di alcuni pazienti; a fronte di un chimerismo "full donor" degli elementi non linfoidi, è evidente la presenza di linfociti del ricevente tolleranti nei confronti delle cellule staminali del donatore. Il fenomeno si osserva in pazienti condizionati con sola chemioterapia a conferma che la TBI induce una profonda deplezione del sistema immune residua del ricevente e consente attecchimenti sia granulocitici che linfocitici di tipo "full donor".

Una potente attività "veto" è esercitata anche da linfociti T  $CD8^+$ . Recentemente è stato dimostrato che la stimolazione di T linfociti  $CD8^+$  contro una 3<sup>o</sup> parte, in condizioni di privazione di IL-2, genera una notevole quantità di linfociti T citotossici (CTLs), privi di reattività GvH, ma con potente attività "veto": essi sono in grado di sopprimere specificamente i precursori T citotossici diretti contro gli antigeni delle stesse cellule, ma non contro antigeni di una terza parte (8, 9). La tolleranza indotta da cellule "veto" del donatore è vantaggiosa e desiderabile in quanto il fenomeno immunologico è confinato solamente alla inattivazione dei cloni anti-donatore senza intaccare le altre funzioni immunitarie di sorveglianza anti-infettiva e anti-tumorale.

Queste cellule, in un modello murino che valuta il rigetto di cellule allogeniche midollari mediato da T linfociti, sono in grado di facilitare, in sinergia con la rapamicina, l'attecchimento del trapianto T depleto in assenza di GvHD (10).

CTLs umane non reattive nei riguardi del ricevente sono state generate con una simile metodologia. In un modello chimerico uomo→topo ed in vitro, si è dimo-

strato che le CTLs contro la 3° parte privi di alloreattività nei riguardi di cellule periferiche normali allogeniche hanno un potente effetto litico nei riguardi delle cellule della B-CLL ma non verso i blasti della AML. Mentre il killing delle cellule della terza parte viene bloccato dall'aggiunta di un anticorpo anti-CD3, la lisi delle cellule della B-CLL non è inibita da questo anticorpo, per cui la citotossicità sembra essere indipendente dal TCR, mentre viene inibita da un anticorpo anti-LFA-I (11). Questi dati suggeriscono una nuova modalità di trapianto allogenico per pazienti con B-CLL che dispongono di un familiare HLA identico: regime di condizionamento a bassa tossicità, non mieloablativo, megadose di cellule CD34<sup>+</sup> purificate e infusione di CTLs del donatore contro la 3° parte. È ipotizzabile che queste ultime cellule prive di reattività GvH, facilitino l'attecchimento in virtù della loro attività veto e al contempo contribuiscono all'eradicazione della malattia. Recentemente è stata identificata una particolare subpopolazione di cellule T CD4<sup>+</sup> che costitutivamente presentano elevate espressioni della catena  $\alpha$  del recettore per l'IL-2 (CD25). Queste cellule T regolatorie (Tregs) sono in gran parte prodotte dal timo normale costituiscono il 5-10% dell'intera popolazione di cellule CD4<sup>+</sup> nel topo e nell'uomo. Esse esprimono specificamente il fattore di trascrizione Fox P3, che appare funzionare come gene di controllo principale nel loro sviluppo a funzione (12, 13). Tregs sono in grado di espandersi in vivo e la loro proliferazione in vivo è TGF- $\beta$  dipendente (14). Da un punto di vista funzionale esse sono "uniche" nel senso che dopo stimolazione con specifici antigeni, sono in grado di sopprimere potentemente le attivazioni/proliferazioni di altre cellule T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) in maniera antigene non-specifica, verosimilmente attraverso interazioni cellule-cellule sulle APCs (2, 13).

Le cellule CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs controllano le cellule T alloreattive in maniera simile alle cellule T autoreattive; le loro proprietà immunologiche possono, quindi, essere sfruttate per stabilire nell'allotrapianto una tolleranza in senso HvG e GvH. È stata anche documentata un'azione sinergica tra Tregs, CTLs contro la 3<sup>a</sup> parte e rapamicina nell'induzione di uno stato di tolleranza (15).

Mentre l'uso di una megadose di cellule CD34<sup>+</sup> è in grado di garantire l'attecchimento dopo condizionamenti mieloablativi, l'infusione di grandi numeri di altre cellule "veto" potrebbe consentire l'attecchimento anche dopo condizionamenti ad intensità ridotta e quindi potenzialmente meno tossici e pertanto applicabili anche in pazienti di età avanzata e/o con severe co-morbidity.

### **Bibliografia essenziale**

1. Aversa F, Tabilio A, Terenzi A, et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood*. 1994; 84: 3948-3955.
2. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med*. 1998; 339(17): 1186-1193.

3. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, et al. Full-haplotype mismatched hematopoietic stem cell transplantation: A phase II study in patients with acute leukemia at high risk or relapse. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3447-3454.
4. Aversa F, Reisner Y, Martelli MF. The haploidentical option for high-risk haematological malignancies. *Blood Cells. Molecules and Disease*. 2008; 40: 8-12.
5. Rachamin N, Gan J, Segall R, et al. Tolerance induction by "megadose" hematopoietic transplants: donor-type human CD34 stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture. *Transplantation*. 1998; 65: 1386-1393.
6. Gur H, Krauthgamer R, Bachar-Lustig E, et al. Immune regulatory activity of CD34+ progenitor cells: evidence for a deletion-based mechanism mediated by TNF-alpha. *Blood*. 2005; 105(6): 2585-2593.
7. Gur H, Krauthgamer R, Berrebi A, et al. Tolerance induction by megadose hematopoietic progenitor cells: expansion of veto cells by short-term culture of purified human CD34(+) cells. *Blood*. 2002; 99: 4174-4181.
8. Reich-Zeliger S, Zhao Y, Krauthgamer R, Bachar-Lustig E, Reisner Y. Anti-third party CD8+ CTLs as potent veto cells: coexpression of CD8 and FasL is a prerequisite. *Immunity*. 2000; 13(4): 507-515.
9. Aviner S, Yao X, Krauthgamer R, et al. Large-scale preparation of human anti-third-party veto cytotoxic T lymphocytes depleted of graft-versus-host reactivity: a new source for graft facilitating cells in bone marrow transplantation. *Hum Immunol*. 2005; 66(6): 644-652.
10. Bachar-Lustig E, Reich-Zeliger S, Reisner Y. Anti-third-party veto CTLs overcome rejection of hematopoietic allografts: synergism with rapamycin and BM cell dose. *Blood*. 2003; 102(6): 1943-1950.
11. Arditti FD, Aviner S, Dekel B, et al. Eradication of B-CLL by autologous and allogeneic host nonreactive anti-third-party CTLs. *Blood*. 2005; 105(8): 3365-3371.
12. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005; 6(4): 345-352.
13. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133(5): 775-787.
14. Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2004; 101(13): 4572-4577.
15. Steiner D, Brunicki N, Bachar-Lustig E, Taylor PA, Blazar BR, Reisner Y. Overcoming T cell-mediated rejection of bone marrow allografts by T-regulatory cells: synergism with veto cells and rapamycin. *Exp Hematol*. 2006; 34(6): 802-808.

## NK cell immunotherapy in haploidentical transplantation

*Andrea Velardi*

Ematologia e Immunologia Clinica, Centro Trapianti Midollo Osseo, Ospedale Santa Maria della Misericordia, Università di Perugia

Natural killer (NK) cell function is regulated by activating and inhibitory receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules (1-4). In humans, Killer-Cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) genes codify for inhibitory and activating KIRs. Inhibitory KIRs recognize amino acids in the COOH-terminal portion of the MHC class I  $\alpha 1$  helix. They possess two (KIR2D) or three (KIR3D) extra-cellular C2-type Ig-like domains and a long cytoplasmic tail (L) containing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIM) which recruit and activate SHP-1 and SHP-2 phosphatases for inhibitory signal transduction. KIR2DL1 recognizes HLA-C alleles characterized by a Lys80 residue (HLA-Cw4 and related, “Group 2” alleles). KIR2DL2 and KIR2DL3 recognize HLA-C with an Asn80 residue (HLA-Cw3 and related, “Group 1” alleles). KIR3DL1 is the receptor for HLA-B and A allotypes with Bw4 motifs at positions 77-83 (5-7). Finally, KIR3DL2 is the receptor for HLA-A3/11.

Another type of human NK cell inhibitory receptor involved in HLA recognition is CD94-NKG2A which binds to the non-conventional class I molecule HLA-E. Several HLA class I alleles provide signal sequence peptides that bind HLA-E and allow its expression at the cell surface. Consequently, it is expressed in every individual.

Functional NK cells in the mature repertoire express at least one inhibitory receptor for self HLA (4). NK cells expressing receptors which do not recognize self are retained in the repertoire in, however, an anergic (or “hypofunctional”) state (2, 3, 8-10).

NK cells with the potential to exert alloreaactions use KIRs as inhibitory receptors for self (4, 11-16). Those which express, as their only inhibitory receptor for self, a KIR for the HLA class I group which is absent on allogeneic targets, sense the missing expression of the self class I KIR ligand and mediate alloreaactions (“missing self” recognition).

### **Donor-versus-recipient NK cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation**

Donor-versus-recipient NK cell alloreactions are generated between individuals who are mismatched for HLA-C allele groups and/or the HLA-Bw4 group (17-20). Most donors have the potential to exert NK alloreactions as they possess a full repertoire of inhibitory KIR genes (16, 20, 21). HLA-C group 1 receptor genes (KIR2DL2 and/or KIR2DL3) are present in 100% of individuals, and the HLA-C group 2 receptor gene (KIR2DL1) in 97%. Therefore, the combination of HLA-C group 2-positive donor/HLA-C group 2-negative recipient which occurs in ~1.5% of HLA-C group mismatched transplants, requires donor KIR2DL1 gene typing. In one study on a large cohort [20], functional analyses detected alloreactivity when NK clones were tested against HLA-C group mismatched allogeneic targets. Frequencies of alloreactive NK clones were high, i.e.,  $8 \pm 6$  cells in 100 (mean $\pm$ SD) for HLA-C group 2 mismatches;  $5 \pm 3$  cells in 100 for group 1 mismatches.

The HLA-Bw4 receptor gene (KIR3DL1) is found in ~90% of individuals. When NK clones from HLA-Bw4-positive individuals who possessed the KIR3DL1 gene were tested against allogeneic HLA-Bw4-negative targets, alloreactive NK clones were detected in only 2/3 of individuals (20). Failure to detect alloreactive NK clones may be due to their highly variable frequencies, or because certain allelic KIR3DL1 variants do not allow receptor expression at the cell membrane (22, 23). In 20 donor-recipient pairs that were not KIR ligand-mismatched in the graft-versus-host direction, no donor alloreactive NK clones were found, indicating that KIR ligand mismatching is a prerequisite for NK cell alloreactivity (20).

In vitro studies on primary lympho-hematopoietic lineage tumor cells showed alloreactive NK cells kill acute and chronic myeloid leukemia, as well as T-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic lymphocytic leukemia, non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma (15). The only non-susceptible target was common ALL (15, 17). Alloreactive NK cells also exerted significant cytotoxicity against melanoma and renal cell carcinoma cell lines (24).

In HLA haplotype-mismatched ("haploidentical") hematopoietic transplantation with a potential for donor versus recipient NK cell alloreactivity, engrafted stem cells regenerated the same repertoire as the donor's, including donor-versus-recipient alloreactive NK cells for up to one year (17, 20). In an updated analysis (20), 112 high-risk acute myeloid leukemia (AML) patients received haploidentical transplants from NK alloreactive (n=51) or non-NK alloreactive donors (n=61). Transplantation from NK-alloreactive donors was associated with a significantly lower relapse rate in patients transplanted in complete remission (3% vs 47%) (P<0.003), better event-free survival in patients transplanted not only in remission (67% vs 18%, P=0.02) but also in relapse (34% vs 6%, P=0.04), overall reduced risk of relapse or death (P<0.001).

The 67% probability of surviving event-free for AML patients transplanted in remission from NK alloreactive donors is in the range of best survival rates after

transplantation from unrelated donors and cord blood units. The *in vitro* resistance of common phenotype ALL to alloreactive NK killing was paralleled by lack of anti-leukemia effect in adult patients. However, in ALL in children, transplantation from NK alloreactive donors was reported to decrease the risk of relapse (25, 32).

One recent study showed NK cell alloreactivity after haploidentical transplantation provided much better protection from leukemia relapse when exerted by maternal donors (as opposed to any other donor-recipient family relationship) (25). The effect was independent of, and additive to, the beneficial effects of NK alloreactivity. Better outcome of mother-to-child transplantation may be due to maternal immune system exposure to fetal antigens during pregnancy and ensuing memory T cell immunity against the child's paternal HLA haplotype. Apparently, the few T cells which contaminate the maternal stem cell graft contain memory T cells which are specific for, and upon expansion, will react against, the paternal HLA haplotype in the child.

The Eurocord-Netcord and Acute Leukaemia Working Party of the EBMT assessed NK cell alloreactivity in unrelated cord blood transplantation in 218 acute leukemia patients and found it was associated with a significantly reduced incidence of relapse ( $p=0.05$ ) and better leukemia free-survival (73% vs 38%,  $p=0.0016$ ). Benefits were significantly more marked in patients with AML (Willemze R et al. Van Bekkum Award, Annual EBMT Meeting. Florence, Italy, March 30-April 2, 2008).

This cord blood transplant study contained several KIR ligand mismatches involving HLA-A3/A11 which have not yet been observed in haploidentical transplantation. HLA-A3/A11 appear to function as ligands for KIR3DL2 only when binding Epstein-Barr Virus peptides (26). Future studies will have to ascertain whether post-transplant Epstein-Barr Virus reactivation makes peptides available for A3/A11 binding and, consequently, leads to generation of A3/A11-specific donor NK cells which are alloreactive against recipients lacking A3 and/or A11.

Thus, NK cell alloreactivity is effective in haploidentical and cord blood transplantation. Intriguingly, one common feature is lack of memory T cells in the graft (due to T cell depletion in haploidentical and T cell naive in cord blood transplants) which, apparently, permits recovery of fully functional NK cells. Interestingly, one study comparing T cell-depleted versus replete unrelated donor transplants demonstrated that T cells in the graft adversely affected reconstitution of KIR-bearing NK cells and clinical outcomes (27).

Additional evidence that T cells antagonize reconstitution of potentially alloreactive, KIR-bearing NK cells (27) derives from several other unrelated donor transplant studies, using T cell-replete grafts (28-39). Most studies showed no advantage in transplantation from KIR ligand-mismatched donors (28-34), while a few observed an increased graft-versus-leukemia effect (35-39). Interestingly, the study that reported the most marked survival advantage was performed in KIR ligand-mismatched transplant recipients who received pre-transplant anti-thymocyte globulins (ATG) to exert *in vivo* T cell depletion (35).

## Conclusions

This review focussed on the role of NK cell allorecognition of missing self on KIR ligand mismatched allogeneic leukemia cells in hematopoietic transplantation (“donor-versus-recipient NK cell alloreactivity”). Later, the “missing ligand” model was proposed as a better algorithm. It postulated donor hypofunctional NK cells which carry inappropriate inhibitory KIR(s) for donor and recipient HLA become activated upon transplantation and exert anti-leukemia effects. It was reported to reduce leukemia relapse in matched sibling and unrelated donor transplants but also resulted in severe GvHD. Additional reports explored the role of donor activating KIR genetics and provided diverse results in T cell replete vs T cell-depleted transplants, suggesting it affected T or NK cell functions according to graft composition.

Donor-versus-recipient NK cell alloreactivity, on the other hand, is effected by the functional repertoire of donor NK cells which use, as their only inhibitory receptor for self, a KIR for the HLA class I group which is absent in the recipient and sense the missing expression of the self class I KIR ligand(s). Donor-versus-recipient NK clones were consistently documented in the donor and in the reconstituting patient’s NK cell repertoire after transplant. Donor-versus-recipient NK cell alloreactivity greatly improves outcomes of haploidentical and cord blood transplants by controlling acute myeloid leukemia relapse without causing GvHD.

It is hoped the dramatic improvements afforded by the discovery of the role of NK cell alloreactivity will extend use of haploidentical transplants, as the donors are, unlike the unrelated, immediately available family members.

## References

1. Rosen DB, Cao W, Avery DT, Tangye SG, Liu YJ, Houchins JP, Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol.* 2008; 9: 495-502.
2. Gasser S, Raulet DH. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev.* 2006; 214: 130-142.
3. Yokoyama WM, Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev.* 2006; 214: 143-154.
4. Parham P. Taking license with natural killer cell maturation and repertoire development. *Immunol Rev.* 2006; 214: 155-160.
5. Thananchai H, Gillespie G, Martin MP, Bashirova A, Yawata N, Yawata M, Easterbrook P, McVicar DW, Maenaka K, Parham P, et al. Cutting Edge: Allele-specific and peptide-dependent interactions between KIR3DL1 and HLA-A and HLA-B. *J Immunol.* 2007; 178: 33-37.
6. Foley BA, De Santis D, Van Beelen E, Lathbury LJ, Christiansen FT, Witt CS. The reactivity of Bw4-positive HLA-B and HLA-A alleles with KIR3DL1: implications for patient and donor suitability for haploidentical stem cell transplants. *Blood.* 2008, in press (Epub ahead of print Apr 2, 2008).

7. Stern M, Ruggeri L, Capanni M, Mancusi A, Velardi A. Human leukocyte antigens A23, A24 and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood*. 2008, in press (Epub ahead of print May 23, 2008).
8. Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulat DH. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*. 2005; 105: 4416-4423.
9. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005; 436: 709-713.
10. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, Bresio V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagné F, Ugolini S, Vivier E. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006; 2:331-342.
11. Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2004; 16: 626-633.
12. Ciccone E, Pende D, Viale O, Di Donato C, Tripodi G, Orengo AM, Guardiola J, Moretta A, Moretta L. Evidence of a natural killer (NK) cell repertoire for (allo) antigen recognition: definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans. *J Exp Med*. 1992; 175: 709-718.
13. Colonna M, Brooks EG, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science*. 1993; 260: 1121-1124.
14. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Functionally and Structurally Distinct NK Cell Receptor Repertoires in the Peripheral Blood of Two Human Donors. *Immunity*. 1997; 7: 739-751.
15. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri M. Natural Killer cell receptors: new biology and insights into the graft versus leukemia effect. *Blood*. 2002; 100: 1935-1947.
16. Velardi A, Ruggeri L, Moretta A, Moretta L. NK-cells: a lesson from mismatched haematopoietic transplantation. *Trends Immunol*. 2002; 23: 438-444.
17. Parham P, McQueen KL. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 108-122.
18. Ruggeri L, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Haploidentical transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev*. 2006; 214: 202-218.
19. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL, Parham P. Human diversity in killer-cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. 1997; 7:753-763.
20. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999; 94: 333-339.

21. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, et al. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science*. 2002; 295: 2097-2100.
22. Kärre K. A Perfect Mismatch. *Science*. 2002; 295: 2029-2031.
23. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, Stern M, Pende D, Perruccio K, Burchielli E, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007; 110: 433-440.
24. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev*. 2002; 190: 40-52.
25. Pando MJ, Gardiner CM, Gleimer M, McQueen KL, Parham P. The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL\*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at position 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol*. 2003; 171: 6640-6647.
26. Thomas R, Yamada E, Alter G, Martin MP, Bashirova AA, Norman PJ, Altfeld M, Parham P, Anderson SK, McVicar DW, Carrington M. Novel KIR3DL1 alleles and their expression levels on NK cells: convergent evolution of KIR3DL1 phenotype variation? *J Immunol*. 2008; 180:6743-6750.
27. Igarashi T, Wynberg J, Srinivasan R, Becknell B, McCoy JP Jr, Takahashi Y, Suffredini DA, Linehan WM, Caligiuri MA, Childs RW. Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood*. 2004; 104: 170-177.
28. Stern M, Ruggeri L, Mancusi A, Bernardo ME, De Angelis C, Bucher C, Locatelli F, Aversa F, Velardi A. Survival after T-cell depleted haploidentical stem cell transplantation is improved with mothers as donors. *Blood* 2008, in press (Epub ahead of print May 20, 2008).
29. Hansasuta P, Dong T, Thananchai H, Weekes M, Willberg C, Aldemir H, Rowland-Jones S, Braud VM. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol*. 2004; 34:1673-1679.
30. Cooley S, McCullar V, Wangen R, Bergemann TL, Spellman S, Weisdorf DJ, Miller JS: KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation. *Blood*. 2005; 106: 4370-4376.
31. Davies SM, Ruggeri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, Velardi A, Blazar BR: Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. *Blood*. 2002; 100: 3825-3827.
32. Lowe EJ, Turner V, Handgretinger R, Horwitz EM, Benaim E, Hale GA, Woodard P, Leung W. T-cell alloreactivity dominates natural killer cell alloreactivity in minimally T-cell-depleted HLA-non-identical paediatric bone marrow transplantation. *Br J Haematol*. 2003; 123: 323-326.
33. Bornhauser M, Schwerdtfeger R, Martin H, Frank KH, Theuser C, Ehninger

- G. Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Blood*. 2004; 103: 2860-2861.
34. Farag SS, Bacigalupo A, Eapen M, Hurley C, Dupont B, Caligiuri MA, Boudreau C, Nelson G, Oudshoorn M, van Rood J, et al. The effect of KIR ligand incompatibility on the outcome of unrelated donor transplantation: a report from the center for international blood and marrow transplant research, the European blood and marrow transplant registry, and the Dutch registry. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006; 12: 876-884.
35. Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, Romeo E, Cognet C, Martinetti M, Maccario R, Mingari MC, Vivier E, Moretta L, Locatelli F, Moretta A. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and re-definition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 2008 Oct 22. [Epub ahead of print].

## Importanza clinica della malattia minima residua post-trapianto

*Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano,  
Silvia Calatroni, Barbara Rocca, Ilaria Giardini, Rita Zappatore,  
Irene Dambruoso, Marilena Caresana*

Divisione di Ematologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia

A tutt'oggi il limite più rilevante nella cura delle leucemie acute e croniche è costituito dalla possibile ripresa della malattia (recidiva leucemica) dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (CSE) (Chung et al., 2008). Questa evenienza si osserva nel 70% circa dei pazienti nonostante venga impiegata una chemioterapia sovra-massimale come regime di condizionamento al trapianto, possano essere somministrate nel periodo successivo al trapianto terapie dirette al difetto molecolare responsabile di quel dato disordine onco-ematologico, venga potenziata la reazione immunologica delle cellule linfoidi del donatore nei confronti della popolazione leucemica eventualmente residua nel ricevente (Kumar, 1994; Shaw et al., 2008). I fattori che si associano ad un aumentato rischio di ripresa della malattia sono: una malattia attiva o in remissione parziale (RP) al momento del trapianto, un regime di condizionamento al trapianto di tipo non mieloablativo, un cariotipo sfavorevole. Sfortunatamente, una volta che si è verificata la recidiva leucemica, bassa è la probabilità di ottenere una nuova remissione, breve è la sopravvivenza e scarsissime sono quindi le prospettive di guarigione anche nel caso in cui venga somministrata al paziente una nuova chemioterapia di induzione della remissione. Una strategia per combattere la recidiva post-trapianto è la costante ricerca di un'eventuale malattia minima residua (MMR) presente nel ricevente dopo il trapianto. Il trattamento della MMR va effettuato il più precocemente possibile, prima che si verifichi una franca ripresa ematologica della malattia. Negli ultimi dieci anni la tecnologia per dimostrare una MMR è progressivamente progredita e migliorata. Numerosi sono gli studi che hanno dimostrato come la presenza di un'eventuale MMR sia effettivamente in grado di predire una franca recidiva leucemica. Per comprendere il concetto di MMR bisogna ricordare che al momento della diagnosi si suppone che la quota di cellule leucemiche ("leukemic burden") presenti nel paziente sia pari a circa il  $10^{10}$ - $10^{12}$  dell'intera popolazione cellulare midollare (Fig. 1). La chemioterapia d'induzione permette, nel migliore dei casi, di ridurre la popolazione leucemica di circa tre logaritmi con conseguimento di uno stato di remissione completa (assenza o  $\leq 5\%$  di cellule leucemiche all'esame morfologico del midollo osseo).

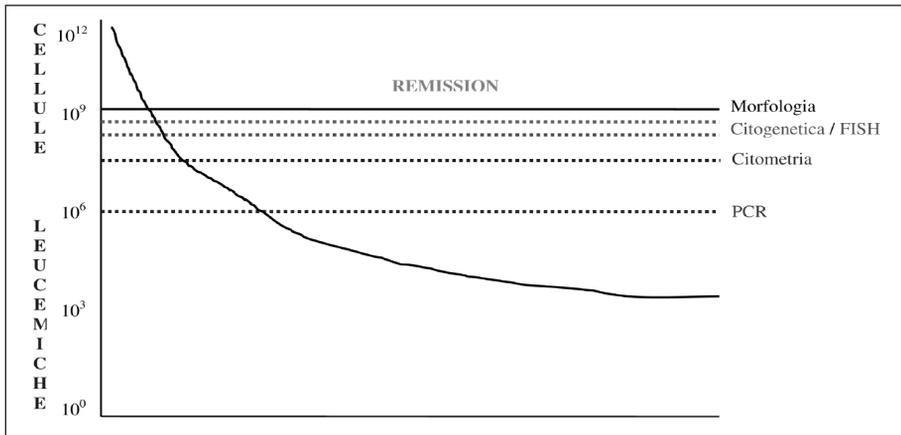


Fig. 1

Nonostante questo traguardo milioni di cellule leucemiche continuano ad essere presenti nel paziente. È quindi molto importante sul piano clinico che tale popolazione cellulare venga dimostrata e quantificata nel modo più accurato ed il più precocemente possibile prima e dopo il trapianto in modo tale da poter attivare tutte quelle misure terapeutiche volte alla sua eradicazione.

### Metodiche per dimostrare un'eventuale MMR

#### *Analisi cromosomica convenzionale e molecolare (FISH)*

Se viene analizzato un numero sufficiente di metafasi l'esame citogenetico convenzionale permette di dimostrare una cellula leucemica su 100 cellule normali (sensibilità  $10^{-1}$ ) (Hook, 1977; Arthur et al., 1988) (Tab. 1). Quindi, l'analisi cromosomica convenzionale è il metodo di prima scelta per definire la remissione citogenetica e/o per dimostrare anomalie cromosomiche che compaiono durante il decorso clinico. Tuttavia, il principale limite della citogenetica convenzionale sta nel fatto che vengono esaminate solo le cellule in divisione (metafasi).

La FISH, invece, utilizzando sonde cromosoma- e locus-specifiche per dimostrare lesioni geniche tipiche della malattia, può essere eseguita su cellule sia in metafase che in interfase e quindi non richiede che la cellula in studio sia in divisione. Inoltre, la FISH permette l'esame di 200-10.000 cellule ottenute anche da campioni non analizzabili dall'analisi citogenetica convenzionale, identifica pic-

**Tab. 1** - Sensibilità delle metodiche utilizzate per individuare una MMR.

Metodica	Bersaglio	Sensibilità (%)
Esame istologico	Morfologia cellulare	5
Citogenetica	Struttura dei cromosomi	1-6
FISH	Marcatori genici specifici	0.08-6
Citometria a flusso	Espressione degli antigeni di membrana	0.1-1
PCR	Analisi di sequenze di DNA o RNA	0.0001-0.1

cole popolazioni clonali e anomalie non dimostrabili dall'analisi cromosomica convenzionale. Pertanto, la sensibilità della FISH è superiore a quella della citogenetica convenzionale. Infatti, la FISH identifica una cellula leucemica su 100-1000 cellule esaminate a seconda del numero di sonde impiegate e del numero dei nuclei interfasci analizzati. La sensibilità della FISH può essere ulteriormente migliorata se essa è associata ad altre metodiche [esame di un buon numero di metafasi ("hypermetaphase FISH"), esame morfologico, esame immunofenotipico ("FICTION")] o se viene condotta su cellule precedentemente sortate al citofluorimetro (Nylund et al., 1994; Bernell et al., 1996; Seong et al., 1997).

#### *Analisi immunofenotipica*

Particolari antigeni di superficie possono essere sfruttati per distinguere le cellule di un determinato disordine onco-ematologico dalle cellule sane. Anche se in onco-ematologia non vi sono antigeni specifici di una data popolazione neoplastica, le cellule dei pazienti affetti dai vari disordini onco-ematologici differiscono da quelle normali per sottili differenze nel proprio profilo immunofenotipico (Campana et al., 2002). Quest'ultimo può essere definito grazie alla cosiddetta citometria a flusso multiparametrica ("multiparametric flow cytometry") che, impiegando diversi anticorpi monoclonali (di solito cinque), identifica un "fingerprint" (assetto) immunofenotipico specifico della popolazione neoplastica in studio. Tale metodica raggiunge nelle mani di esperti una sensibilità compresa tra  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . La "multiparametric flow cytometry" si è rivelata quindi molto utile per la valutazione di una MMR in pazienti con leucemia acuta mieloide (LAM) e leucemia acuta linfoide (LAL), neoplasie ematologiche costituite da cellule che spesso mostrano una espressione antigenica diversa da quella delle cellule ematopoietiche sane. Se in futuro l'impiego simultaneo di sette o più anticorpi monoclonali aumenterà ulteriormente la sensibilità della metodica, la "multi-parametric flow cytometry" potrebbe soppiantare la reazione polimerasica a catena ("polymerase chain reaction", PCR) per la ricerca di un'eventuale MMR.

#### *"Polymerase chain reaction" (PCR)*

È la metodica più sensibile per ricercare e quantificare cellule leucemiche e linfomatose residue e sfrutta la possibilità di amplificare acidi nucleici mediante una reazione polimerasica a catena (Saiki et al 1988). Il bersaglio di tale reazione, che deve essere il più sensibile e specifica possibile, è la lesione genica specifica di un dato disordine onco-ematologico. In tal modo i geni di fusione prodotti dai riarrangiamenti cromosomici osservati nella leucemia mieloide cronica (LMC) e nella LAL [t(9;22)], nelle LAM [t(8;21), t(15;17), inv(16)] e nei linfomi non-Hodgkin [t(8;14), t(11;14), t(14;18)] possono venire prontamente amplificati e diventare marcatori di MMR (Pallisgaard et al, 1998). Nella LAL la PCR è spesso impiegata per amplificare la regione variabile CDRIII dei geni delle catene pesanti delle immunoglobuline e del recettore della cellula T (Cave et al., 1998). I vantaggi della PCR sono un'eccellente sensibilità e specificità, mentre gli svantaggi sono la possibilità di ottenere risultati falsamente positivi per problemi di contaminazione e risultati falsamente negativi per degradazione del RNA (Tab. 1).

## Predizione della recidiva

### *MMR nella LMC*

Molti studi hanno esaminato i rapporti tra MMR e recidiva di malattia nei pazienti con LMC sottoposti a trapianto di CSE ed hanno prodotto le seguenti informazioni: la ricerca del trascritto BCR-ABL, prodotto dalla traslocazione 9;22, è ugualmente efficace sia che venga condotta su sangue periferico che su sangue midollare, la reazione di PCR quantitativa (QPCR), ormai eseguita di routine da molti laboratori, quantifica il trascritto molto meglio della reazione qualitativa che invece dimostra solo la presenza o l'assenza del trascritto, una positività della PCR sia qualitativa che quantitativa predice la recidiva di malattia e possiede una significatività diversa a seconda del tempo intercorso dal trapianto e del tipo di trapianto eseguito (Hughes et al., 1991; Roth et al., 1992; Lion et al., 1993; Miyamura et al., 1993; Radiche et al., 1995; Pichert et al., 1995;).

Per quanto riguarda il tempo intercorso dal trapianto, la persistenza del trascritto BCR-ABL a meno di tre mesi dal trapianto non è predittiva di recidiva, mentre la dimostrazione del trascritto a meno di dodici mesi dal trapianto si associa ad un rischio di recidiva molto alto (Hughes et al., 1991). Infatti, in uno studio condotto in trecentoquarantasei pazienti la presenza del trascritto BCR-ABL a 6-12 mesi dal trapianto si accompagnava ad un rischio di ripresa della malattia del 42%, mentre l'assenza del trascritto ad un rischio di recidiva solo del 3% (Pichert et al., 1995).

Una MMR può essere individuata dalla QPCR anche a distanza di anni dal trapianto. Però, se da un lato è stato osservato che il 25-50% dei pazienti con persistenza del trascritto BCR-ABL a  $\geq 3$  anni dal trapianto presenta un tasso di recidiva del 10-20%, è stato dall'altro osservato che pazienti con trascritto persistentemente presente a dieci anni dal trapianto mantengono la remissione clinica e citogenetica completa (van Rhee et al., 1994; Radich et al., 2001).

Anche il tipo di trapianto (allogeneico, T depleto, da donatore non relato) influenza i rapporti tra presenza di MMR e recidiva. Questo avviene per gli effetti immunologici connessi con la procedura di trapianto, rappresentati soprattutto dall'effetto "Graft versus Leukemia" (GvL) mediato dalle cellule immunocompetenti del donatore. L'effetto GvL fa sì che pazienti sottoposti a trapianto non T depleto da donatore non relato abbiano un rischio di recidiva leucemica molto inferiore rispetto a quello dei pazienti sottoposti a trapianto da donatore consanguineo, mentre l'assenza di GvL fa sì che pazienti sottoposti a trapianto T depleto abbiano un alto rischio di recidiva (Pichert et al., 1995). Perciò, la deplezione in cellule T non solo riduce il rischio di malattia da trapianto verso l'ospite ("Graft versus Host Disease" GvHD) ma anche la possibilità che si verifichi l'effetto GvL del trapianto. L'impiego della QPCR aumenta il valore predittivo della dimostrazione di una MMR nella LMC (Radich et al., 2001). Infatti, la presenza di poche cellule leucemiche dopo il trapianto si associa ad un basso rischio di recidiva (1% circa) mentre il progressivo incremento del trascritto BCR-ABL determina un rischio di recidiva del 75% (Lin et al., 1996). Uno studio che ha analizzato centotrentotto pazienti con LMC dopo un intervallo dal trapianto di 3-5 mesi circa ha

dimostrato che i livelli di trascritto BCR-ABL si correlavano in modo statisticamente significativo con il rischio di recidiva (Olavarria et al, 2001). Pazienti con trascritto non individuabile dalla PCR presentavano un rischio di ripresa della malattia del 9%, mentre pazienti con bassi livelli (<100 copie di BCR-ABL/ $\mu$ g di RNA) e alti livelli (>100 copie di BCR-ABL/ $\mu$ g) di trascritto mostravano un rischio di recidiva del 30% e 74% rispettivamente. In un altro studio novanta dei trecentosettantanove pazienti sottoposti a trapianto allogenico 18 mesi prima erano risultati almeno una volta PCR positivi (Radich et al, 2001). Tredici di questi pazienti (14%) avevano sviluppato una ripresa di malattia, mentre solo tre dei duecentosettantanove pazienti con reazioni di PCR costantemente negative era recidivato dopo il trapianto.

### *MMR nella LAM*

Pochi sono gli studi che hanno analizzato la frequenza ed il significato di una MMR post-trapianto nella LAM. Questa scarsità di dati è soprattutto legata al fatto che le principali traslocazioni cromosomiche [t(8;21), t(15;17), inv(16)] essendo predittive di prognosi favorevole o intermedia identificano pazienti che non sono candidati in prima istanza a trapianto allogenico.

Il significato di una MMR nei pazienti con LAM sottoposti a trapianto dipende soprattutto dal sottotipo genetico di malattia. Mentre la dimostrazione del trascritto PML-RAR $\alpha$  nel post-trapianto di una leucemia acuta promielocitica è quasi sempre predittiva di una possibile recidiva di malattia (Perego et al., 1996), l'identificazione del trascritto AML-ETO, prodotto dalla traslocazione t(8;21), nella LAM M2 non sempre lo è. Infatti, pazienti con trascritto AML-ETO possono continuare ad essere PCR positivi anche a distanza di anni dal trapianto senza sviluppare una ripresa della malattia (Marcucci et al, 1998). I dati a nostra disposizione per la inv(16) sono invece tuttora molto scarsi e non si possono ad oggi trarre delle sicure correlazioni tra presenza del trascritto CBF $\beta$ -MYH e recidiva (Elmaagacli et al, 1998).

Altri geni sono stati utilizzati per identificare una possibile MMR, tra questi bisogna ricordare WT1. Uno studio condotto in trentanove pazienti sottoposti a trapianto ha correlato i livelli di espressione di WT1 nel post-trapianto con il rischio di recidiva (Elmaagacli et al, 2000). Sette dei quattordici pazienti che avevano presentato alti livelli di WT1 almeno una volta dopo il trapianto erano recidivati, mentre solo cinque dei ventiquattro pazienti con bassi livelli di WT1 avevano sviluppato una ripresa della malattia. Questo studio aveva anche sottolineato che nel 70% dei pazienti vi era una buona concordanza tra persistenza dei trascritti prodotti dalle diverse traslocazioni cromosomiche ed alti livelli di espressione di WT1, osservazione però non confermata da altri studi (Gaiger et al., 1998). Altri Autori hanno invece valutato se i livelli di espressione di WT1 prima del trapianto fossero capaci di predire la recidiva post-trapianto. Osborne et al. (2005) ha utilizzato questo approccio per predire il decorso clinico dopo trapianto autologo ed ha osservato che nei pazienti con alti livelli di WT1 la probabilità mediana di rimanere liberi da malattia era di 10.5 mesi, mentre in quelli con bassi livelli di WT1 tale mediana non era stata ancora raggiunta dopo un follow-up media-

no di 94 mesi. L'analisi della MRD nelle LAM è stata utilizzata anche per stabilire se effettuare procedure di "purgino" in vitro della sospensione cellulare midollare da utilizzarsi per un trapianto autologo di CSE (Feller et al., 2005). È stato osservato che se alla citometria a flusso multiparametrica i livelli di MMR sono inferiori allo 0.005% la probabilità di rimanere liberi da malattia a dodici mesi è del 100% (Venditti et al., 2003). Questo studio aveva suddiviso i pazienti in due gruppi, quelli con  $MMR < 3.5 \times 10^{-4}$ , considerati a basso rischio di recidiva, e quelli con  $MMR > 3.5 \times 10^{-4}$ , considerati ad alto rischio di recidiva. La probabilità di recidiva per il primo gruppo di pazienti era stata 26% mentre quella per il secondo gruppo di pazienti era stata 100% e le probabilità mediane di rimanere liberi da malattia dopo il trapianto erano state rispettivamente di quarantotto e sette mesi. Inoltre tre dei cinque pazienti poi ricaduti erano stati sottoposti a valutazioni citofluorimetriche sequenziali della MMR. In questi pazienti era stato osservato un progressivo aumento della MMR, parametro quindi estremamente indicativo di imminente recidiva di malattia.

#### *MMR nella LAL*

I pazienti con LAL candidati al trapianto allogenico sono di solito quelli con malattia ad alto rischio e quelli con malattia non responsiva alla chemioterapia. Siccome il trapianto è ad alto rischio bisognerebbe distinguere i pazienti che sicuramente traggono beneficio dalla procedura da quelli che potrebbero approfittare di altre procedure terapeutiche o da sottoporre ad ulteriori procedure terapeutiche prima del trapianto. In quest'ottica la determinazione di una MMR può fornire indicazioni importanti per la clinica.

L'analisi della MMR prima e dopo il trapianto dà sicure informazioni sul decorso clinico. Molti studi hanno dimostrato che l'entità della MMR prima del condizionamento al trapianto è il parametro che più efficacemente predice la recidiva nel post-trapianto (Bader et al., 2002). Questi studi hanno riportato che la sopravvivenza libera da eventi nei pazienti privi di MMR al momento del trapianto è del 70% circa, mentre quella dei pazienti con MMR al momento del trapianto è del 17-50% circa. Queste informazioni sono state fornite dalla PCR e dalla citometria a flusso e quindi sono basate sull'applicazione di sistemi diversi di valutazione del rischio di ripresa di malattia. Nonostante queste differenze si tratta di dati abbastanza costanti e logici che consentono di suddividere i pazienti in tre categorie: quelli ad alto rischio di recidiva (probabilità di recidiva 70% circa), quelli a rischio intermedio di recidiva (probabilità di recidiva 50% circa) e quelli a basso rischio di recidiva (15% circa) (Chung et al., 2006).

La dimostrazione di una MMR predice la recidiva sia nelle LAL Ph1 positive che in quelle Ph1 negative. In queste ultime vari studi hanno dimostrato che il rischio relativo di recidiva associato alla presenza di una MMR è circa cinque-dieci volte quello associato all'assenza di MMR e che la recidiva avviene pochi mesi dopo la dimostrazione della MMR (Radich et al., 1995). Nelle LAL Ph1 positive la situazione sembra essere un po' più complessa (Radich et al., 1997; Stirewalt et al., 2003)). In questi pazienti la PCR deve valutare sia la presenza del trascritto che codifica per una p210 che del trascritto che codifica per una p190. Tutti gli

studi ad oggi condotti hanno dimostrato che la presenza di MRD nel periodo post-trapianto sempre comporta una ripresa della malattia. Tuttavia molti dati indicano che la presenza del trascritto che codifica per la p190 determina un rischio di recidiva significativamente più alto rispetto a quello determinato dalla presenza del trascritto che codifica per una p210. È stato osservato che i pazienti con PCR positiva per qualsiasi tipo di trascritto presentano un rischio relativo di recidiva 4.4 volte quello dei pazienti PCR negativi (Stirewalt et al., 2003). Tuttavia, per i pazienti p190 positivi il rischio di recidiva era 8.7 volte quello dei pazienti PCR negativi, mentre per quelli p210 positivi era 2.2 volte quello dei pazienti PCR negativi. Bisogna sottolineare che tali differenze determinate dal tipo di trascritto erano già presenti prima del trapianto. Considerando tutti i pazienti, sia quelli p210 positivi che quelli p190 positivi, il tempo mediano che intercorreva tra la prima dimostrazione di una MMR e la franca recidiva leucemica era di 75 giorni, un tempo sufficiente per poter attuare tutte le misure terapeutiche dirette al controllo ed all'eradicazione della popolazione leucemica residua.

La maggior parte degli studi che hanno analizzato la MMR nelle LAL sono stati condotti su sangue midollare e pochi sono gli studi che hanno utilizzato il sangue periferico. Nelle LAL pre-B ed in quelle Ph1 positive i livelli di MMR sono più alti nel sangue midollare che nel sangue periferico e quindi il primo è il materiale cellulare preferito se si deve valutare e monitorare la presenza di una MMR. Tuttavia, l'uso del sangue periferico presenta indubbi vantaggi rispetto al sangue midollare ivi inclusa la possibilità di eseguire monitoraggi più frequenti (van der Velden et al., 2002).

### **Prevenzione della recidiva clinica**

Il monitoraggio della MMR nel post-trapianto di pazienti con malattia ad alto rischio di recidiva permette di attuare procedure terapeutiche dirette al controllo ed alla eliminazione della popolazione neoplastica prima che si verifichi una franca ripresa del disordine onco-ematologico (Shaw et al., 2008). Tali procedure sono la sospensione dell'immuno-soppressione, l'infusione dei leucociti del donatore, la chemioterapia intensiva per l'induzione di una nuova remissione completa e un secondo trapianto.

#### *Procedure per potenziare l'effetto GvL del trapianto*

##### *Sospensione della terapia immuno-soppressiva*

Sebbene la sospensione di tale terapia sia risultata efficace in alcuni pazienti con LMC (Elmaagacli et al., 1997) ed in rari pazienti con LA (Mehta et al., 1997), è molto improbabile che questa opzione terapeutica sia da sola sufficiente a bloccare l'espansione della popolazione leucemica residua dopo il trapianto ed in intensa attività proliferativa. È però possibile che la sospensione della terapia immuno-soppressiva sia una misura terapeutica realmente efficace nei pazienti con ripresa molto precoce di malattia, cioè nei pazienti con popolazione leucemica dimostrabile dalle sole metodiche di QPCR.

### *Infusione dei leucociti del donatore (DLI)*

Si tratta di una procedura terapeutica che ha una ben dimostrata efficacia nei pazienti con vari disordini onco-ematologici in recidiva (specialmente LMC e malattie linfoproliferative) dopo trapianto allogenico (Shaw et al., 2008). Infatti, l'infusione dei leucociti del donatore può consentire di ottenere una nuova RC attraverso un potenziamento dell'effetto GvL. Nei pazienti ad alto rischio di recidiva le DLI dovrebbero essere iniziate ancor prima che si abbia un'evidenza molecolare della ripresa della malattia, di solito a distanza di 1-6 mesi dal trapianto, mentre nei pazienti in recidiva le DLI dovrebbe essere eseguite non appena si ha una reazione di QPCR positiva per il trascritto in esame. In entrambi i casi la terapia immuno-soppressiva dovrebbe essere immediatamente sospesa e le DLI rapidamente iniziate (Kobbe et al., 2004; Schmid et al., 2006). Non appena compare un'iniziale GvHD o quando le cellule infuse raggiungono una dose prefissata, le DLI dovranno essere immediatamente sospese.

Lo scopo delle DLI è quello di ottenere un effetto GvL senza indurre una grave GvHD. Due sono i fattori determinanti per l'efficacia terapeutica delle DLI: la dose di cellule infuse ed il "timing" dell'infusione (Dazzi et al., 2000). Di solito si impiegano sospensioni cellulari contenenti concentrazioni crescenti di cellule T. La dose iniziale di cellule T pari a circa  $10^5$  cellule pro kilo viene progressivamente aumentata e somministrata ad intervalli di 2-3 mesi (Mackinnon et al., 1995). Nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico da donatore da registro si preferisce partire da concentrazioni di cellule T inferiori poiché il rischio di GvHD è più alto.

### *DLI nella LMC in ricaduta dopo il trapianto*

Il ruolo delle DLI nella LMC è ormai ben definito. Vari Autori hanno confermato i risultati raggiunti dal primo studio condotto da Kolb et al (1990). La possibilità di ottenere una nuova RC nei pazienti con LMC in recidiva dopo trapianto allogenico è del 65-86%. Di solito, utilizzando sospensioni a concentrazione crescente di cellule T una nuova RC viene raggiunta dopo l'infusione di due aliquote e dopo un tempo mediano dalla recidiva di circa sei mesi. Alcuni pazienti raggiungono però la remissione citogenetica e molecolare dopo un tempo mediano più lungo (12-24 mesi circa) (Vela-Ojeda et al, 2004). È stato riportato che la risposta alle DLI è maggiore nei pazienti in recidiva citogenetica e molecolare che in quelli in recidiva ematologica e che il primo gruppo di pazienti presenta una più lunga sopravvivenza (Van Rhee et al., 1994). Inoltre, la sopravvivenza dei pazienti che hanno raggiunto una RC dopo l'infusione dei leucociti del donatore è più lunga rispetto a quella dei pazienti che non hanno risposto alle DLI (Dazzi et al., 2000). La nuova RC viene ottenuta a scapito di un'alta incidenza di GvHD che si osserva mediamente nel 50% dei pazienti. In alcuni studi l'incidenza di questa complicanza è stata più alta. Ad esempio, Porter et al. (1999) aveva osservato che l'89% dei pazienti che aveva risposto alle DLI sviluppava una GvHD ad una distanza mediana dall'ultima dose di DLI di circa 70 giorni. Mackinnon et al (1995) ha osservato che vi è una stretta correlazione tra quota di linfociti CD3 positivi infusi e sviluppo di GvHD ed ha fissato a  $\leq 10 \times 10^6/\text{kg}$  la quota di cellule

CD3 positive sufficienti per raggiungere una remissione molecolare con chimerismo linfocitario completo e minima o assente GvHD.

#### *DLI nella LAM in ricaduta dopo il trapianto*

Studi condotti negli anni '90 hanno riportato che dopo le DLI solo il 15-30% dei pazienti con LAM raggiunge la RC e quest'ultima è di solito di breve durata: a tre anni sopravvive solo il 20% dei pazienti. In anni recenti questi risultati sono stati in parte migliorati grazie ad una più corretta stratificazione prognostica dei pazienti ed all'impiego delle DLI solo dopo regimi di chemioterapia intensiva. Un recente studio del "European Blood and Bone Marrow Transplant (EBMT) group Acute Leukemia Working Party" ha dimostrato che i parametri che dopo l'infusione di leucociti del donatore si associano ad una più lunga sopravvivenza sono: sesso femminile, malattia in RC e minima quota di cellule leucemiche al momento dell'infusione (Schmid et al., 2004). Infatti, a tre anni dall'infusione delle DLI sopravvive il 55% dei pazienti che al momento dell'infusione era in RC, ma solo il 25% dei pazienti che al momento dell'infusione non avevano raggiunto la RC. Un altro studio ha riportato una migliore sopravvivenza per i pazienti affetti da LAM che dopo la recidiva avevano ricevuto le DLI. Infatti, a due anni dalla recidiva sopravviveva il 44% dei pazienti che avevano ricevuto le DLI, ma nessun paziente che non aveva ricevuto le DLI (Shaw et al., 2004). Nello studio di Levine et al. (2002) il 47% dei pazienti trattati con chemioterapia al momento della recidiva post-trapianto aveva raggiunto la RC, ma la sopravvivenza a distanza di due anni dall'infusione delle DLI era stata solo del 19% a causa dell'alta mortalità peritrapiantologica. In un altro studio nei pazienti recidivati dopo trapianto l'esecuzione di un protocollo di chemioterapia intensiva prima delle DLI determinava un significativo miglioramento della sopravvivenza (Arellano et al., 2007). Questi due ultimi studi avevano entrambi sottolineato che il fattore più importante per il successo delle DLI era il tempo intercorso dal primo trapianto che doveva essere superiore a 6 mesi nel primo studio ed a 136 giorni nel secondo. Come già riportato per i pazienti con LMC ricaduti dopo il trapianto, anche nella LAM il fattore che si associava al successo delle DLI era lo sviluppo di una GvHD acuta o cronica.

#### *DLI nella LAL ricaduta dopo il trapianto*

L'osservazione iniziale (Slavin et al., 1995) che le DLI potessero avere successo anche nelle LAL in ricaduta dopo trapianto allogenico è stata in parte disattesa (Yazaki et al., 1997; Huff et al., 2006), nonostante sia stata osservata una stretta correlazione tra riduzione del rischio di recidiva e sviluppo di GvHD nei pazienti con LAL (Shaw et al., 2006; Remberger et al., 2002). Una spiegazione di questa discrepanza potrebbe consistere nel fatto che lo schema usualmente impiegato per l'infusione delle DLI ne riduce l'efficacia terapeutica perché i linfociti del donatore sono somministrati al paziente in ricaduta troppo tardi (quando è già avvenuta una franca ripresa della malattia) e non sono quindi capaci di bloccare la proliferazione della popolazione leucemica. Arellano et al. (2007) ha osservato che la GvHD che si sviluppa dopo la somministrazione delle DLI nelle LAL

in ricaduta dopo un primo trapianto determina un significativo allungamento della sopravvivenza. Pertanto, nelle LAL il monitoraggio della MMR dopo trapianto dovrebbe essere il più stringente possibile e la somministrazione delle DLI dovrebbe avvenire il più precocemente possibile.

#### *Strategie dirette ad aumentare l'efficacia ed a ridurre la tossicità delle DLI*

La somministrazione combinata di DLI e nuovi farmaci può aumentare l'efficacia terapeutica delle DLI stesse. È stato osservato che l'associazione delle DLI con azacitidina e delle DLI con imatinib permette di ottenere una maggior percentuale di RC nei pazienti con LAM e LAL Ph1 positiva in ricaduta dopo trapianto. La tossicità delle DLI può essere ridotta grazie a diverse procedure: selettiva deplezione di linfociti T CD8 positivi e blocco del CTLA-4 (un regolatore negativo della cellula T) ad opera di un anticorpo monoclonale umano. È stato inoltre osservato che le DLI collezionate dopo mobilizzazione con fattore di crescita (G-CSF) inducono meno frequentemente una GvHD, pur mantenendo l'effetto GvL (Shaw et al., 2008).

#### Chemioterapia intensiva

I protocolli di chemioterapia di re-induzione della remissione completa (RC) hanno successo nel 40-60% dei pazienti in ricaduta dopo trapianto, specie se la ricaduta è tardiva. Tuttavia, la durata della risposta è breve: solo il 10% dei pazienti sopravvive a due anni (Frassoni et al., 1988; Mortimer et al., 1989). Attualmente, abbiamo a disposizione nuove opzioni terapeutiche: anticorpi monoclonali (Gentuzumab, ecc) ed agenti demetilanti nelle LAM; imatinib, nilotinib e dasatinib nelle LAL Ph1 positive (Shaw et al., 2008). Queste nuove opzioni terapeutiche possono essere utilizzate insieme agli usuali protocolli di chemioterapia intensiva prima di intervenire con altre procedure terapeutiche come l'infusione di leucociti del donatore ed un secondo trapianto.

#### Secondo trapianto

Diversi sono gli studi che hanno analizzato il decorso clinico dopo un secondo trapianto allogenico con condizionamento mieloablativo nei pazienti in ricaduta dopo un primo trapianto allogenico. L'IBMTR ha recentemente analizzato centonovantasette pazienti (centoventicinque LAM e settantadue LAL) ed ha riportato una probabilità di sopravvivenza a due e cinque anni del 41% e 28% rispettivamente ed una mortalità legata alla procedura trapiantologia del 26% e 30% rispettivamente (Eapen et al., 2004). I fattori che avevano un impatto favorevole sul decorso clinico erano età <20 anni e tempo intercorso tra primo trapianto e recidiva >6 mesi. Il rischio di recidiva a cinque anni era del 42% per i pazienti ricaduti precocemente dopo il primo trapianto e non in RC al momento del secondo. Lo sviluppo di GvHD acuta ma non di GvHD cronica dopo il secondo trapianto riduceva in modo statisticamente significativo il tasso di recidiva. In questo studio i risultati raggiunti nella LAM e nella LAL erano perfettamente sovrapposti.

bili: la sopravvivenza a tre anni era del 27% nelle LAM e del 30% nelle LAL. Inoltre, l'uso di un secondo donatore, diverso da quello utilizzato per il primo trapianto, non migliorava il decorso clinico del secondo trapianto.

Anche l'EBMT ha analizzato la risposta ad un secondo trapianto in centosettanta pazienti affetti da LAM in ricaduta dopo un primo trapianto (Bosi et al., 2001). Lo stato della malattia al momento del secondo trapianto era il fattore che più significativamente influenzava la sopravvivenza. Altri fattori che avevano un impatto favorevole sul decorso clinico dopo il secondo trapianto erano: lungo intervallo di tempo tra primo trapianto e recidiva, impiego di TBI per il secondo trapianto e assenza di GvHD acuta dopo il primo trapianto. I parametri associati ad un minor rischio di recidiva dopo il secondo trapianto erano: una lunga remissione dopo il primo trapianto, l'uso di CSE prelevate dal midollo osseo, uno stato di RC al momento del secondo trapianto e lo sviluppo di una GvHD acuta dopo il secondo trapianto.

La "Società Francaise de Greffe de Moelle" ha riportato che i fattori significativamente correlati ad una migliore sopravvivenza erano l'età, un tempo tra primo trapianto e recidiva >1 anno, l'assenza di GvHD acuta, la presenza di GvHD cronica e l'uso di un donatore di sesso femminile (Michallet et al., 2000).

L'IBMTR ha anche analizzato il decorso clinico dei pazienti in ricaduta dopo un primo trapianto a condizionamento non mieloablativo (Eapen et al., 2004). Sono stati analizzati quarantacinque pazienti. L'unica differenza significativa tra trapianto non mieloablativo e mieloablativo era il più alto rischio di ricaduta per i pazienti sottoposti al primo tipo di trapianto. Uno studio condotto dalla "British Society of Blood and Marrow Transplantation" ha analizzato il decorso clinico di venticinque pazienti affetti da LAM e quattordici pazienti affetti da LAL (Shaw et al., 2007). Si trattava di pazienti adulti e pediatrici con donatore familiare HLA identico (ventiquattro pazienti) e HLA "mismatched" (un paziente), con donatore non consanguineo (quattordici pazienti, dei quali tre "mismatched"). La maggioranza dei pazienti avevano ricevuto un condizionamento mieloablativo, il 59% aveva ricevuto sospensioni cellulari deplete di cellule T. Nella maggioranza dei pazienti il condizionamento al secondo trapianto era stato non mieloablativo ed aveva impiegato la fludarabina. Per i pazienti con LAM la sopravvivenza a due anni era 21%, il rischio di recidiva era 48% e la mortalità peri-trapiantologica era 34%, mentre per i pazienti con LAL la sopravvivenza a due anni era 22%, il rischio di recidiva era 52% e la mortalità peri-trapiantologica era 30%. L'unico fattore che si associava ad un miglior decorso clinico dopo il secondo trapianto era costituito dallo sviluppo di una GvHD acuta.

## Bibliografia

1. Chung NG, Buxhofer-Ausch V, Radich JP. The detection and significance of minimal residual disease in acute and chronic leukemia. *Tissue Ant.* 68: 371-385, 2008.
2. Kumar L. Management of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* 12: 1710-1717, 1994.

3. Shaw BE, Russel NH. Treatment options for the management of acute leukemia relapsing following an allogeneic transplant. *Bone Marrow Transpl.* 41: 495-503, 2008.
4. Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95%, and 95% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Gen.* 29: 94-97, 1977.
5. Arthur CK, Apperley JF, Guo AP, et al. Cytogenetic events after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in chronic phase. *Blood.* 71: 1179-1186, 1988.
6. Bernell P, Arvidsson I, Iacobsson B, et al. Fluorescence in situ hybridization in combination with morphology detects minimal residual disease in remission and heralds relapse in acute leukaemia. *Brit J Haematol.* 95: 666-672.
7. Nylund SJ, Ruutu T, Saarinen U, et al. Metaphase in situ hybridization (FISH) in the follow-up of 60 patients with hemopoietic malignancies. *Brit. J Haematol.* 88:778-783, 1994.
8. Seong D, Giral S, Fischer H, et al. Usefulness of detection of minimal residual disease by "hypermetaphase" fluorescent in situ hybridization after allogeneic BMT for chronic myelogenous leukaemia. *Bone Marrow Transpl.* 19: 565-570, 1997.
9. Campana D, Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best OPract Res Clin Haematol.* 15: 1-19, 2002.
10. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491, 1988.
11. Pallisgaard N, Hokland P, Riishoj P, et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukaemia. *Blood.* 22: 574-588, 1998.
12. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suci S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. European Organization for Research and Treatment in Cancer - Childhood Leukemia Cooperative Group. *New Engl J Med.* 339: 591-598, 1998.
13. Radich J, Ladne P, Gooley T. Polymerase chain reaction-based detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia predicts relapse after allogeneic BMT. *Biol Blood Marrow Transpl.* 1: 24-31, 1995.
14. Hughes TP, Morgan GJ, Martiat P, et al. Detection of residual leukaemia after bone marrow transplant for chronic myeloid leukaemia: role of polymerase chain reaction in predicting relapse. *Blood.* 77: 874-878, 1991.
15. Lion T, Henn T, Gaiger A, et al. Early detection of relapse after bone marrow transplantation in patients with chronic myelogenous leukaemia. *Lancet.* 341: 275-276, 1993.
16. Miyamura K, Tahara T, Tanimoto M, et al. Long persistent bcr-abl positive transcript detected by polymerase chain reaction after bone marrow transplant for chronic myelogenous leukaemia without clinical relapse: a study of 64 patients. *Blood.* 81: 1089-1093, 1993.

17. Pichert G, Roy DC, Gonin R, et al. Distinct pattern of minimal residual disease associated with graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia. *J Clin Oncol.* 13: 1704-1713, 1995.
18. Roth MS, Antin JH, Ash R, et al. Prognostic significance of Philadelphia chromosome-positive cells detected by the polymerase chain reaction after allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukaemia. *Blood.* 79: 276-282, 1992.
19. Van Rhee F, Lin F, Cross NC, et al. detection of residual leukaemia more than 10 years after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia. *Bone Marrow Transpl.* 14: 609-612, 1994.
20. Radich JP, Gooley T, Bryant E, et al. The significance of bcr-abl molecular detection in chronic myeloid leukemia patients "late", 18 months or more after transplantation. *Blood.* 98: 1701-1707, 2001.
21. Lin F, van Rhee F, Glodman JM, et al. Kinetics of increasing BCR-ABL transcript numbers in chronic myeloid leukemia patients who relapse after bone marrow transplantation. *Blood.* 87: 4473-4478, 1996.
22. Olavarria E, Kanfer E, Szydlo R, et al. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Blood.* 97: 1560-1565, 2001.
23. Perego RA, Marengo P, Bianchi C, et al. PML-RAR alpha transcripts monitored by polymerase chain reaction in acute promyelocytic leucemia during complete remission, relapse and after allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk.* 10: 207-212, 1996.
24. Marcucci G, Livak KJ, Bi W, et al. Deyection of minimal residual disease in patients with AML-ETO-associated acute myeloid leucemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Leuk.* 12: 1482-1489, 1998.
25. Elmaagacli AH, Beelen DW, Kroll M, et al. Detection of CBFbeta/MYH11 fusion transcripts in patients with inv(16) acute myeloid leukaemia after allogeneic bone marrow or peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 21: 159-166, 1998.
26. Elmaagacli AH, Beelen DW, Trensche R, et al. The detection of wt-1 transcripts is not associated with an increased leukemic relapse rate in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 25: 91-96, 2000.
27. Gaiger A, Schmid D, Heinze G, et al. Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leuk.* 12: 1886-1894, 1998.
28. Osborne D, Frost L, Tobal K, et al. Elevated levels of WT1 transcripts in bone marrow harvests are associated with a high relapse risk in patients autografted for acute myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transpl.* 36: 67-70, 2005.
29. Feller N, Jansen-van der Weide MC, van der Pol MA, et al. Purging of

- peripheral blood stem cell transplant in AML. A predictive model based on minimal residual disease burden. *Exp Hematol.* 33: 120-130, 2005.
30. Venditti A, Maurillo L, Buccisano F, et al. Pretransplant minimal residual disease level predicts clinical outcome in patients with acute myeloid leucemia receiving high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Leuk.* 17: 2178-2182, 2003.
  31. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor of postremission outcome in children with ALL. *Leuk.* 16: 1668-1672, 2002.
  32. Radich J, Gehly G, Lee A, et al. Detection of BCR-ABL transcripts in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia after marrow transplantation. *Blood.* 89: 2602-2609, 1997.
  33. Stirewalt DL, Gunthrie KA, Beppu L, et al. Predictors of relapse and overall survival in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia after transplantation. *Biol. Blood Marrow Transpl.* 9: 206-212, 2003.
  34. Van der Velden VH, Jacobs DC, Wijkhuijs AJ, et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukaemia (ALL, but not in precursor-B-ALL. *Leuk.* 16: 1432-1436, 2002.
  35. Elmaagacli AH, Beelen DW, Schaefer UW. A retrospective single center study of the outcome of five different therapy approaches in 48 patients with relapse of chronic myelogenous leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 20: 1045-1055, 1997.
  36. Mehta J, Powles R, Kulkarni S, et al. Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy of leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation: single center experience of 32 adult patients. *Bone Marrow Transpl.* 20: 129-135, 1997.
  37. Kobbe G, Fenk R, Neumann F, et al. Transplantation of allogeneic CD34+ -selected cells followed by early T-cell add-backs: favorable results in acute and chronic myeloid leukemia. *Cytotherapy.* 6: 533-542, 2004.
  38. Schmid C, Schhleuning M, Schwerdtfeger R, et al. Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 108: 1092-1099, 2006.
  39. Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, et al. Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukaemia. *Blood.* 95: 67-71, 2000.
  40. Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, et al. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukaemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood.* 86: 1261-1268, 1995.
  41. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood.* 76: 2462-2465, 1990.

42. Vela-Ojeda J, Garcia-Ruiz Esparza MA, Reyes-Maldonado E, et al. Donor lymphocytes infusions for relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation: prognostic significance of the dose of CD3+ and CD4+ lymphocytes. *Ann Hematol.* 83: 295-301, 2004.
43. Porter DL, Collins Jr. RH, Shpilberg O. Long-term follow-up of patients who achieved complete remission after donor leukocyte infusions. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 5: 253-261, 1999.
44. Schmid C, Labopin M, Finke J, et al. Retrospective comparison of using or not using donor lymphocyte transfusion in the treatment of hematological relapse after allogeneic stem cell transplantation in 489 adults with acute myeloid leukemia (abstract). *Blood.* 104: 298, 2004.
45. Shaw BE. Understanding the immunogenetic and clinical factors which influence the outcome of hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. University of London. 2004.
46. Levine JE, Braun T, Penza SL, et al. Prospective trial of chemotherapy and donor leukocyte infusions for relapse of advanced myeloid malignancies after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 20: 405-412, 2002.
47. Arellano ML, Langston A, Winton E, et al. Treatment of relapsed acute leucemia after allogeneic transplantation: a single center experience. *Biol Blood Marrow Transplant.* 13: 116-123, 2007.
48. Slavin S, Nasparstek E, Nagler A, et al. Allogeneic cell therapy for relapsed leukemia after bone marrow transplantation with donor peripheral blood lymphocytes. *Exp Hematol.* 23: 1553-1562, 1995.
49. Yazaki M, Andoh M, Ito T, et al. Successful prevention of haematological relapse for a patient with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation by donor leukocyte infusion. *Bone Marrow Transpl.* 19: 393-394, 1997.
50. Huff CA, Fuchs EJ, Smith BD, et al. Graft-versus-host reactions and the effectiveness of donor lymphocyte infusions. *Biol. Blood Marrow transplant.* 12: 414-421, 2006.
51. Shaw BE, Marsh SG, Mayor NP, et al. HLA-DPB1 matching status has significant implications for recipients of unrelated donor stem cell transplants. *Blood.* 107: 1220-1226, 2006.
52. Remberger M, Mattsson J, Hentschke P, et al. The graft-versus-leukemia effect in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Bone Marrow Transpl.* 30: 761-768, 2002.
53. Frassoni F, Barrett AJ, Granena A, et al. Relapse after allogeneic bone marrow transplantation for acute leucemia: a survey by the EBMT of 117 cases. *Brit J Haematol.* 70: 317-320, 1988.
54. Mortimer J, Blinder MA, Schulman S, et al. Relapse of acute leukemia after marrow transplantation: natural history and results of subsequent therapy. *J Clin Oncol.* 7: 50-57, 1989.
55. Eapen M, Giral SA, Horowitz MM, et al. Second transplant for acute and chronic leukaemia relapsing after first HLA-identical sibling transplant. *Bone Marrow Transpl.* 34: 721-727, 2004.

56. Bosi A, Laszlo D, Labopin M, et al. Second allogeneic transplantation in acute leucemia: results of a survey by the European Cooperative Group for Blood and Bone Marrow Transplantation. *J Clin Oncol.* 19: 3675-3684, 2001.
57. Michallet M, Tanguy ML, Socie G, et al. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in relapsed acute and chronic leukemias for patients who underwent a first allogeneic bone marrow transplantation: a survey of the Societe Francaise de Greffe de Moelle (SFGM). *Brit J Haematol.* 108: 400-407, 2000.
58. Shaw BE, Mufti GJ, Mackinnon S, et al. Outcome of second allogeneic transplants using reduced intensity conditioning following relapse after an initial allogeneic transplant (abstract). *Bone Marrow Transpl.* 39 (Suppl. 1): S16, 2007.

## Priming dei linfociti del donatore come vaccinoterapia per il ricevente

Rita Maccario

Divisione di Oncoematologia Pediatrica, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (allo-TCSE) è associato, durante la fase di ricostituzione del sistema emopoietico ed immunologico post trapianto, ad uno stato di profonda immunodeficienza che può favorire l'insorgenza di gravi infezioni opportunistiche, soprattutto infezioni virali o fungine, e sfavorire l'instaurarsi dei meccanismi di immunosorveglianza antitumore, con conseguente aumentato rischio di ricaduta della malattia neoplastica. I linfociti T, B e *natural killer* (NK), d'origine del donatore, proliferano e si differenziano nel ricevente di allo-TCSE mediante due differenti percorsi, l'espansione periferica dei linfociti maturi trasferiti con l'espianto e la differenziazione di un nuovo sistema immunitario che deve percorrere tutte le tappe ontogenetiche necessarie alla differenziazione delle CSE in cellule effettrici della risposta immunitaria. Il processo di differenziazione di un nuovo sistema immunitario derivato dalle CSE del donatore è un processo più lento dell'espansione periferica dei linfociti maturi, è timo-dipendente per quanto riguarda i linfociti T, è capace di rigenerare un repertorio completo delle funzioni linfocitarie ed è responsabile della ricostituzione immunologica a lungo-termine dei pazienti sottoposti ad allo-TCSE. Il processo d'espansione periferica s'innesca nelle prime settimane dopo il trapianto, è responsabile della ricostituzione immunologica precoce e coinvolge, fra gli altri, i linfociti "alloreattivi", contenuti nell'espianto del donatore, che esprimono recettori capaci di riconoscere le cellule del ricevente poiché estranee (*non-self*). L'espansione periferica di linfociti T alloreattivi è responsabile dell'insorgenza e gravità della malattia del trapianto verso l'ospite (*graft-versus-host disease*, GVHD), patologia che deve essere controllata con terapie immunosoppressive, nel caso di allo-TCSE non manipolato da donatore HLA-compatibile o da procedure di T- e B-deplezione dell'espianto, nel caso di allo-TCSE da donatore parzialmente HLA-compatibile. La cinetica di ricostituzione e piena ripresa funzionale del sistema immunitario degli individui trapiantati è diversa per ogni tipologia di trapianto ed è tanto più rapida quanto maggiore è la compatibilità HLA tra donatore e ricevente di allo-TCSE ed è, quindi, particolarmente lenta nei pazienti sottoposti ad allo-TCSE con CSE purificate (CD34+) da donatore parzialmente HLA-compatibile, poiché i riceventi questo tipo di trapianto non

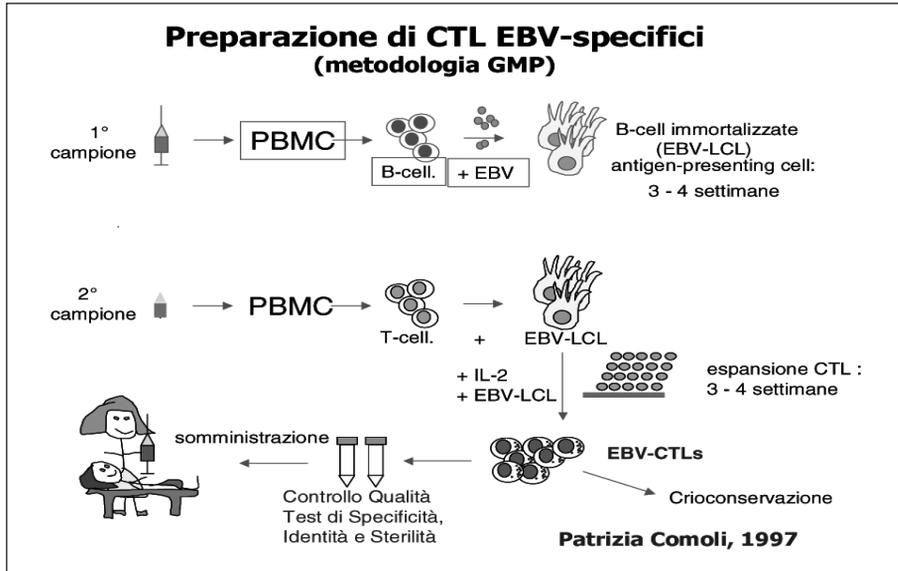
possono giovare del trasferimento da donatore a ricevente delle cellule immuno-competenti che, nel trapianto convenzionale non manipolato da donatore HLA-compatibile, sono infuse al paziente ricevente insieme alle CSE.

Nel corso degli ultimi vent'anni l'immunoterapia cellulare adottiva, finalizzata al ripristino dello stato d'immunocompetenza, è stata identificata come uno delle più efficaci strategie terapeutiche atte a prevenire e/o curare le gravi infezioni da patogeni opportunisti e la recidiva neoplastica nei pazienti sottoposti ad allo-TCSE. In particolare, è stato ipotizzato che, nel caso di individui sottoposti ad allo-TCSE per la cura di patologia neoplastica, la terapia cellulare adottiva con linfociti dotati di attività antitumorale, oltre a contribuire alla ricostituzione dell'immunocompetenza derivata dal sistema immunitario del donatore, giochi un importante ruolo nel potenziare lo sviluppo dell'effetto *graft-versus-tumor* (GVT) del trapianto stesso.

### **Approcci metodologici per la preparazione di prodotti medicinali per terapia cellulare adottiva**

Il primo approccio d'immunoterapia cellulare adottiva in pazienti sottoposti ad allo-TCSE è stato sviluppato agli inizi degli anni '90 dal gruppo di Seattle, guidato da Riddell e Greenberg, allo scopo di prevenire le gravi patologie correlate all'infezione post-trapianto da citomegalovirus (HCMV), soprattutto la polmonite interstiziale. L'approccio del gruppo di Seattle consisteva nella preparazione ed infusione, prima del manifestarsi della patologia, di cloni linfocitari T citotossici (CTL) CD8+ HCMV-specifici, di origine del donatore di allo-TCSE e ottenuti utilizzando come *priming* le cellule (fibroblasti) del donatore stesso infettate con HCMV, per i pazienti incapaci di ricostituire precocemente, dopo il trapianto, la risposta immunologica virus-specifica. Per quanto i risultati ottenuti siano stati molto incoraggianti, solo recentemente altri gruppi hanno confermato l'utilità dell'approccio, sviluppando tecniche alternative di clonaggio, espansione ed infusione di linfociti T CD4+ HCMV-specifici o di linee policlonali comprendenti sia linfociti T CD4+ sia linfociti T CD8+.

I risultati più entusiasmanti in termini di prevenzione ed effetto terapeutico sono stati ottenuti con l'immunoterapia cellulare adottiva delle patologie correlate all'infezione da virus di Epstein-Barr (EBV). Una pietra miliare in questo specifico settore è rappresentata dagli studi del gruppo guidato da Rooney e Brenner (Huston, USA), iniziati a metà degli anni '90 che hanno dimostrato l'efficacia a lungo termine della terapia cellulare adottiva con linee policlonali di CTL EBV-specifici di origine del donatore di allo-TCSE, sia per la prevenzione sia per la terapia della malattia linfoproliferativa post-trapianto (PTLD) EBV-correlata. Questi primi studi sono stati, in seguito, confermati da altri gruppi (Figura 1) e l'esperienza maturata in ambito di allo-TCSE è stata estesa, al trattamento della PTLN EBV-correlata in pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido e alla terapia d'altre neoplasie EBV correlate, ad esempio il carcinoma naso-faringeo, resistente alle terapie convenzionali. Recentemente il Gruppo di Huston ha dimostrato la fattibilità di un approccio di immunoterapia cellulare adottiva con



**Fig. 1** - Schema riassuntivo delle procedure necessarie per la preparazione di linee di linfociti T citotossici (CTL) specifici per il virus di Epstein-Barr (EBV) (Comoli, Pavia 1997).

CTL “*trivirus*”-specifici. La metodologia per la preparazione dei CTL “*trivirus*”-specifici si basa sull’utilizzo, nella fase di *priming* dei CTL, di linee linfoblastoidi B infettate con EBV (EBV-LCL) e trasdotte con il vettore chimerico *adenovirus/CMV-pp65*. I CTL preparati con questa metodologia sono in grado di sviluppare funzionalità immunologica nei confronti di EBV, HCMV e adenovirus (AdV). Approcci alternativi all’utilizzo delle cellule infettate con il virus nella fase di *priming* dei linfociti T del donatore consistono nell’utilizzo di proteine o lisati del patogeno, di patogeno inattivato o di peptidi o miscele di peptidi immunogenici derivati da proteine associate al patogeno in questione (Tab. 1).

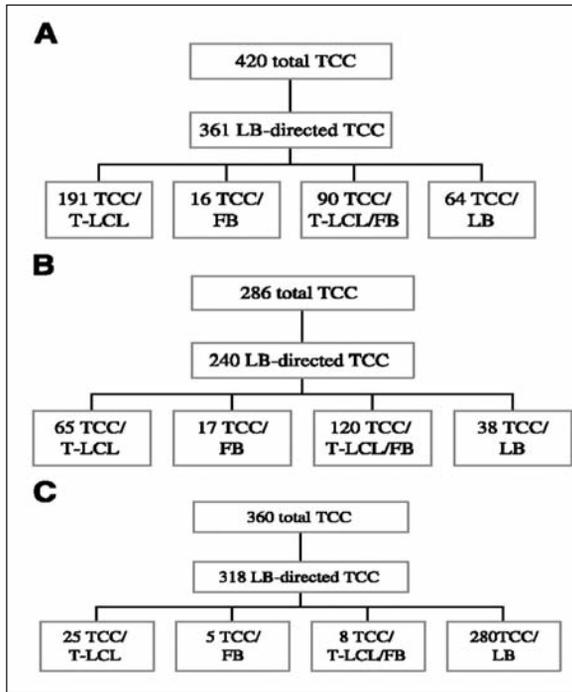
Quest’ultimo approccio metodologico è stato utilizzato con successo, ad esempio, per la preparazione di cloni linfocitari T specifici per AdV, l’utilizzo della miscela di peptidi, anziché del singolo peptide immunogenico permette di preparare linfociti patogeno-specifici la cui funzione immunologica non è ristretta da un singolo aptotipo HLA. Il fondamento logico dell’uso, per i pazienti sottoposti ad allo-TCSE, di protocolli d’immunoterapia cellulare adottiva con linfociti T capaci di aggredire selettivamente le cellule tumorali, risparmiando quelle sane, poggia sulla dimostrazione dell’efficacia, in assenza d’effetti collaterali rilevanti, della terapia cellulare adottiva, virus-specifica, soprattutto nella prevenzione e cura di PTLD EBV-correlate. In entrambi i casi, le cellule potenzialmente utilizzabili per generare ed espandere linee linfocitarie T policlonali, o derivate da singoli cloni linfocitari T (Fig. 2), sono d’origine del donatore di allo-TCSE e derivano, quindi, da un individuo immunocompetente in grado di sviluppare un repertorio immunologico completo ed efficiente. Nel caso di terapia cellulare adottiva antivirale, esperienze cliniche hanno dimostrato come le cellule

**Tab. 1** - Principali approcci metodologici utilizzati per la preparazione di prodotti medicinali per terapia cellulare (PMTc) adottiva.

Tipologia del PMTC	Tipologia dell'Antigene Utilizzato per il Priming	Ambito di Applicazione in Clinica
Linfociti T EBV-specifici	EBV-LCL	PTLD, tumori EBV-correlati
Linfociti T HCMV-specifici	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FB infettati con HCMV</li> <li>• Proteine virali</li> <li>• Peptidi virali</li> </ul>	Prevenzione e/o terapia delle infezioni/riattivazioni dopo allo-TCSE, resistenti ai trattamenti antivirali convenzionali
Linfociti T AdV-specifici	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antigeni virali</li> <li>• Peptidi virali</li> </ul>	Prevenzione e/o terapia delle infezioni invasive dopo allo-TCSE, resistenti ai trattamenti antivirali convenzionali
Linfociti T <i>Trivirus</i> -specifici	EBV-LCL trasdotte per <i>AdV</i> e <i>HCMV-pp65</i>	Prevenzione e/o terapia delle infezioni/riattivazioni di EBV, HCMV, AdV dopo allo-TCSE, resistenti ai trattamenti antivirali convenzionali
Linfociti T Aspergillo-specifici	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conidi di <i>Aspergillo fumigatus</i></li> <li>• Estratti cellulari</li> </ul>	Terapia delle infezioni invasive da <i>Aspergillo</i> dopo allo-TCSE, resistenti ai trattamenti antifungini convenzionali
Linfociti T antitumore	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cellule tumorali apoptotiche</li> <li>• Peptidi di mHAg</li> <li>• Antigeni tumore-specifici</li> <li>• Antigeni tumore-associati</li> <li>• Lisati della cellula tumorale</li> </ul>	Prevenzione e/o terapia della recidiva neoplastica dopo allo-TCSE, potenziamento dell'effetto GVL

EBV = Epstein-Barr virus; EBV-LCL = linea linfoblastoide B infettata con EBV; PTLd = *post transplant lymphoproliferative disease*; FB = fibroblasti; HCMV = citomegalovirus umano; allo-TCSE = trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche; AdV = adenovirus; mHAg = *minor histocompatibility antigen*; GVL = *graft-versus-leukemia*.

somministrate abbiano la possibilità d'incontrare numerosi antigeni virali immunodominati, capaci di stimolare una considerevole espansione numerica dei linfociti T virus-specifici e di favorire lo sviluppo di memoria immunologica, utile al controllo delle eventuali successive riattivazioni del virus stesso. Nel caso di terapia cellulare adottiva antitumorale, la possibilità di successo è ostacolata dall'evidenza dei numerosi potenziali meccanismi con cui la cellula tumorale potrebbe, anziché attivare, bloccare la risposta immunitaria antineoplastica trasferita (*immune escape*). Il vantaggio della terapia cellulare adottiva con linfociti dotati di selettiva attività anti-tumore, rispetto ad altre strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di cellule immunocompetenti del donatore, quali la DLI (*delayed lymphocyte infusion*) potrebbe tuttavia derivare, oltre che da un rischio ridotto di sviluppo di GVHD grave, anche dal fatto che la risposta antitumorale può essere stimolata *ex-vivo*, evitando così la parte di meccanismi d'*immune escape* che agiscono *in vivo* inibendo la fase d'induzione ed espansione dei linfociti T antitumore. La prima scelta strategica, utile per impostare un programma di terapia cellulare adottiva antitumore riguarda il tipo d'antigene utilizzato, nella fase di *priming*, per la generazione *in vitro* sia di CTL sia di altre sottopopolazioni linfocitarie T, necessarie per l'espansione a lungo termine dei CTL. Svitati approcci metodologici sono in corso di analisi, per esplorarne la potenzialità d'indurre *in vitro* una risposta immunitaria antitumore a lungo termine:



**Fig. 2** - Schema riassuntivo delle procedure necessarie per la selezione di cloni linfocitari T (TCC) antileucemia. A-C: risultati ottenuti da "single cell cloning" di n. 3 linee linfocitarie T policlonali antileucemia. A-B: TCC ottenuti da donatore familiare parzialmente HLA-compatibile; C: TCC ottenuti da donatore familiare HLA-identico. LB, blasto leucemico; T-LCL, linea linfoblastoide T; FB, fibroblasto. TCC/T-LCL, TCC/FB, TCC/T-LCL/FB = TCC con capacità litica sia contro LB sia contro cellule non-maligne del paziente (T-LCL e/o FB); TCC/LB = TCC con selettiva capacità litica contro LB. (Montagna et al Cancer Res. 2006; 66:7310).

- 1) antigeni tumore-specifici non-polimorfici,
- 2) antigeni minori d'istocompatibilità polimorfici (mHAg),
- 3) antigeni non-polimorfici di differenziazione cellulare iperespressi sulle cellule tumorali,
- 4) lisato della cellula tumorale,
- 5) cellule tumorali rese apoptotiche mediante irradiazione (Tab. 1).

Nel 1999 Falkenburg et al. (Leiden, NL) hanno descritto la prima esperienza di terapia cellulare adottiva antileucemia in un paziente con leucemia mieloide cronica, in fase accelerata di malattia dopo trapianto e resistente a DLI. I CTL antileucemia, d'origine del donatore di allo-TCSE, erano stati preparati utilizzando la cellula tumorale apoptotica nella fase di *priming*. Lo studio ha dimostrato la possibilità di ottenere, mediante l'infusione di un ragguardevole numero di cellule coltivate *in vitro*, uno stato di remissione ematologia completa dopo infusione di linee policlonali di CTL antileucemia, derivate dal sangue periferico del donatore mediante stimolazione *in vitro* con blasti leucemici apoptotici del paziente e interleuchina-2 (IL-2). Questo risultato ha rappresentato una pietra miliare per la sperimentazione di un simile approccio di terapia cellulare adottiva, anche per pazienti affetti da leucemia acuta. Studi successivi si sono, perciò, focalizzati sull'ottimizzazione di metodologie che consentissero di espandere efficientemente *in vitro*, in condizioni GMP (*good manufacturing practice*), CTL capaci di mantenere attività antitumore anche dopo parecchi cicli di ristimolazione, utilizzando nella fase di *priming* la cellula tumorale apoptotica quale

fonte di antigeni tumore-associati. In particolare un interessante protocollo metodologico, ottimizzato e descritto da Montagna e coll (Pavia), utilizza:

- 1) cellule dendritiche - le *antigen presenting cells* professioniste - d'origine del donatore,
- 2) cellule tumorali del paziente rese apoptotiche mediante irradiazione, quale fonte d'antigeni tumorali,
- 3) popolazioni arricchite in linfociti CD8+ d'origine del donatore quali cellule effettrici dell'attività citotossica antitumore,
- 4) aggiunta, ad opportuni tempi di coltura, di cellule *feeder* irradiate (cellule mononucleate del donatore) e miscele di citochine (IL-7, IL-12, IL-2, IL-15) importanti per l'induzione ed espansione a lungo-termine di varie sottopopolazioni di CTL *memory* ed effettori.

Un ulteriore approfondimento nel processo di ottimizzazione di questo approccio metodologico ha consentito di dimostrare che, mediante l'utilizzo di opportune tecniche di clonaggio e propagazione di linee linfocitarie T, derivate da una singola cellula, è possibile separare *in vitro* i linfociti T capaci di aggredire selettivamente la cellula neoplastica (effetto GVL) da quelli potenzialmente in grado di indurre la GVHD (Fig. 2). I risultati ottenuti *in vitro*, hanno dimostrato come la strategia metodologica d'utilizzo di cellule tumorali apoptotiche, presentate da cellule dendritiche del donatore di allo-TCSE indipendentemente dal suo aplotipo HLA, non richieda la definizione di uno specifico antigene tumorale e consenta di generare, dalle cellule mononucleate del donatore stesso, CTL antitumore policlonali capaci di espandersi per parecchi cicli replicativi senza perdere le caratteristiche intrinseche di specificità e funzionalità.

L'uso della cellula tumorale apoptotica quale fonte di antigeni tumorali, presentati presumibilmente con un meccanismo di *cross-priming* dalle cellule dendritiche, non permette, d'altro canto, di definire la natura degli antigeni riconosciuti dai CTL antitumore che potrebbero comprendere proteine tumore-specifiche, mHAg e antigeni non-polimorfici di differenziazione cellulare iperespressi sulle cellule tumorali. La policlonalità della risposta evocata rappresenta, tuttavia, un vantaggio considerevole in termini di potenziale efficacia dei CTL antitumore *in vivo* poiché diminuisce la possibilità che la risposta T citotossica possa essere bloccata da meccanismi d'*immune escape*.

## Bibliografia

1. Comoli P, Labirio M, Basso S, Baldanti F, Grossi P, Furione M, Viganò M, Focchi R, Rossi G, Ginevri F, Gridelli B, Moretta A, Montagna D, Locatelli F, Gerna G, Maccario R. Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood*. 2002; 99: 2592-2598.
2. Comoli P, Pedrazzoli P, Maccario R, Basso S, Carminati O, Labirio M, Schiavo R, Secondino S, Frasson C, Perotti C, Moroni M, Locatelli F, Siena S. Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous

- Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 8942-8949.
3. Comoli P, Basso S, Zecca M, Pagliara D, Baldanti F, Bernardo ME, Barberi W, Moretta A, Labirio M, Paulli M, Furione M, Maccario R, Locatelli F. Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation. *Am J Transplant.* 2007; 7: 1648-1655.
  4. Comoli P, Schilham MW, Basso S, van Vreeswijk T, Bernardo ME, Maccario R, van Tol MJ, Locatelli F, Veltrop-Duits LA. T-cell lines specific for peptides of adenovirus hexon protein and devoid of alloreactivity against recipient cells can be obtained from HLA-haploidentical donors. *J Immunother.* 2008; 31: 529-536.
  5. Daudt L, Maccario R, Locatelli F, Turin I, Silla L, Montini E, Percivalle E, Giugliani R, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D. Interleukin-15 favors the expansion of central memory CD8+ T cells in ex vivo generated, antileukemia human cytotoxic T lymphocyte lines. *J Immunother.* 2008; 31: 385-393.
  6. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, Smit WM, van Bergen CA, Bongaerts R, Lurvink E, van der Hoorn M, Kluck P, Landegent JE, Kluin-Nelemans HC, Fibbe WE, Willemze R. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood.* 1999; 94: 1201-1208.
  7. Fujita Y, Rooney CM, Heslop HE. Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41: 193-198.
  8. Kennedy-Nasser AA, Brenner MK. T-cell therapy after hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2007; 14: 616-624.
  9. Montagna D, Daudt L, Locatelli F, Montini E, Turin I, Lisini D, Giorgiani G, Bernardo ME, Maccario R. Single-cell cloning of human, donor-derived antileukemia T-cell lines for in vitro separation of graft-versus-leukemia effect from graft-versus-host reaction. *Cancer Res.* 2006; 66: 7310-7316
  10. Montagna D, Maccario R, Locatelli F. Expansion of antileukaemia CTL lines and clones for adoptive cell therapy in paediatric patients given allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet.* 2008; 35: 389-393.
  11. Perruccio K, Tosti A, Burchielli E, Topini F, Ruggeri L, Carotti A, Capanni M, Urbani E, Mancusi A, Aversa F, Martelli MF, Romani L, Velardi A. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood.* 2005; 106: 4397-406.
  12. Riddell SR, Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral disease. *Annu Rev Immunol.* 1995; 13: 545-586.
  13. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8: 299-308.
  14. Turin I, Pedrazzoli P, Tullio C, Montini E, La Grotteria MC, Schiavo R, Perotti C, Locatelli F, Carretto E, Maccario R, Siena S, Montagna D. GMP production of anti-tumor cytotoxic T-cell lines for adoptive T-cell therapy in patients with solid neoplasia. *Cytotherapy.* 2007; 9: 499-507.

## Terapia cellulare per le malattie autoimmuni

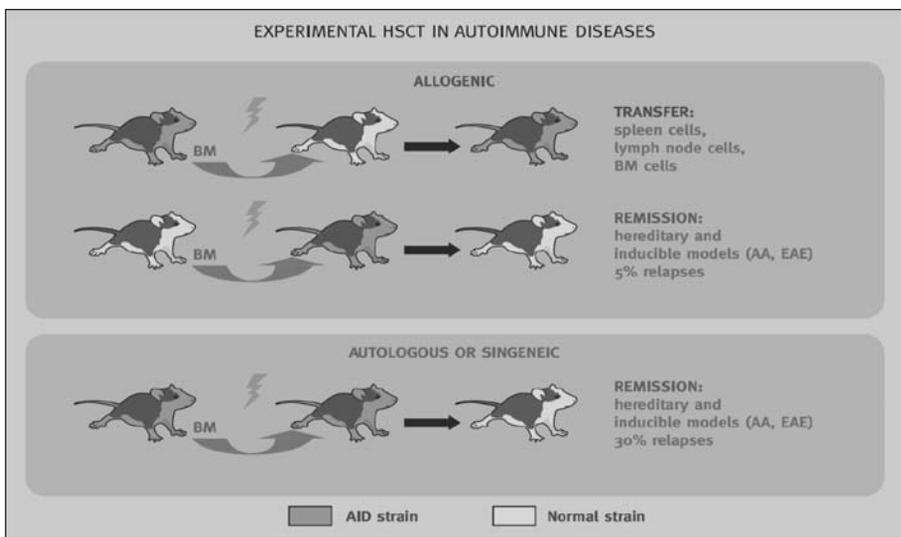
*Riccardo Saccardi, M. Di Gioia, P. Maggi*

BMT Unit, Dipartimento di Ematologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

Le malattie autoimmuni sono un gruppo di condizioni patologiche, accomunate da una alterata reattività del sistema immunitario nei confronti di antigeni self. Il decorso clinico è generalmente di tipo cronico, con estrema variabilità in termini di organi interessati e tempo di evoluzione.

La maggior parte dei pazienti presenta un quadro relativamente benigno con una buona risposta ai trattamenti convenzionali che sono, in linea di massima, improntati all'immunosoppressione.

Alcuni pazienti presentano un quadro più aggressivo scarsamente controllato da successive linee di terapia. È da ricordare come al danno d'organo proprio della malattia si associa non infrequentemente quello derivato dagli effetti collaterali della terapia immunosoppressiva somministrata cronicamente.



**Fig. 1** - Modelli sperimentali di trapianto (Allogeneico ed Autologo/Singeneico).

Pazienti	1031	
Maschio/Femmina %	37/63	
Centri/Paesi	188/27	
Procedure Trapiantologiche	1054	
	<b>Autologhi n=987</b>	<b>Allogenici n=67</b>
Primo	977	49
Secondo	10	14
Terzo		4
Età al Trapianto (anni)	36 (2.7 – 76)	13 (0.4 – 57)

**Tab. 1** - European Group for Bone and Marrow Transplantation: numero totali di trapianti effettuati nel trattamento delle malattie autoimmuni divisi per numero e tipologia di trapianto (dati da registro, aggiornati a Dicembre 2008). Dati forniti con gentile concessione dell'EBMT.

L'impiego del trapianto di cellule staminali ematopoietiche (CSE) nelle malattie autoimmuni origina dall'osservazione della sua capacità di indurre remissioni nella modellistica sperimentale (1, 2). In particolare il trapianto allogenico è in grado di trasmettere la malattia da un animale malato ad uno sano (3, 4) e di indurre una remissione nel viceversa (5-7). Sorprendentemente nel modello di forme indotte anche il trapianto autologo si è mostrato in grado di indurre una remissione clinica, seppure con una frequenza inferiore all'allogenico (8) (Fig. 1). Nel frattempo l'osservazione clinica di risposte maggiori in pazienti sottoposti a trapianto di CSE per una malattia oncologica e contemporanea malattia autoimmune, gettava le basi per ipotizzare l'impiego di questa procedura nel trattamento delle forme severe che progredivano dopo aver fallito le terapie convenzionali (9-11). Le prime esperienze risalgono alla metà degli anni novanta (12-

<b>SCLEROSI MULTIPLA</b>	<b>379</b>	<b>EMATOLOGICHE</b>	<b>77</b>
		ITP	23
		Evan's	16
		AIHA	16
		Pure Red Cell	8
		Pure White Cell	3
		Altri	11
		<b>VASCULITI</b>	<b>35</b>
		Wegener's	8
		Behcet's	8
		Takayasu	2
		Microscopica poly. nodosa	3
		Classica poly. nodosa	1
		Churg-Strauss	2
		Altri/Non Conosciuto	11
		<b>NEUROLOGICHE (Altre)</b>	<b>23</b>
		Myasthenia Grave	3
		Altri/Non Conosciuto	20
		<b>Altri/Non Conosciuto/Mancante</b>	<b>17</b>
<b>CONNATIVITI</b>	<b>334</b>		
SSc	209		
SLE	92		
PM-DM	15		
Sjogren	3		
Altri/Non Conosciuto	15		
<b>ARTRITI</b>	<b>164</b>		
Artrite Reumatoide	88		
Artrite Giovanile :			
- JIA Sistemica	42		
- Altre JIA	18		
- Polyarticular JIA	10		
Artrite Psoriasica	3		
Other	3		
<b>MALATTIE INTESTINALI</b>	<b>26</b>		
Malattia di Crohn	23		
Colite Ulcerativa	3		

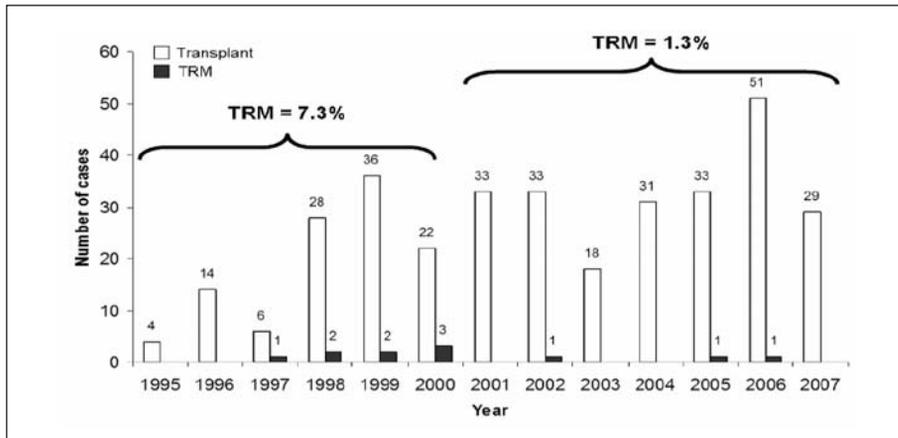
**Tab. 2** - European Group for Bone and Marrow Transplantation: numero totali di trapianti effettuati nel trattamento delle malattie autoimmuni divisi per diagnosi (dati da registro, aggiornati a Dicembre 2008). Dati forniti con gentile concessione dell'EBMT.

14). Si può affermare che nei dieci anni successivi la procedura si è affermata in diversi settori specialistici, ed in particolare in ambito neurologico e reumatologico. Nella tabella 1 si riporta l'esperienza dell'EBMT al dicembre 2008; la distribuzione per sesso riflette la predisposizione per il sesso femminile tipica di queste forme. Il forte sbilanciamento verso l'autologo è giustificato dal minore rischio trapiantologico associato. Nella tabella 2 è riportata la distribuzione per diagnosi; la sclerosi multipla (MS) è la forma più frequentemente sottoposta a trapianto, seguita dalla sclerosi sistemica (SSc), malattia che, nella sua forma diffusa con interessamento viscerale, non ha ad oggi trattamenti efficaci.

Per tutte le forme l'indicazione al trapianto segue alcuni principi generali espressi già alla fine degli anni 90 (15). I pazienti devono aver fallito una o più linee di

**Tab. 3** - Studi Prospettici di HSCT nella Sclerosi Multipla. Riprodotto per gentile concessione da Mancardi G, Saccardi R. *Lancet Neurol.* 2008 Jul; 7(7): 626-36. Review (18).

	Patients (n)	EDSS score	Mobilization	Ex-vivo T-cell depletion	Conditioning regimen	In-vivo T-cell depletion	Clinical outcome Follow-up (years)	PFS	Comments
Fassas et al. (12, 13)	25	4,5-8	CY and G-CSF	In 10 patients	BEAM	Yes	3-7	76%	After 10 years PFS is 47%
Fassas and Kimiskidis (22)	10	4,5-8	CY and G-CSF	No	Busulfan	Yes	3	50%	After 6 years PFS remains at around 50%
Kozak et al. (23, 24)	33	5-8,5	CY and G-CSF	In 20 patients	BEAM	In 13 patients	5	70%	
Mancardi et al. (25) Saccardi et al. (26, 27)	21	5-6,5	CY and G-CSF	No	BEAM	Yes	8,5	58%	Italian BMT Study Group
Nash et al. (28)	26	5-8	G-CSF	Yes	TBI and CY	Yes	2	73%	
Burt et al. (29) G-CSF	21	3-8	G-CSF or CY and	Yes	TBI and CY	No	1,8	61%	
Openshaw et al. (30)	5	5,5-7,5	G-CSF	Yes	Busulfan and CY	Yes	1,8	40%	
Carreras et al. (31) Saiz et al (32, 33)	14	4,5-6,5	CY and G-CSF	Yes	Carmustine and CY	Yes	6	62,5%	
Ni et al. (34)	21	5-9,5	CY and G-CSF	Yes	CY and TBI or BEAM	Yes	3,5	75%	
Su et al. (35) Xu et al. (36)	22	4,5-7,5	G-CSF	In 9 patients	BEAM	No	3	77%	
Samijn et al. (37)	14	5,5-6,5	BM	Yes	TBI and CY	Yes	3	36%	
Atkins et al. (38) Freedman et al. (39)	17	3-6	CY and G-CSF	Yes	Busulfan and CY	Yes	3	75%	Canadian MS BMT Study



**Fig. 2** - Registro EBMT, mortalità trapiantologica (TRM) in pazienti con Sclerosi Multipla (aggiornamento al 2007): morti avvenute per motivi legati alla procedura trapiantologica vengono riportate divise per anno. La mortalità complessiva è 5,3% su 338 pazienti. Riprodotto per gentile concessione da Mancardi G, Saccardi, R. *Lancet Neurol.* 2008 Jul; 7(7): 626-36. Review (18).

trattamento convenzionale, devono avere una prognosi severa in termini di sopravvivenza o di grave disabilità, non devono avere un danno d'organo irreversibile. In una recente analisi del database dell'EBMT, l'esperienza del centro si è mostrata un fattore statisticamente significativo in analisi uni e multivariata (16), analogamente a quanto già osservato in ambito ematologico (17).

Nella SM i dati riportati in letteratura mostrano una sopravvivenza libera da progressione variabile tra 50 e 70% ad oltre 5 anni (18) (Tab. 3). È interessante notare che la mortalità trapiantologica sia diminuita sensibilmente quando venga confrontato il primo ed il secondo quinquennio di attività (Fig. 2). Lo schema di condizionamento più frequentemente utilizzato in Europa è il BEAM associato a ATG. L'esperienza sinora accumulata non mostra un vantaggio nella manipolazione del graft in termini di outcome neurologico (13, 19).

Anche nella SSc si è assistito ad una learning curve in termini di mortalità associata a trapianto. In Europa lo schema di condizionamento più frequente è la Ciclofosfamide (200 mg/kg associata ad ATG. Anche in questo caso la sopravvivenza libera da progressione è superiore al 50% a 5 anni (20, 21).

## Bibliografia

1. van Bekkum DW. Stem cell transplantation for autoimmune disorders. Preclinical experiments. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2004; 17(2): 201-22.
2. Ikehara S. Stem cell transplantation for autoimmune diseases: what can we learn from experimental models? *Autoimmunity* 2008. in press.
3. Denman AM, Russell AS, Denman EJ. Adoptive transfer of the diseases of New Zealand black mice to normal mouse strains. *Clin Exp Immunol.* 1969; 5(6): 567-95.

4. Morton JI, Siegel BV. Transplantation of autoimmune potential. I. Development of antinuclear antibodies in H-2 histocompatible recipients of bone marrow from New Zealand Black mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1974; 71(6): 2162-5.
5. Ikehara S, et al. Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by allogeneic bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82(22): 7743-7.
6. Ikehara S, et al. Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82(8): 2483-7.
7. Ikehara S, et al. Long-term observations of autoimmune-prone mice treated for autoimmune disease by allogeneic bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86(9): 3306-10.
8. Gratwohl A, Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for severe autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2008; 1.
9. McAllister LD, Beatty PG, Rose J, Allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia in a patient with multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 19(4): 395-7.
10. Lopez-Cubero SO, Sullivan KM, McDonald GB. Course of Crohn's disease after allogeneic marrow transplantation. *Gastroenterology*. 1998; 114(3): 433-40.
11. Marmont AM. Stem cell transplantation for autoimmune disorders. Coincidental autoimmune disease in patients transplanted for conventional indications. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2004; 17(2): 223-32.
11. Fassas A, et al. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 20(8): 631-8.
12. Fassas A, et al. Autologous stem cell transplantation in progressive multiple sclerosis-an interim analysis of efficacy. *J Clin Immunol*. 2000; 20(1): 24-30.
13. Burt RK, et al. Treatment of autoimmune disease by intense immunosuppressive conditioning and autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1998; 92(10): 3505-14.
14. Gratwohl A, et al. Indications for haemopoietic precursor cell transplants in Europe. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol*. 1996; 92(1): 35-43.
15. Farge D, et al. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) for Autoimmune Diseases: 10 Years Experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Working Party on Autoimmune Diseases ASH Annual Meeting and Exposition 2008, (Abstract).
16. Frassoni F, et al. Effect of centre on outcome of bone-marrow transplantation for acute myeloid leukaemia. Acute Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet*. 2000; 355(9213): 1393-8.
17. Mancardi G, and Saccardi R. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008; 7(7): 626-36.

18. Saccardi R, et al. Autologous stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: update of the European Group for Blood and Marrow Transplantation autoimmune diseases working party database. *Mult Scler.* 2006; 12(6): 814-23.
19. Nash RA, et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for severe systemic sclerosis: long-term follow-up of the US multicenter pilot study. *Blood.* 2007; 110(4): 1388-96.
20. Vonk MC, et al. Long-term follow-up results after autologous haematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67(1): 98-104.
21. Fassas A, and Kimiskidis VK. Stem cell transplantation for multiple sclerosis: what is the evidence? *Blood Rev.* 2003; 17(4): 233-40.
22. Kozak T, et al. High-dose immunosuppressive therapy with PBPC support in the treatment of poor risk multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25(5): 525-31.
24. Kozak T, et al. Immunoablative therapy with autologous PBPC transplantation in the treatment of poor risk multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41 (suppl 1): S18.
25. Mancardi GL, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses Gd-enhanced MRI activity in MS. *Neurology.* 2001; 57(1): 62-8.
26. Saccardi R, et al. Autologous HSCT for severe progressive multiple sclerosis in a multicenter trial: impact on disease activity and quality of life. *Blood.* 2005; 105(6): 2601-7.
27. Saccardi R, et al. Autologous HSCT for severe progressive multiple sclerosis in the italian prospective, multicentre GITMO-Neuro trial: long term follow up. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41 (suppl 1): S17.
28. Nash RA, et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Blood.* 2003; 102(7): 2364-72.
29. Burt RK, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: failure of a total body irradiation-based conditioning regimen to prevent disease progression in patients with high disability scores. *Blood.* 2003; 102(7): 2373-8.
30. Openshaw H, et al. Peripheral blood stem cell transplantation in multiple sclerosis with busulfan and cyclophosphamide conditioning: report of toxicity and immunological monitoring. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000; 6(5A): 563-75.
31. Carreras E, et al. CD34+ selected autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple sclerosis: report of toxicity and treatment results at one year of follow-up in 15 patients. *Haematologica.* 2003; 88(3): 306-14.
32. Saiz A, et al. Clinical and MRI outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation in MS. *Neurology.* 2004; 62(2): 282-4.
33. Saiz A, et al. (Clinical outcome 6 years after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis.). *Neurologia.* 2008.
34. Ni XS, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for pro-

- gressive multiple sclerosis: report of efficacy and safety at three yr of follow up in 21 patients. *Clin Transplant*. 2006; 20(4): 485-9.
35. Su L, et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Int J Hematol*. 2006; 84(3): 276-81.
  36. Xu J, et al. Clinical outcomes after autologous haematopoietic stem cell transplantation in patients with progressive multiple sclerosis. *Chin Med J (Engl)*. 2006; 119(22): 1851-5.
  37. Samijn JP, et al. Intense T cell depletion followed by autologous bone marrow transplantation for severe multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006; 77(1): 46-50.
  38. Atkins H, Freedman M. Immunoablative therapy as a treatment aggressive multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2005, 23(1): 273-300, ix.
  39. Freedman MS. Bone marrow transplantation: does it stop MS progression? *J Neurol Sci*. 2007; 259(1-2): 85-9.

## **Il trapianto per via intra-ossea di cellule di cordone ombelicale (CBT) consente di superare il problema del mancato/ritardato attecchimento nei pazienti adulti con neoplasie ematologiche anche in presenza di bassa cellularità e disparità HLA**

*Francesco Frassoni<sup>1</sup>, Marina Podestà<sup>1</sup>, Francesca Gualandi<sup>2</sup>, Anna Maria Raiola<sup>2</sup>, Teresa Lamparell<sup>2</sup>, GianLuca Ubezio<sup>1</sup>, Riccardo Varald<sup>1</sup>, Marco Gobbi<sup>3</sup>, Nicoletta Sacchi<sup>4</sup>, Myriam Labopin<sup>5</sup>, Andrea Bacigalupo<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Centro Cellule Staminali e Terapia Cellulare, Ospedale San Martino, Genova.

<sup>2</sup>Divisione Ematologia e Trapianto di Midollo, Ospedale San Martino, Genova.

<sup>3</sup>Cattedra di Ematologia, Università di Genova, Ospedale San Martino, Genova.

<sup>4</sup>IBMDR Ospedali Galliera, Genova.

<sup>5</sup>Université Pierre et Marie Curie Paris 6, France

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE) allogene rappresenta, nelle cure delle emopatie maligne avanzate o ad alto rischio di ricaduta, la procedura terapeutica associata alla migliore attività antineoplastica.

La sorgente di queste ultime è spesso il midollo osseo (BM) oppure le cellule del sangue periferico mobilizzate nel sangue periferico (MPB) dopo stimolazione con fattore di crescita. Meno del 20% dei pazienti trovano un donatore nella fratria o nella famiglia. Questo problema è destinato ad incrementarsi in considerazione del ridotto numero di figli che ha la famiglia media.

La probabilità di trovare un donatore compatibile nel registro internazionale si è incrementata nell'ultimo decennio ma molti pazienti restano senza donatore.

Coloro che trovano un donatore non familiare nel registro (MUD = Matched unrelated donor) hanno una probabilità di sopravvivenza che è molto migliorata nell'ultimo decennio e si avvicina a quella da trapianto da donatore familiare compatibile. Tuttavia, il trapianto MUD ha una considerevole morbilità e mortalità legate soprattutto a due fattori: la malattia trapianto verso ospite (GVHD) e la immuno-deficienza post-trapianto. In aggiunta vanno considerati i seguenti problemi:

- 1) Il tempo di latenza dall'inizio della ricerca è troppo lungo specie per i pazienti in fase avanzata di malattia;
- 2) La crescente restrizione delle condizioni che consentono l'utilizzo di un donatore MUD per pazienti in fase avanzata.

Esistono altre possibilità di trapianto:

- a) il trapianto da donatore aplo-identico;
- b) il trapianto con cellule ottenute dal cordone ombelicale.

Il trapianto aplo-identico consente di trovare un donatore nella stragrande maggioranza dei casi. Esso è stato sviluppato in primis da gruppo di Perugia e poi dall'Ospedale San Raffaele di Milano e da alcuni gruppi pediatrici come Pavia, Tuebingen e molti altri. Questo tipo di trapianto si effettua selezionando le cellule CD34 positive per evitare di infondere un numero di linfociti (CD3) che provochino la GVHD. (Aversa F et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med.* 1998 Oct 22; 339(17): 1186-93. (Ruggeri L et al., Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002 Mar 15; 295(5562): 2097-100).

Il limite del successo è dovuto principalmente alla profonda e prolungata immunodeficienza post-trapianto. Tuttavia, questo approccio trapiantologico trapianto ha ancora margini di miglioramento. Kaneko S, et al IL-7 and IL-15 allow the generation of suicide gene-modified alloreactive self-renewing central memory human T lymphocytes. *Blood.* 2009 Jan 29; 113(5): 1006-15

Il maggiore fattore limitante il successo del CBT, specie nell'adulto, è l'alto rischio di non-attecchimento ed il ritardato recupero dei neutrofili e, soprattutto, delle piastrine (Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of Umbilical-Cord Blood or Bone Marrow from Unrelated Donors in Adults with Acute Leukaemia. *N Engl J Med.* 2004; 351: 2276-2285).

Due elementi concorrono principalmente a determinare questo rischio:

- a) Il numero delle cellule contenute nel cordone ombelicale (circa 1/10 rispetto a quelle ottenute con un espianto di midollo osseo);
- b) la disparità HLA.

È particolarmente informativo, a questo riguardo, il lavoro pubblicato sul *Lancet* nel 2007 (Mary Eapen, et al *The Lancet.* Vol 369 June 9, 2007) in cui, nonostante si tratti di un lavoro che concerne una popolazione pediatrica, quindi con rapporto favorevole cellule nucleate (TNC= total nucleated cells)/kg di peso corporeo, mostra i seguenti risultati:

È importante richiamare l'attenzione sul fatto che il trapianto di cellule di cordone ombelicale ha il vantaggio di avere tempi di realizzazioni brevi. Esiste infatti una rete internazionale (NETCORD) cui accedere per la ricerca di sacche già bancate e disponibili.

Oggi le unità cordonali bancate sono attorno alle 340.000 (dati Centro Nazionale Sangue 2008). In aggiunta, non c'è coinvolgimento di un soggetto sano né di sottoporlo ai rischi legati all'espianto (anestesia) o alla somministrazione di fattore di crescita. Da qualche anno è stato introdotto, dal gruppo della Università del

**Tab. 1** - Cumulative probabilities of neutrophil and platelet recovery.

	Number*	Neutrophil recovery at day 42 (95% CI)	Number*	Platelet recovery at 6 months (95% CI)
Allele-matched bone marrow	113/116	97 (92-99)	99/116	85 (77-91)
One- or two-allele mismatched bone marrow	161/166	97 (93-99)	125/166	74 (66-80)
Matched umbilical cord blood	32/35	85 (67-94)	28/35	79 (60-89)
One-antigen mismatched umbilical cord blood (high cell dose)	133/154	80 (72-86)	101/154	64 (56/72)
One-antigen mismatched umbilical cord blood (low cell dose)	29/44	59 (43-72)	19/44	43 (28-57)
Two-antigen mismatched umbilical cord blood (any cell dose)	217/267	76 (70-81)	124/263	47 (41-53)

\*Number of patients who achieved recovery/number of evaluable patients. Data on neutrophil recovery are missing for three patients (<1%). Data on platelet recovery are missing for eight patients (1%).

Minnesota, il trapianto di due unità cordonali che ha certamente diminuito il rischio di non attecchimento e ridotto il tempo di recupero dei neutrofili. Tuttavia un recente pubblicazione (Brunstein CG, et al Blood, 2007; 110: 3064-3070), che dimostra indiscutibilmente un miglioramento dei risultati, riporta che a 6 mesi dal trapianto il 35% dei pazienti non ha recuperato le piastrine e che l'incidenza di GVHD acuta di III-IV grado (quindi molto grave) è del 22%.

Era noto, da studi sugli animali, che con la infusione via endovena, solo il 10% delle cellule inoculate raggiungono il midollo osseo (Van Hennik PB et al. Van Hennik PB, de Koning AE, Ploemacher RE. Seeding efficiency of primitive human hematopoietic cells in nonobese diabetic/severe combined immune deficiency mice: implications for stem cell frequency assessment. Blood 1999; 94: 3055-3061. Blood 1999; 94: 3055-3061). Questa perdita è particolarmente rilevante nel caso del cordone ombelicale. Si ritiene che questo ritardo sia dovuto al ridotto numero di progenitori del sangue presenti nel cordone ombelicale in misura 10 volte inferiore al prelievo di midollo osseo. Anche se non è del tutto chiaro che questa sia l'unica causa degli insuccessi, non c'è dubbio che il rapporto cruciale cellule trapiantate/peso corporeo è particolarmente sfavorevole nell'individuo adulto.

Abbiamo recentemente introdotto un nuovo tipo di trapianto di cellule cordonali. Le cellule del cordone ombelicale vengono trapiantate direttamente nella cresta iliaca postero superiore invece di essere infuse endovena come fino ad ora effettuato sia con cellule di midollo osseo, sangue periferico mobilizzato o cellule di cordone ombelicale.

Studi sperimentali sul topo, effettuati dal nostro gruppo agli inizi degli anni 2000, avevano mostrato un migliore attecchimento se il trapianto era effettuato per via intra-ossea. (Castello S, Podesta M, Menditto VG, et al. Intra-bone marrow injec-

tion of bone marrow and cord blood cells: an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. *Exp Haematol.* 2004; 32:782-7). Abbiamo così avviato uno studio di fase I-II (F Frassoni et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncology* Vol 9 September 200, 831-839). Sono ora stati inclusi nello studio 57 pazienti: 28 AMLs (10 in prima, 3 in seconda remissione e 14 in fase avanzata, 1 secondaria), 15 ALLs (1 in prima, 5 in seconda remissione e 9 in fase avanzata) 4 CMLs (2 Acc., 2 BT), 3 Hodgking Disease in fase refrattaria, 4 Non-Hodgking Lymphomas in fase refrattaria, 1 Atypical myeloproliferative disease (after HD), 1 SAA and 1 Diskeratosis Congenita (DC). L'età mediana era 36 anni (18-66). HLA matching era 6/6, 5/6, 4/6 and 3/6 in 1, 10, 45 e 1 pazienti, rispettivamente. I regimi di condizionamento: TBI frazionata (10-12 Gy)/cyclophosphamide (CTX) (n=41), Fludarabine (Flu)-CTX-TBI 2 Gy (n=6), Treosulfan (Treo)-Thiotepa (TT)-Flu (n=10). La mediana delle cellule trapiantate era  $2.6 \times 10^7/\text{kg}$  (1.4-5.4) e per le CD34+  $0.83 \times 10^5/\text{kg}$  (0.42-4.53). Le cellule di cordone ombelicale sono state infuse lentamente nelle creste iliache postero superiori con il paziente in sala operatoria utilizzando una anestesia breve (10 minuti circa) con Propofol. In 21 pazienti la procedura è stata effettuata in entrambe le creste iliache mentre in 36 o nella cresta iliaca destra o sinistra. Non sono state osservate complicazioni durante o dopo la infusione.

Nove pazienti con malattia molto avanzata sono deceduti entro 12 giorni dal trapianto. Due pazienti non hanno attecchito; questi due pazienti (SAA/MDS e CML Acc) hanno ricevuto un secondo IB CBT ma l'attecchimento solo dopo infusione di cellule mesenchimali (third party). Tutti gli altri pazienti hanno attecchito. Il tempo mediano di recupero dei neutrofili (PMN) e piastrine è stato: +23 (14-44) e +37 (16-64) rispettivamente. La Cumulative Incidence di attecchimento è stata 87% (95% CI: 73-97) al giorno +44 per i PMN e 82% (95% CI: 67-95) al giorno +64 per le piastrine.

Il chimerismo è stato del 100% donatore in tutti i pazienti valutabili (eccetto i due non attecchiti) dal giorno +60. In 44 pazienti a rischio per acute Graft-versus-Host Disease (GVHD) lo score è stato: grade 0 (n=31) grade I (n=4) and grade II (n=7), grade III (n=1). Sette pazienti ebbero GVHD cronica moderata e due extensive CGVHD. Le cause di mortalità furono: MOF (n=9), infezioni (n=12), PTLD (n=1) e ricaduta/ progressione (n=5). Trenta pazienti sono vivi: 3 in ricaduta/ progressione; un paziente dei due che non hanno attecchito è ancora trasfusione dipendente per le piastrine. Ventisei pazienti sono in remissione ematologica con follow-up di 22 mesi (42-29).

Questi dati suggeriscono che il CBT per via intra-ossea è associato ad attecchimento nella stragrande maggioranza dei pazienti anche quando sono trapiantate unità cordonali a bassa cellularità e in presenza di incompatibilità HLA 2/6. Pertanto questo tipo di procedura consente di poter effettuare un trapianto ad un grande numero di pazienti adulti. La relativa bassa incidenza di GVHD è un risultato assai promettente ma ancora prematuro per trarre conclusioni definitive.

## Trapianto allogenico di midollo osseo: passato, presente, futuro

*Alberto Bosi, Benedetta Bartolozzi*

Clinica di Ematologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Università di Firenze

### Cenni storici

I primi tentativi nell'utilizzo di sangue midollare risalgono a circa cento anni fa: sangue midollare veniva somministrato per bocca a pazienti affetti da anemia e leucemia. Fu solo cinquanta anni dopo che Schretzenmayr, Rasjeck e Osgood infusero cellule midollari rispettivamente intramuscolo, intramidollo e endovena, senza peraltro alcun risultato (1).

I primi interessanti esperimenti con cellule midollari furono condotti durante la seconda guerra mondiale; sangue midollare di cani sani veniva infuso in cani sottoposti a radiazioni (2). Simili esperimenti furono eseguiti su topi e portarono alla dimostrazione che l'infusione di sangue midollare possedeva attività protettiva in topi letalmente irradiati. Nel 1954 Barnes e Loutit dimostrarono che topi infusi con cellule midollari singeniche erano vivi a 100 giorni (3). Sempre nei primi anni 50, grazie allo sviluppo del "spleen-colony assay", Till-McCulloch definirono la cellula staminale emopoietica come quella cellula con capacità di differenziazione multilineare e capace di proteggere gli animali da radiazioni altrimenti letali (4). Solo l'affinarsi delle tecniche per la tipizzazione dell'HLA, iniziate anch'esse negli anni 1950, ha permesso di fondare le basi per l'utilizzo della terapia trapiantologica nelle leucemie e patologie midollari. Negli anni settanta, il gruppo di Thomas riuscì ad accumulare e riportare una casistica di pazienti pediatriche con leucemia acuta trattati in ricaduta con trapianto allogenico riportando un 20% di pazienti con lunga sopravvivenza (5). Da allora, il trapianto è evoluto da una terapia sperimentale ad un trattamento d'elezione per molte patologie ematologiche. L'utilizzo del trapianto allogenico è strettamente legato alla disponibilità di un donatore compatibile nell'ambito familiare, condizione che si verifica con una frequenza del 25% nei fratelli e quindi non così frequente vista la bassa natalità tipica dei paesi industrializzati. Per ovviare a questa situazione sono stati creati dei registri nazionali collegati fra loro su base mondiale, in cui vengono inseriti dei donatori volontari. Tali organizzazioni costituiscono delle vere e proprie banche

dati che, collegate tra di loro da una rete internazionale mediante un sistema computerizzato, rendono accessibile ad un singolo paziente un pool di donatori estremamente ampio, permettendo così che la ricerca venga estesa in tempo reale sui registri nazionali ed esteri. Al 31/12/2007 nel database del Bone Marrow Donor Worldwide (BMDW) erano inseriti 11.531.197 potenziali donatori adulti di CSE. La difficoltà a reperire in alcuni pazienti un donatore o la necessità di un intervento terapeutico rapido (la ricerca di un donatore infatti può avere dei tempi molto lunghi) ha spinto a ricercare delle fonti alternative di cellule staminali rispetto al midollo. L'osservazione che il sangue placentare contiene cellule staminali emopoietiche, ha determinato una serie di studi e sperimentazioni, prima su animali da laboratorio e poi sull'uomo, che hanno confermato la possibilità di utilizzare il sangue placentare come fonte alternativa di progenitori emopoietici a scopo trapiantologico; in altre parole le cellule staminali cordonali sono perfettamente in grado di ricostituire il midollo osseo dopo la sua distruzione ad opera di un trattamento radio-chimioterapico ad alte dosi. Il sangue placentare inoltre è ottenibile con una facile metodica di prelievo dopo il taglio del cordone ombelicale, senza alcun rischio per la madre ed il neonato. Nel 1988 il primo trapianto da CB è stato eseguito a Parigi (6) e da allora oltre 14000 trapianti sono stati eseguiti in tutto il mondo utilizzando cellule staminali da cordone. La possibilità di effettuare trapianti con sangue placentare da donatori familiari e non, ha indotto la costituzione di vere e proprie "banche" dove vengono conservate le unità di sangue placentare raccolte. Queste unità vengono congelate e conservate per molti anni, visibili sull'archivio elettronico di NETCORD, risultando quindi disponibili in tempi brevi. Il grande limite del trapianto allogenico consiste nell'elevata TRM, stimata intorno al 20-30%. L'osservazione che la radio-chimioterapia di condizionamento non era sempre in grado di eradicare la malattia e che l'azione del trapianto fosse legata ad un'azione immunologia anti tumorale da parte dei linfociti del donatore (GVL) ha spinto verso l'introduzione di regimi di condizionamento non mieloablativi (7): questi tipi di condizionamento hanno dimostrato che anche con una mielosoppressione modesta si poteva ottenere un chimerismo inizialmente misto che poi nel tempo si convertiva a completo, spontaneamente o grazie all'infusione di DLI. L'introduzione di tali regimi di condizionamento ha permesso di ridurre la tossicità extraematologica e quindi la TRM e di allargare l'uso dell'allogtrapianto a pazienti con età più avanzata e con comorbidità.

## **Il trapianto oggi**

Il trapianto di CSE attualmente comprende il trapianto con cellule staminali allogeniche e autologhe derivanti da midollo osseo, sangue periferico e sangue cordonale. La survey sull'attività trapiantologica dell'EBMT riporta 25563 primi trapianti di cui 10072 allogenici e 15491 autologhi eseguiti in 613 centri europei nel 2007 (8). In Italia sempre nel 2007, il GITMO ha registrato 1374 trapianti allogenici dei quali 432, pari al 31.4%, da donatore non familiare (Fig. 1 e 2). Le principali indicazioni sono le leucemie e i linfomi rispettivamente per il trapianto allogenico e quello autologo (Fig. 3). Nuove indicazioni stanno emergen-



Fig. 1

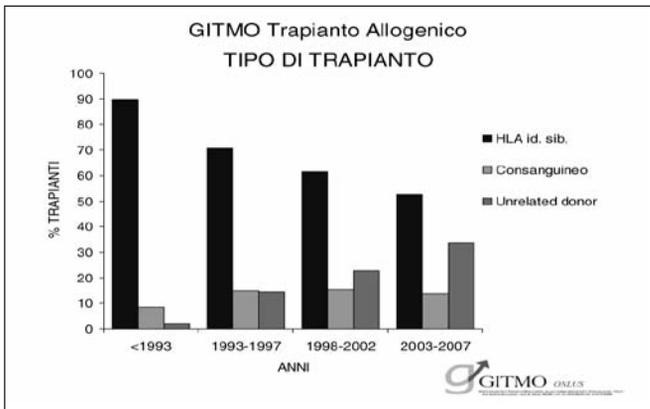


Fig. 2

do quali le malattie autoimmuni e l'amiloidosi AL nel trapianto autologo e i tumori solidi e patologie mieloproliferative per il trapianto allogenico. L'introduzione di terapie alternative, quali l'imatinib nella leucemia mieloide cronica, ha ridotto l'utilizzo del trapianto in questa patologia.

Per quanto riguarda la sorgente di cellule staminali, nel trapianto autologo, il sangue periferico è attualmente il più utilizzato (98%), visto la superiorità nel ridurre il tempo di aplasia. Per il trapianto allogenico tutte e tre le sorgenti di cellule staminali vengono usate e possiedono i loro vantaggi e svantaggi. Le cellule staminali periferiche sono sì associate ad un più rapido attecchimento ma anche ad un aumentato rischio di GVHD cronica rispetto alle midollari (9). Inoltre l'effetto graft-versus-malignancy osservato in pazienti con cGVHD non è applicabile per pazienti con patologie non neoplastiche, come aplasia midollare; il midollo pertanto rimane la prima scelta in queste indicazioni (10).

La preferenza del donatore deve anche essere presa in considerazione visto i differenti effetti collaterali legati alla donazione di sangue midollare o periferico.

Il sangue cordonale è utilizzato in pazienti che non possiedono un donatore familiare HLA identico o un donatore volontario compatibile. Il vantaggio di tale sor-

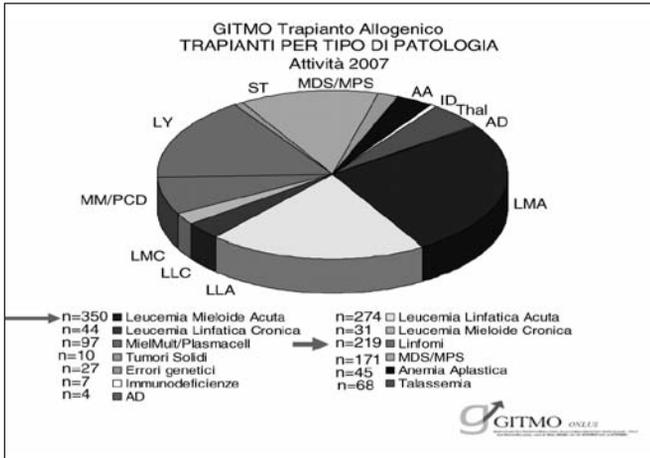


Fig. 3

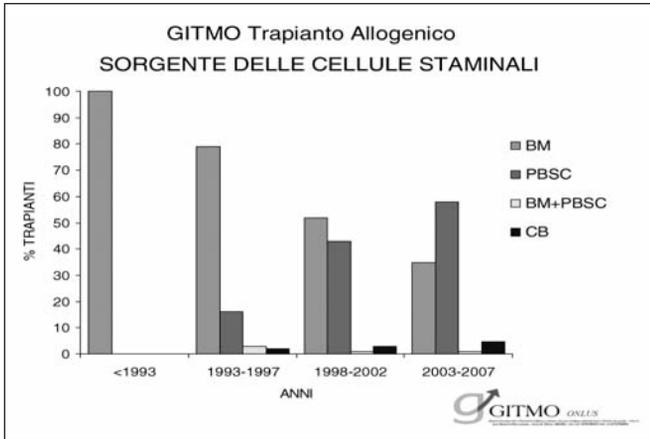


Fig. 4

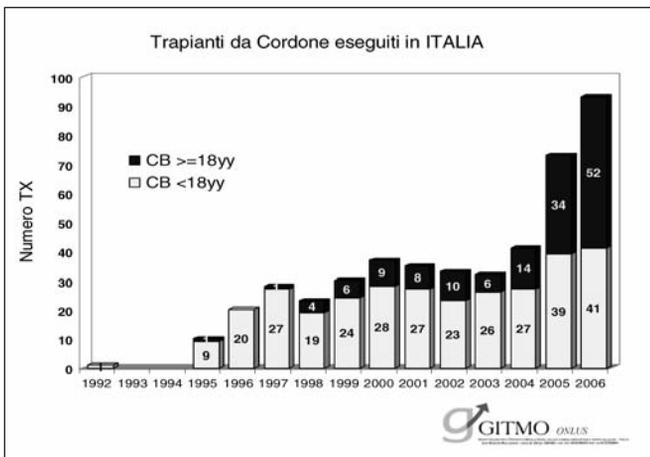


Fig. 5

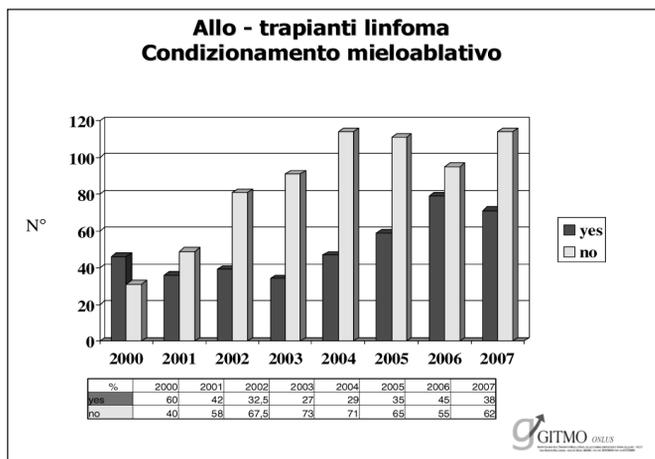


Fig. 6

gente è la rapidità con cui può essere ottenuto, rappresentando quindi la miglior opzione quando un paziente necessita di un trapianto in tempi brevi. La scelta delle unità cordonali deve essere effettuata sulla base della dose cellulare e della compatibilità HLA: un minimo di  $2.5-3 \times 10^7$  cellule nucleate totali/kg al tempo della raccolta e una compatibilità minima 4/6 (HLA-A, -B antigenica e HLA-DRB1 allelica) sono raccomandate.

Tali trapianti, che in passato erano utilizzati in prevalenza per pazienti pediatrici, sono sempre più in crescita anche nei pazienti adulti, grazie anche all'impiego di protocolli in cui vengono utilizzate due unità (Fig. 4 e 5). I risultati di trapianti da CB effettuati in pazienti con leucemia acuta sono comparabili a quelli effettuati da donatori non familiari (11, 12).

Il sempre più largo impiego di regimi ad intensità ridotta ha permesso di sottoporre a trapianto allogenico, pazienti anziani e con comorbidità, che altrimenti sarebbe risultati inleggibili per tale procedura. Nel report dell'EBMT 2007, tali tipi di trapianto rappresentano il 36% di tutti i trapianti allogenici. Inoltre i dati GITMO riportano l'attualmente predominanza del condizionamento non mieloablativo (62%) nei linfomi (Fig. 6).

### Bibliografia essenziale

1. Thomas X, Troncy J. Haematopoietic stem cell transplantation: a historical overview. *Haema*. 2006; 9(4): 482-495.
2. Reckers PE, Coulter MP, Warren S. Effect of transplantation of bone marrow into irradiated animals. *Arch Surg*. 1950; 13: 356-367.
3. Barnes DWH, Loutit JF. What is the recovery factor in spleen. *Nucleonics*. 1954; 12: 68-71.
4. Wu AM, Till JE, Siminovitch L, McCulloch EA. A cytological study of the capacity for differentiation of normal haematopoietic colony forming cells. *J Cell Physiol*. 1967; 69: 177-184.

5. Thomas ED, Buckner CD, Rudolph RH, et al. Allogeneic marrow grafting for haematological malignancy using HLA-matched donor-recipient pairs. *Blood*. 1971; 38:267-287.
6. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Haematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J MED*. 1989; 321: 1174-1178.
7. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Haematopoietic cell transplantation in older patients with haematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor-effects. *Blood*. 2001; 97: 3390-3400.
8. Gratwohl A, Baldomero H, Schwendener A, et al. The EBMT activity survey 2007 with focus on allogeneic HSCT for AML and novel cellular therapy. *Bon Marrow Transplant*. 2009; Jan 26. Epub.
9. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood*. 2000; 95(12): 3702-9.
10. Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC, et al. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 2007; 110(4): 1397-400.
11. Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*. 2004; 351(22): 2276-85.
12. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*. 2007; 369(9577): 1947-54.

**RIPARAZIONE DELLE FERITE  
E RIGENERAZIONE DEI TESSUTI**



## Progenitori postnatali dei tessuti mesodermici

*Paolo Bianco*

Istituto di Anatomia Patologica, Università di Roma "La Sapienza"

L'idea ampiamente diffusa che esistano, pressoché in tutti i tessuti, cellule staminali "mesenchimali" capaci di dare origine a tutti i tessuti connettivi nonché ad altri derivati mesodermici come endotelio, miocardio o muscolo scheletrico, è, al momento, un'allucinazione mediatica, un'operazione di marketing, e talora uno strumento di contesa ideologica. Un'allucinazione mediatica, perché nessuna evidenza sperimentale credibile e riproducibile sostiene la mitologia di progenitori multipotenti con proprietà differenziative estesissime e simili in tessuti diversi. Un'operazione di marketing, perché interessi di companies create ad hoc (come quella da cui emanò l'articolo che rese l'idea di cellule staminali mesenchimali popolare, (Pittenger et al. 1999)) poggiano direttamente su quella mitologia. Infine, uno strumento di contesa ideologica, perché l'idea di "cellule staminali mesenchimali", proposta al grande pubblico poco dopo l'isolamento di cellule staminali embrionali umane, a lungo ha veicolato il messaggio che esistano "due tipi" di cellule staminali con identiche o simili proprietà biologiche, quelle "embrionali" e quelle "adulte". Rimandando ad altra occasione una discussione di quest'ultima specifica superstizione, le righe che seguono sono intese a discutere i dati sperimentali chiave che formano lo stato dell'arte in tema di progenitori postnatali di tessuti mesodermici.

Il tema affonda le sue radici nell'esperimento classico di Tavassoli e Crosby (Tavassoli and Crosby 1968), che generarono un ossicolo eterotopico trapiantando frammenti molli di tessuto midollare, liberi da osso. Nell'ossicolo eterotopico, abbondante tessuto osseo a prova di istologia dimostrava l'esistenza di un potenziale osteogenico entro il midollo, mentre la progressiva costituzione di un tessuto midollare suggeriva l'esistenza entro il midollo di un ambiente capace di attrarre l'ematopoiesi dell'ospite. Le proprietà organogeniche rivelate dall'esperimento di Tavassoli e Crosby furono successivamente trasferite a singole cellule non-ematopoietiche, aderenti, fibroblasto simili e clonogeniche dal lavoro di Friedenstein e collaboratori, i quali fornirono l'evidenza sperimentale per l'esistenza di cellule multipotenti entro lo stroma del midollo osseo, rivelandone le proprietà in saggi di trapianto eterotopico derivati concettualmente dall'esperienza di Tavassoli e Crosby. Poco più tardi, Friedenstein e Owen formularono su

queste basi sperimentali l'ipotesi che il midollo osseo dei mammiferi contenesse un secondo tipo di cellula staminale oltre quella ematopoietica, che denominarono "osteogenica" o "stromale" (Friedenstein 1990).

Prima che i dati sperimentali di Friedenstein e collaboratori fossero in parte riciclati a sostegno della "scoperta" di "cellule staminali mesenchimali" senza tuttavia debita citazione e assegnazione di credito, il midollo osseo era la sola sede in cui esistessero (putativamente) cellule staminali stromali, e i tessuti scheletrici (osso, cartilagine, tessuto fibroso, e adipociti) i soli tessuti compresi nel sistema di diversi lineage emananti da un singolo progenitore comune. Il nuovo paradigma di "cellule mesenchimali" prevede invece l'esistenza di cellule staminali multipotenti in tutti i tessuti, e tutti i derivati mesodermici non-epiteliali come progenie di questo putativo progenitore ubiquitario (Dominici et al. 2006) (De Bari et al. 2001).

Due domande erano state lasciate aperte dal lavoro di Friedenstein, e sono rimaste aperte nel decennio di ebbrezza per le "cellule staminali mesenchimali":

- a) se davvero esistesse nel midollo una cellula stromale non solo multipotente, ma capace di autorinnovamento in vivo;
- b) quale fosse, questa cellula, in vivo. La recente, precisa identificazione dei progenitori stromali midollari saggiati negli esperimenti di Friedenstein e collaboratori fornisce una risposta a entrambe le domande, documentando sia la il fenotipo e la stessa identità anatomica dei progenitori stromali nel midollo, sia la loro capacità di autorinnovamento, e anzi documentando la loro capacità di istituire e trasferire a un sito eterotopico il microambiente ematopoietico (Sacchetti et al. 2007).

Questi dati recenti mettono il tema dei progenitori postnatali dei tessuti mesodermici di nuovo su basi sperimentali rigorose, introducendo la possibilità:

- a) di legare le canoniche proprietà dei progenitori stromali (es., clonogenicità) a un fenotipo specifico;
- b) di legare quel fenotipo specifico a uno specifico tipo cellulare in situ;
- c) di saggiare dunque, attraverso i necessari modelli di trapianto in vivo, le proprietà non solo di singole cellule, ma di singole cellule precisamente identificate - nel midollo e in altri tessuti.

Applicato ad altri tessuti, l'uso dello stesso approccio sperimentale adottato per chiarire l'identità dei progenitori stromali midollari (ivi compreso l'uso dello stesso marker chiave per l'isolamento prospettico, MCAM/CD146) rivela l'esistenza di un sistema di progenitori clonogenici associati alle pareti microvascolari, isolabili in base allo stesso fenotipo in tessuti diversi, ma dotati di proprietà differenziative radicalmente diverse. La più chiara dimostrazione della eterogeneità funzionale di progenitori di diversi tessuti discende dallo studio comparativo di midollo osseo e muscolo scheletrico. L'uso di saggi rigorosi di osteogenesi e miogenesi dimostra l'assenza di qualunque capacità raddomioigenica nelle "cellule staminali mesenchimali" di midollo, e di qualunque capacità osteogenica intrinseca in progenitori miogenici non indotti da morfogeni (BMPs). Gli stessi saggi rivelano tuttavia l'esistenza di progenitori "committed" ortodossi in tessuti diversi, e nel caso del muscolo, rivelano una classe di progenitori miogenici

distinta anatomicamente ma non funzionalmente dalle cellule satelliti, localizzata nelle pareti venulari. Nell'insieme, questi dati disegnano un nuovo paradigma, in cui le "cellule staminali mesenchimali" lasciano il posto a un sistema diffuso di progenitori microvascolari presenti in tessuti diversi e dotati di proprietà differenziali diverse e tessuto-specifiche. Per la prima volta, questi dati lasciano anche intravedere un meccanismo di organogenesi in base al quale spiegare la stessa esistenza di progenitori postnatali dei tessuti mesodermici (Bianco et al. 2008).

### **Bibliografia essenziale**

1. Bianco P, Robey PG, et al. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2005; 2(4): 313-9.
2. De Bari C, Dell'Accio F, et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44(8): 1928-42.
3. Dominici M, Le Blanc K, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.
4. Friedenstein AJ. Osteogenic stem cells in bone marrow. *Bone and Mineral Research*. JNM Heersche, JA Kanis. Elsevier. 1990; 7.
5. Pittenger MF, Mackay AM, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143-7.
7. Sacchetti B, Funari A, et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*. 2007; 131: 324-336.
8. Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*. 1968; 161(836): 54-6.

## Caratterizzazione e induzione di pre-adipociti umani

*Edoardo Raposio, Chiara Guida, Eleonora Canini*

Laboratorio di Ingegneria Tissutale, Divisione di Chirurgia Plastica, DICMI, Università di Genova

### Introduzione

Il grasso è un tessuto attivo e dinamico composto da diversi generi cellulari, includendo al suo interno: adipociti, fibroblasti, cellule muscolari lisce e progenitori delle cellule adipose, chiamati pre-adipociti. Possiamo considerare questi ultimi delle cellule staminali adulte multipotenti, aventi una potenzialità adipogenica, osteogenica, condrogenica, miogenica e neurogenica *in vitro* attraverso l'utilizzo di condizioni specifiche di cultura. Le somiglianze tra il tessuto adiposo umano e i fenotipi delle cellule stromali presenti nel midollo osseo potrebbero avere estese implicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale umana.

La fonte primaria di cellule pre-adipocitarie è il grasso umano derivato dalla liposuzione, nello specifico, le cellule del Lipoaspirato Processato (PLA) ottenuto dal lavaggio e dalla degradazione della matrice extracellulare del lipoaspirato. Ci è parso quindi appropriato esaminare la composizione del lipoaspirato attraverso studi citometrici prima della messa in coltura e della differenziazione miogenica e neurogenica. Alla fine, con lo scopo di osservare la capacità differenziativa cellulare, sono stati eseguiti degli esami di immunocitochimica.

### Materiali e metodi

#### *Processazione delle cellule PLA*

Il tessuto adiposo umano ottenuto da procedure di liposuzione effettuate su 10 donatori sani, è stato processato con metodi assodati per acquisire la popolazione cellulare atta ai nostri scopi. In breve, il lipoaspirato è stato ripetutamente lavato con tampone fosfato di Dulbecco sterile (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PBS-Euroclone, Life Sciences Division, Italy) al fine di rimuovere le cellule ematiche presenti e le sostanze anestetiche utilizzate durante le procedure di prelievo. La matrice extracellulare è stata degradata con collagenasi allo 0.075% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e centrifugata a 250×g per 10 minuti per riuscire ad avere il pellet ottimale che è stato poi messo in incubazione con 160mM di

cloruro di ammonio (Sigma-Aldrich) per 10 minuti a temperatura ambiente, per facilitare la lisi dei globuli rossi residui.

Le cellule sono state poi risospese in terreno di controllo non induttivo Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) contenente 10% di siero umano, 2 mM di Glutammina, Penicillina (100UI/ml) - Streptomicina (50 µg/ml), Amphotericina B (2,5 µg/ml), per poter poi essere usate per le analisi citofluorimetriche o per l'induzione *in vitro*.

Tutti i prodotti per la coltura cellulare sono stati acquistati dalla ditta Euroclone.

#### *Analisi della Citometria a Flusso*

Aliquote cellulari sono state messe in incubazione con i seguenti anticorpi monoclonali (Becton-Dickinson BD Pharmingen, San Jose, CA): Fluoresceina Isotiocianato (FITC) - coniugata con anti-CD44 (marcatore mesenchimale); Complesso Proteico Peridina-Clorofilla (PerCP) - coniugato con anti-CD45 (marcatore cellule linfocitarie); Ficoeritrina (PE) - coniugata con anti-CD90 (marcatore presente sulle cellule staminali e sui progenitori endoteliali). La FITC-coniugata con anti-IgG1 e il PE-coniugata con anti-IgG1 sono state usati come isotipo di controllo.

Le cellule così marcate sono state risospese in una soluzione fissativa di 200-300 ml contenente FACS (composta da PBS, 0,1% v/v formalina e 2% w/v glucosio) e conservate al buio e ad una temperatura di 4°C fino al momento dell'utilizzo.

Per ogni campione allestito sono stati acquisiti 10000 eventi cellulari utilizzando il citofluorimetro BD FACS Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e, successivamente, i campioni sono stati analizzati mediante i software Cell Quest e Paint-a-gate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

#### *Procedure di differenziamento delle cellule PLA*

Alcune cellule sono state mantenute in un terreno di controllo a 37°C e con CO<sub>2</sub> al 5% fino all'80% di confluenza.

Campioni cellulari appartenenti al primo passaggio sono stati coltivati in un terreno di induzione neurogenica (DMEM arricchito con: siero umano al 10%, 2 mM di Glutammina, Penicillina (100 UI/ml) - Streptomicina (50 µg/ml), Amphotericina B (2,5 µg/ml), 5 µg/ml di insulina (Sigma-Aldrich), 200 µM di indometacina (Sigma-Aldrich), 0.5 mM di isobutilxantina (Sigma-Aldrich)) per due settimane, e in un terreno di induzione miogenica (DMEM arricchito con siero umano al 10%, siero equino al 5%, 2 mM di Glutammina, Penicillina (100UI/ml) - Streptomicina (50 µg/ml), Amphotericina B (2,5 µg/ml), 0.1 µM di desametasone (Sigma-Aldrich), 50 µM di idrocortisone (Sigma-Aldrich)) per sei settimane. Altri campioni cellulari sono stati messi in incubazione in un terreno di controllo.

In tutti i casi, i terreni di coltura sono stati sostituiti due volte a settimana con terreni freschi. Inoltre, sia il controllo che le cellule indotte sono state osservate ogni giorno mediante microscopio (Nikon, Eclipse TS100).

#### *Analisi immunocitochimica*

Dopo l'induzione neurale e miogenica, le cellule sono state coltivate in Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (Nunc A/S, Denmark) e fissate con metanolo

a -20°C per 4 minuti. Allo scopo di confermare il differenziamento neurogenico delle cellule PLA sono stati utilizzati gli anticorpi monoclonali: Enolasi Neurone - Specifica (NSE, clone MIG-N3, 1:200, BioGenex, San Ramon, CA); Vimentina (clone V9, 1:200, BioGenex); Proteina Gliale Fibrillare Acida (GFAP, clone GA-5, 1:100, BioGenex); Anti-Tau (antisierica, 1:500, Sigma-Aldrich); Anti-MAP2 (clone HM-2, 1:1000, Sigma-Aldrich). Nel caso del differenziamento miogenico, sono stati utilizzati gli anticorpi monoclonali: Actina Muscolo Liscio (clone 1°4, 1:100, BioGenex); MyoD1 (clone 5.8° A, 1:80, Dako Cytomation, Denmark); Anti - Miosina Catena Pesante (clone A4.1025, 1:200, Upstate, NY). Per i sistemi di rivelazione sono stati usati: il super sensitive™ link-label nel formato concentrato (BioGenex); la tecnica del Complesso Avidina-Biotina; il 3,3' - diaminobenzidinetetraidroclore (DAB cromogeno, BioGenex)

## Risultati

La citometria a flusso ha rivelato che, prima della messa in coltura, le cellule PLA sono composte principalmente da cellule di origine mesenchimale (90% di queste positive al CD44); in aggiunta, il 7% di queste cellule CD44<sup>+</sup> è stato marcato con CD90 (presente nei progenitori delle cellule endoteliali) e il 5% con CD45 (presente nei progenitori linfopoietici).

Inoltre, l'osservazione al microscopio delle cellule dopo una settimana sotto condizioni neurogeniche ha mostrato la tipica morfologia dei neuroni comparata con le cellule di controllo. Cellule multinucleate longitudinali sono state osservate invece nella coltura miogenica. In aggiunta, i risultati di immunocitochimica mostrano che dopo due settimane le cellule PLA neurogeniche esprimono solo NSE, ma non GFAP, Tau e MAP2.

Dopo sei settimane, le cellule PLA miogeniche esprimono sia MyoD1 e la catena pesante della miosina, in contrasto con le cellule del terreno di controllo.

## Discussione

Questo studio non rappresenta un'analisi esaustiva del Lipoaspirato Processato Umano, ma convalida l'origine mesenchimale dello stesso *in vivo* e la capacità *in vitro* di differenziarsi sia in senso mesenchimale (muscolo) sia in senso ectodermico (tessuto nervoso) in un breve lasso di tempo. Questi dati sono stati confermati mediante l'osservazione morfologica e l'analisi immunocitochimica.

Nello specifico, durante l'induzione neuronale, le cellule cambiano la loro morfologia passando da una forma allungata simil-fibroblastica ad una struttura di tipo neuronale, con corpi cellulari rotondi e presenza di ramificazioni. Queste cellule esprimono NSE, uno dei primi marcatori espressi sui progenitori neuronali, ma non GFAP, Tau e MAP2 che sono marcatori dei neuroni e delle cellule gliali mature.

Le cellule coltivate in condizione di induzione miogenica esprimono MyoD1, un fattore di regolazione miogenica, e la catena pesante della miosina, una proteina contrattile presente nel citosol, quando sono incubate per un periodo di sei setti-

mane in terreno miogenico, come dimostrato da diversi periodi d'incubazione. Nonostante che la primitiva popolazione cellulare non sia stata selezionata a livello clonale, possiamo osservare una specie di multipotenzialità nelle cellule del lipoaspirato. Può essere preso in considerazione il fatto che la plasticità di queste cellule possa essere molto importante per le prospettive future dell'ingegneria tissutale.

Quindi, si rende necessario portare avanti altri studi con lo scopo di valutare gli effetti che differenti condizioni di cultura possano avere sulle cellule PLA e, allo stesso tempo, sviluppare esperimenti *in vivo*.

## Cellule staminali midollari e riparazione del danno tessutale

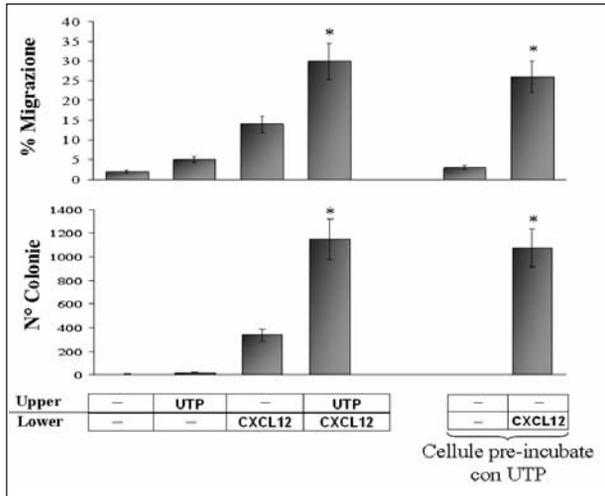
Roberto M. Lemoli

Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L. & A. Seràgnoli", Università di Bologna

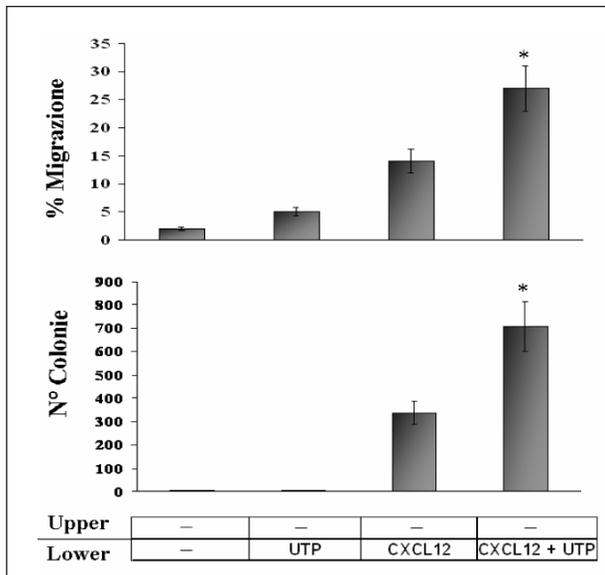
Molte ricerche hanno recentemente investigato i meccanismi che regolano il traffico delle cellule staminali midollari dal, e verso, il microambiente midollare o tessuti non emopoietici sottoposti a danno. Nonostante alcuni fattori chemiotattici (come il CXCL12) ed interazioni chiave (ad esempio VLA-4/VCAM-1) alla base di questo fenomeno siano stati estensivamente studiati, rimane ancora molto da chiarire sui processi di *homing* e mobilizzazione in risposta al danno d'organo. La famiglia dei nucleotidi extracellulari, in particolare i composti trifosfati ATP e UTP, sta emergendo in modo sempre più evidente come mediatrice di molteplici funzioni biologiche, tra le quali proliferazione e differenziamento, apoptosi, necrosi, secrezione di citochine e chemochine, nonché fenomeni chemiotattici. È stato infatti dimostrato che nucleotidi sia purinici che pirimidinici sono in grado di promuovere la migrazione di numerosi isotipi cellulari, tra i quali anche molte cellule emopoietiche, come eosinofili, monociti, neutrofili e cellule dendritiche (1). Significativo è, inoltre, il risultato di un recente studio, nel quale il recettore P2Y<sub>14</sub> (o GPR105) è emerso come *marker* putativo di una popolazione midollare estremamente quiescente. In base all'ipotesi formulata dagli autori, questo recettore potrebbe essere coinvolto nell'attrazione di cellule staminali verso specifiche nicchie midollari (2). In uno studio precedente, abbiamo dimostrato che cellule staminali umane CD34<sup>+</sup> esprimono recettori per nucleotidi extracellulari, sia della famiglia P2Y (P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub>), che P2X (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub>, P2X<sub>7</sub>). Attraverso saggi funzionali *in vitro* è stato inoltre dimostrato che il legame di questi recettori da parte dei nucleotidi ATP e, soprattutto, UTP induce un incremento del potenziale proliferativo di cellule staminali sia CD34<sup>+</sup>, che CD34<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup>, nonché l'espansione dei progenitori emopoietici più immaturi LTC-IC (*long-term culture initiating cells*). Infine, mediante trapianto xenogenico di cellule CD34<sup>+</sup> umane in topi NOD/SCID, è emerso che la stimolazione (anche per intervalli di tempo inferiori a 60 min) con UTP è in grado di incrementare le SRC (SCID Repopulating Cells), cioè le cellule staminali in grado di attecchire nel midollo murino e di ricostituirne l'emopoiesi umana (3). Tale incremento della frazione SRC può essere l'espressione di diversi fenomeni; in uno studio recente (4) abbiamo ipotizzato che l'incubazione con UTP potes-

se modulare positivamente il potenziale di attecchimento delle cellule CD34<sup>+</sup>, incrementandone la migrazione e l'*homing* midollare.

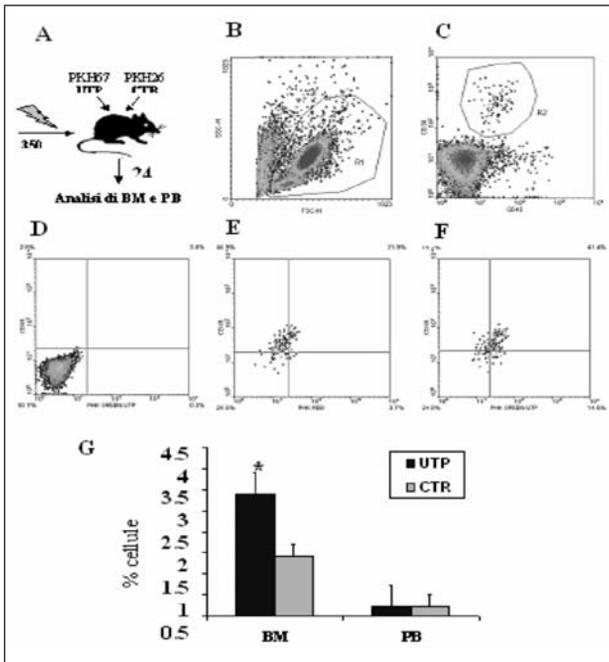
Per verificare questa ipotesi sono stati condotti, in primo luogo, saggi di migrazione *in vitro*, dai quali è emersa la capacità del nucleotide UTP di potenziare la migrazione indotta dalla chemochina CXCL12 in cellule staminali CD34<sup>+</sup> (Fig. 1 e 2). Parallelamente, gli studi allestiti *in vivo* hanno evidenziato che l'*homing* midollare di cellule CD34<sup>+</sup> viene sensibilmente incrementato dal trattamento pre-infusione con UTP (Fig. 3). Inoltre, è interessante notare che sia i saggi *in vitro* che quelli *in vivo* concorrono a dimostrare che l'esposizione a questo nucleotide,



**Fig. 1** - Saggio di migrazione *in vitro* di cellule CD34<sup>+</sup> in risposta al nucleotide extracellulare UTP. L'UTP, quando utilizzato da solo, influenza solo leggermente il pattern di migrazione spontanea di cellule CD34<sup>+</sup>, ma aumenta in modo significativo la risposta chemiotattica al CXCL12 ( $p < 0,05$ ). Gli esperimenti con cellule CD34<sup>+</sup> pre-incubate con UTP per un'ora mostrano analoghe risposte migratorie (pannello A). Questi risultati sono stati confermati anche da saggi clonogenici allestiti con le cellule migrate (pannello B).



**Fig. 2** - Attività chemiotattica del nucleotide UTP. Il nucleotide extracellulare UTP mostra, quando utilizzato da solo, una modesta attività chemiotattica. Tuttavia, la combinazione di UTP e CXCL12 nel pozzetto inferiore aumenta significativamente la risposta migratoria di cellule CD34<sup>+</sup>, rispetto alla chemiotattica indotta dal solo CXCL12 (pannello A). Questi risultati sono stati confermati anche da saggi clonogenici allestiti con le cellule migrate (pannello B).



**Fig. 3** - Saggio di homing competitivo.

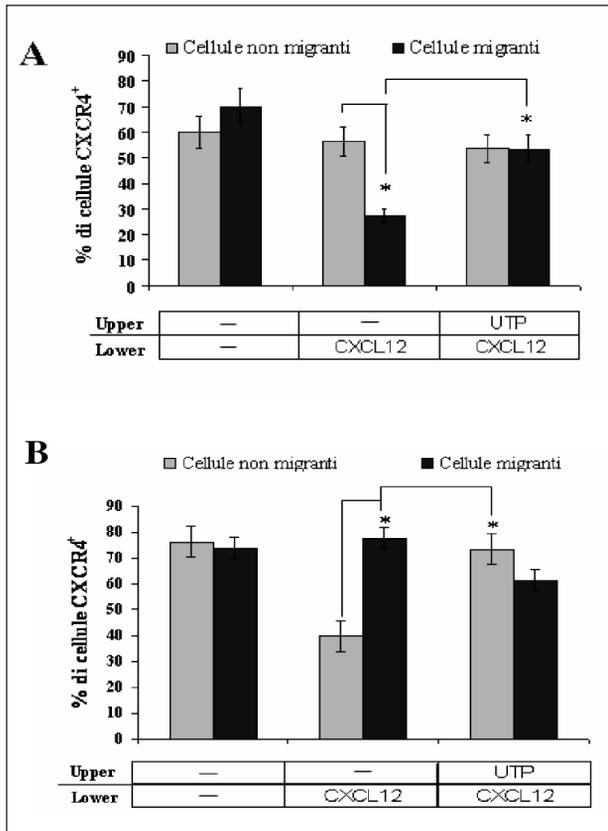
Topi NOD/SCID sono stati irradiati subletalmente e successivamente inoculati con cellule CD34<sup>+</sup> trattate con UTP e con cellule non stimulate (come descritto in dettaglio in Materiali e Metodi) e come schematizzato nel pannello A. I pannelli (B) e (C) mostrano la popolazione cellulare selezionata (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) dopo esclusione di cellule morte, piatrine e debris cellulari. (D) controllo negativo della marcatura. (E) Esempio rappresentativo del livello di fluorescenza di PKH in un campione di controllo. (F).

Esempio rappresentativo del livello di fluorescenza di PKH in un campione di BM, dopo inoculo di cellule trattate con UTP.

anche per brevi intervalli di tempo, è sufficiente per promuovere la motilità e la capacità di *homing* dei progenitori emopoietici. Questo dato è particolarmente interessante se si considera che l'emivita dei nucleotidi in ambiente extracellulare è, a causa dell'azione degradativa delle endonucleotidasi, molto breve. Nell'insieme, quanto emerge dai saggi di migrazione *in vitro* ed *in vivo* è che il nucleotide UTP esercita un effetto di *priming* sui progenitori emopoietici umani, potenziandone la risposta alla chemotassina CXCL12.

Tale azione potrebbe dipendere dalla capacità dell'UTP di modulare i livelli di espressione o di attività del recettore per il CXCL12, CXCR4. Sono stati quindi analizzati i livelli di espressione in membrana del recettore CXCR4 in una popolazione basale CD34<sup>+</sup>, stimolata con UTP per diversi intervalli di tempo; da questa analisi non è tuttavia emersa alcuna differenza significativa dei campioni trattati rispetto al controllo. Tuttavia, le analisi citofluorimetriche condotte separatamente su cellule migranti e non migranti (ottenute dai saggi di migrazione *in vitro*) suggeriscono che l'UTP possa influenzare le dinamiche farmacologiche del CXCR4, inibendone l'internalizzazione dopo legame con CXCL12 (Fig. 4). Inoltre, saggi di migrazione con il sistema *transwell*, hanno mostrato che l'inibizione dell'asse CXCL12/CXCR4 con anticorpi monoclonali anti-CXCR4 è in grado di bloccare anche l'effetto di promozione UTP-dipendente. Questo suggerisce, anche se con meccanismi non ancora elucidati, che l'effetto di *priming* dell'UTP si espliciti attraverso un potenziamento della cascata di trasduzione del segnale dipendente da CXCL12 e CXCR4.

Un altro aspetto di primaria importanza nel favorire l'*homing* midollare di cellu-



**Fig. 4** - Livelli di espressione in membrana (A) ed intracitoplasmatici (B) del recettore CXCR4 in cellule migranti e non migranti, in seguito a stimolazione con UTP e CXCL12.

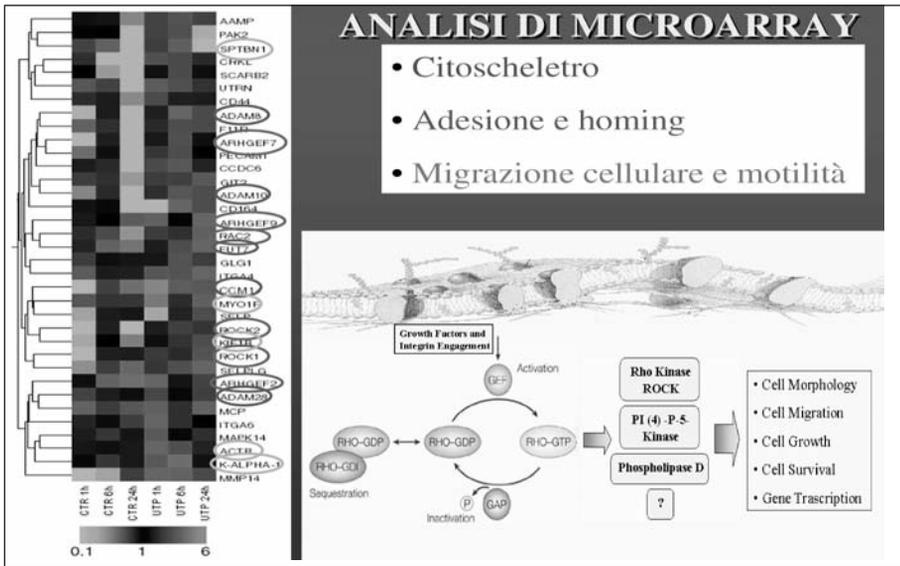
Le percentuali di espressione di cellule CXCR4+ sono state calcolate nelle popolazioni di cellule migranti e non-migranti. (A).

La popolazione di cellule migranti verso CXCL12 presenta una down-regulation dei livelli di espressione del recettore CXCR4, rispetto alle cellule non migranti.

Questa differenza si annulla quando l'UTP viene aggiunto al pozzetto superiore durante il saggio di migrazione.

(B) Mediante marcatura intracitoplasmatica del recettore CXCR4 è stato dimostrato che la down-regulation di questo recettore è conseguenza di fenomeni di internalizzazione, attivati dal legame con CXCL12. Tale processo di internalizzazione viene tuttavia inibito dalla stimolazione con UTP.

le staminali emopoietiche, riguarda la modulazione delle interazioni di adesione con il microambiente circostante, come suggerito dal modello di Peled e collaboratori (5). Infatti, testando la capacità di cellule staminali pre-incubate con UTP e ATP di aderire a piastre di coltura coattate con Fibronectina, abbiamo dimostrato che, almeno *in vitro*, l'UTP è in grado di incrementare in modo statisticamente significativo le proprietà adesive di cellule staminali emopoietiche umane. Simili risultati sono recentemente emersi dallo studio anche di altre molecole coinvolte nella migrazione di cellule staminali (come l'agente immunosoppressivo FTY720), il quale sinergizza l'azione del CXCL12, senza tuttavia influenzare il livello di espressione delle integrine. È inoltre interessante notare che le analisi di *microarray* condotte in questo studio hanno evidenziato dopo trattamento con UTP un significativo aumento nei livelli di trascrizione di geni associati a funzioni di adesione cellulare e noti come regolatori positivi dell'*homing* emopoietico. Tra questi geni emergono, in particolare, GLG1, RAC2, CD44, CD164 e SELPLG (Fig. 5). Tanto il CXCR4, quanto i recettori della famiglia P2Y appartengono al gruppo dei recettori a sette eliche transmembrana, associati a proteine G. Questa struttura recettoriale è caratteristica di numerosi recettori chemochinici, che condividono, oltre che un'analogia strutturale terziaria, anche simili cascate



**Fig. 5** - Analisi del profilo trascrizionale mediante microarray. La figura mostra i geni il cui profilo trascrizionale è modulato in modo significativo dal trattamento (per 24 ore) con UTP. I diversi geni sono raggruppati in base alla categoria Gene Ontology di appartenenza: Organizzazione del citoscheletro e biogenesi, motilità cellulare, trasduzione del segnale mediata da piccole GTPasi e trasduzione del segnale mediata da proteine Rho, adesione cellulare.

trasduzionali del segnale, che culminano nell'attivazione di risposte chemiotattiche. In particolare, diversi recettori accoppiati a proteine G trimeriche e i loro rispettivi ligandi, noti per il ruolo svolto nell'allestimento di risposte flogistiche ed immunitarie, sono recentemente emersi come mediatori chiave anche della migrazione e dell'*homing* di cellule staminali emopoietiche. Analogamente, il nostro studio indica che anche i nucleotidi extracellulari, già noti per essere coinvolti in processi infiammatori, potrebbero modulare fisiologicamente la migrazione di cellule staminali da, e verso, il midollo osseo.

Come riscontrato per altri recettori associati a proteine G trimeriche, anche la chemiotassi indotta da UTP può essere bloccata mediante la tossina derivata da *Burdetella Pertussis*. I saggi di inibizione condotti con tale tossina hanno mostrato che tanto la cascata trasduzionale del segnale dipendente da CXCL12, quanto quella attivata dai nucleotidi extracellulari richiedono il reclutamento funzionale di proteine G. Pertanto, le cellule staminali emopoietiche sembrano seguire dinamiche molecolari e funzionali simili a quelle già descritte in cellule terminalmente differenziate per migrare dal circolo periferico a siti extravascolari (come quelle osservate in leucociti attivati da stimoli flogistici). Inoltre, la capacità della tossina della Pertosse di inibire l'*homing* midollare e l'attecchimento a breve termine, bloccando un'ampia gamma di cascate del segnale, suggerisce che diverse molecole partecipino in modo cooperativo alla trasduzione di segnali di *homing*, che finiscono col convergere in vie dipendenti da proteine G (6-9). Anche lo studio più recente (4) sembra indicare nelle proteine G un plausibile punto di incon-

tro nelle vie di trasduzione di CXCL12 ed UTP, che agiscono in modo cooperativo nel modulare la migrazione di cellule staminali emopoietiche.

Inoltre, cellule staminali trattate con UTP mostrano un incremento significativo del tasso trascrizionale di numerosi geni coinvolti nella regolazione della motilità e delle strutture cellulari, coinvolte in processi di migrazione. In particolare, le proteine RhoGTPasi sono state recentemente descritte in diversi ambiti come mediatori primari di fenomeni chemotattici, in grado di influenzare la motilità e la polarità delle cellule, nonché i riarrangiamenti citoscheletrici e la polimerizzazione dei filamenti di actina. Membri della famiglia delle RhoGTPasi sono in particolare emersi come mediatori chiave della via di trasduzione del segnale attivata dall'interazione tra CXCL12 e CXCR4. Analogamente, il recettore per la sfingosina-1-fosfato (appartenente ad una nuova classe di recettori associati a proteine G), è stato recentemente dimostrato essere in grado di sinergizzare con l'asse CXCL12/CXCR4 proprio attraverso il reclutamento delle RhoGTPasi.

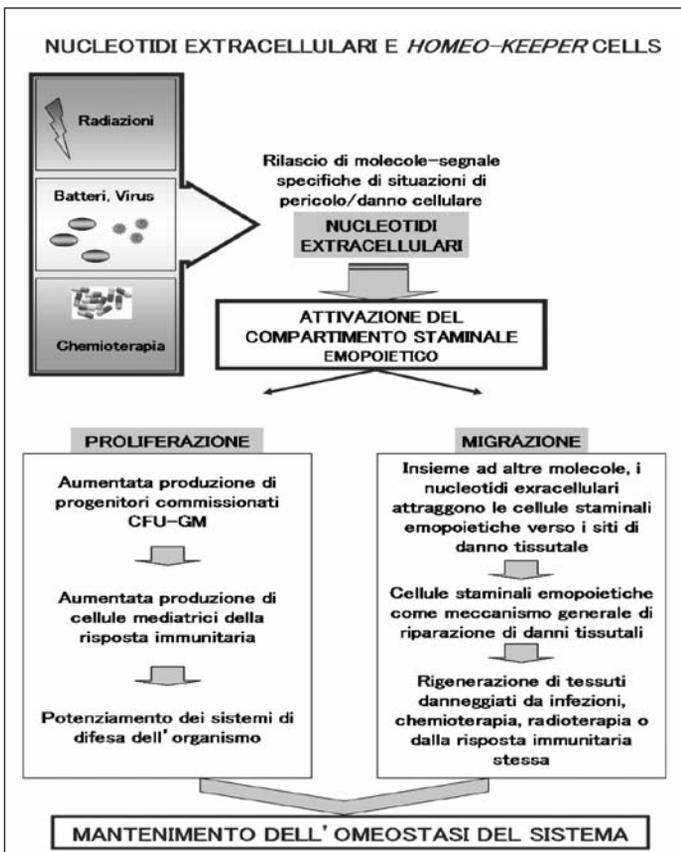
Per quanto riguarda i nucleotidi extracellulari, il trattamento con UTP è in grado di incrementare, in cellule staminali emopoietiche umane, il livello trascrizionale di geni codificanti per membri della famiglia delle RhoGTPasi (Rac2), così come di geni codificanti per proteine regolatorie di questa via (ARHGEF2, ARHGEF7 e ARHGEF9) o di effettori a valle (ROCK1 e ROCK2), mentre CXCL12 sembra in grado di aumentare preferenzialmente altri membri della stessa famiglia (quali CDC42 e CDC42BPA) (Fig. 5). Pertanto, l'attivazione combinata mediante UTP e CXCL12 produce il reclutamento simultaneo di diversi membri della stessa famiglia, inducendo presumibilmente un'attivazione sinergica di questa via di trasduzione del segnale chemotattico e, dal punto di vista funzionale, una complementarietà reciproca dei due recettori.

Inoltre, saggi *in vitro* di inibizione di tale via del segnale, eseguiti in presenza della Tossina B di *Clostridium Difficile* e dell'inibitore Y27632, conferma ulteriormente il ruolo chiave svolto dalle proteine RhoGTPasi nella migrazione verso un gradiente di CXCL12 di cellule staminali stimolate con UTP.

Da questi studi (3, 4) emerge pertanto che, così come la via di trasduzione dipendente dal CXCL12, anche la cascata del segnale attivata dai nucleotidi extracellulari richiede il reclutamento di membri della famiglia delle RhoGTPasi e di effettori ad essa correlati, la cui azione concertata produce l'attivazione di comportamenti migratori. Da questo emerge che l'attivazione di analoghe vie di segnalazione intracellulare, mediata dai nucleotidi extracellulari, potrebbe contribuire al potenziamento della risposta dipendente dal CXCL12.

Tali osservazioni sono in linea con quanto recentemente emerso nel campo della biologia della migrazione cellulare (10). È stato infatti dimostrato che numerose molecole di natura non-peptidica, come i leucotrieni ed altri mediatori lipidici, per citare solo gli esempi più rilevanti, sono coinvolti sia nell'allestimento di risposte flogistiche che nel reclutamento di cellule staminali emopoietiche verso la nicchia midollare. Come recentemente sottolineato da diversi studi nel campo, entrambi questi fenomeni, infiammazione ed *homing* di cellule staminali, si verificano simultaneamente *in vivo* nel microambiente midollare dopo esposizione a farmaci o agenti con effetti tossici sul DNA (10). Tra gli altri, il gruppo di Ponomaryov (11)

ha in particolare messo in luce come la capacità di cellule staminali umane di migrare verso il midollo osseo di topi NOD/SCID risulta significativamente aumentata quando le cellule vengono trapiantate nell'animale 24-48 ore dopo il trattamento che mio-/radio-terapici. In questa finestra temporale si raggiunge infatti il picco di secrezione di fattori che, come il CXCL12, sono in grado di promuovere la migrazione e la sopravvivenza cellulare. Come diretta conseguenza di tale fenomeno, l'aumentata secrezione di CXCL12 è in grado di aumentare l'*homing* e la sopravvivenza delle cellule staminali emopoietiche trapiantate. Per questo motivo, l'incremento di CXCL12 può essere visto come parte integrante del complesso insieme di risposte biologiche che, durante situazioni di pericolo e di danno tissutale, viene innescato come sistema di difesa per controbilanciare gli effetti indotti da trattamenti chemio-/radio-terapici e della conseguente morte cellulare. Analogamente a quanto visto per il CXCL12, anche i nucleotidi extracellulari vengono rilasciati da linfociti attivati, macrofagi e piastrine, così come da cellule necrotiche ed apoptotiche, e la loro concentrazione aumenta sensibilmente *in vivo* in situazioni di pericolo per l'organismo o di danno cellulare (12). I nucleotidi rilasciati agiscono poi come segnalatori stessi del pericolo e partecipano attivamente



**Fig. 6**  
Schema riassuntivo dell'ipotetico ruolo dei nucleotidi extracellulari come modulatori delle funzioni di homeo-keeper cells delle cellule staminali emopoietiche.

all'attivazione delle risposte flogistiche. Tali osservazioni, insieme alla già dimostrata capacità dell'UTP di espandere cellule staminali emopoietiche umane e alla presente prova della sua abilità di incrementarne anche l'*homing* midollare, supportano l'ipotesi che i nucleotidi extracellulari rilasciati durante situazioni di pericolo e/o danno cellulare possano attivare di vie di segnalazione paracrina o autocrina (parallelamente ad altre vie attivate da chemochine quali CXCL12), per il reclutamento e la stimolazione di cellule staminali emopoietiche (13, 14). È stato dimostrato che chemiotassine e molecole infiammatorie partecipano nel ricircolo e nel traffico migratorio di cellule staminali emopoietiche, non solo a livello midollare, ma anche verso altri tessuti. Inoltre, è emerso che il fattore chemiotattico CXCL12 non è secreto solo a livello midollare, ma anche in molti altri organi e tessuti (come cuore, rene, muscolo scheletrico e tessuto neuronale), dove si ritiene che possa giocare un ruolo chiave nel reclutamento di cellule staminali con potenziale rigenerativo. Un tale sistema riparativo/rigenerativo, come quello osservato in certi organismi primitivi, potrebbe quindi continuare ad esistere anche negli organismi superiori e potrebbe avere un ruolo biologicamente significativo nella riparazione di danni tissutali di piccola entità (e, quindi, clinicamente silenti), contribuendo in tal modo al mantenimento dell'omeostasi del sistema.

Alla luce di queste considerazioni, è nostra opinione che i nucleotidi extracellulari possano agire, non solo come segnali di pericolo, ma agendo su compartimenti come quello staminali emopoietico, anche come promotori dell'omeostasi dell'organismo in generale. Secondo il modello da noi teorizzato, segnali di pericolo (come radiazioni, infezioni o insulti chimici) contribuirebbero al rilascio di nucleotidi extracellulari, i quali, attraverso l'attivazione dei recettori P2, attiverebbero il compartimento ematopoietico (Fig. 6). Le cellule staminali, nella veste di "*homeo-keeper cells*", potrebbero contribuire ad arginare questa situazione di pericolo, secondo due vie principali:

- 1) promuovendo la proliferazione ed espansione del compartimento di progenitori commissionati (CFU-GM), con conseguente aumentata produzione di cellule mature, mediatrici di risposte flogistiche ed immunitarie, e potenziamento dei sistemi di difesa dell'organismo (15);
- 2) attivando, in concerto con altre chemiotossine (come il CXCL12), la migrazione di cellule staminali emopoietiche, indirizzandole verso siti di danno tissutale, dove potrebbero partecipare a meccanismi di riparazione e rigenerazione tissutale.

L'integrazione di queste risposte contribuirebbe, infine, al mantenimento delle condizioni omeostatiche dell'organismo. Parallelamente, questa visione dei nucleotidi extracellulari come mediatori di risposte omeostatiche, contribuirebbe a spiegare anche l'azione bivalente che queste molecole hanno sul sistema immunitario, nell'ambito del quale agiscono sia come molecole pro-, che anti-infiammatorie. Nell'insieme, questi risultati aggiungono un ulteriore tassello alla biologia dei nucleotidi extracellulari, suggerendo che queste molecole possano giocare un ruolo chiave nel *milieu* citochinico, coinvolto nella regolazione del traffico di cellule staminali in situazioni sia fisiologiche, che patologiche.

## Bibliografia

1. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. 2001; 97: 587-600.
2. Lee BC, Cheng T, Adams G, et al. P2Y-like receptor, GPR105 (P2Y<sub>14</sub>), identifies and mediates chemotaxis of bone marrow hematopoietic stem cells. *Genes and Development*. 2003; 17: 1592-1604.
3. Lemoli RM, Ferrari D, Fogli M, et al. Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo. *Blood*. 2004; 104: 1662-1670.
4. Rossi L, Manfredini R, Bertolini F, et al. The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration. *Blood*. 2007; 109: 533-542.
5. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34<sup>+</sup> cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*. 2000; 95: 3289-3296.
6. Kimura T, Boehmler AM, Seitz G, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34<sup>+</sup> progenitor cells. *Blood*. 2004; 103: 4478-4486.
7. Bonig H, Priestley GV, Nilsson LM, Jiang Y, Papayannopoulou T. PTX-sensitive signals in bone marrow homing of fetal and adult hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2004; 104: 2299-2306.
8. Papayannopoulou T, Priestley GV, Bonig H, Nakamoto B. The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003; 101: 4739-4747.
9. Bautz F, Denzlinge C, Kanz L, Moehle R. Chemotaxis and transendothelial migration of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells induced by inflammatory mediator leukotriene D4 are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1. *Blood*. 2001; 97: 3433-3440.
10. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005; 106: 1901-10.
11. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest*. 2000; 106: 1331-1339.
12. La Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leuk Biol*. 2003; 73: 339-343.
13. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Bone marrow as a source of circulating CXCR4<sup>+</sup> tissue-committed stem cells. *Biol. Cell*. 2005; 97: 133-146.
14. Juarez J, Bendall L. SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis. *Histol Histopathol*. 2004 Jan; 19(1): 299-309.
15. Ferrari D, La Sala A, Chiozzi P, et al. The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *FASEB J*. 2000; 14: 2466-2476.

## Impiego di cellule staminali del midollo osseo e del tessuto adiposo per la ricostruzione ossea

Francesco Benazzo, G. Gastaldi, M. G. Cusella De Angelis, G. Magenes, L. Visai, E. Saino, L. Fassina

Clinica Ortopedica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Centro Interdipartimentale di Ingegneria Tissutale (CTI), Università di Pavia

Il corpo umano possiede una notevole capacità di rigenerazione. Cellule come quelle del tessuto emopoietico o epiteliale si dividono rapidamente e continuamente per tutta la durata della vita. Tuttavia, nella gran parte dei tessuti, questa possibilità è estremamente ridotta o limitata a particolari condizioni. In linea di massima si può affermare che quanto più un tessuto è specializzato, tanto più le cellule che lo compongono hanno subito un processo di differenziazione, perdendo parallelamente, del tutto o parzialmente, la loro capacità di rinnovarsi. Questo quadro è valido allo stesso modo per l'osso e per gli altri tessuti mineralizzati presenti nell'organismo (1): fratture che non comportino perdite di sostanza nell'osso, possono essere riparate da cellule residenti nei tessuti stessi. Le capacità rigenerative di questi tessuti, tuttavia, non riescono a fronteggiare patologie che comportino deficienze quali-quantitative maggiori, ove cioè il difetto si accompagni ad un deficit di elementi cellulari (2, 3). Un'alternativa valida ci viene dall'ingegneria tissutale ossea, intesa come il complesso di tecnologie biomediche in grado oggi di fornire tessuti mineralizzati. Tali metodiche potrebbero essere sfruttate in chirurgia ortopedica ed oro-maxillo-facciale per la rigenerazione ossea (4, 5). Nuovo impulso all'ingegneria tissutale è venuto negli ultimi anni dallo studio delle cellule staminali (6), cellule dotate della capacità di andare incontro ad illimitate divisioni cellulari (il cosiddetto "self-renewing") ed allo stesso tempo di differenziarsi verso uno o più citotipi. La cellula staminale per eccellenza è lo zigote e, più in generale, le cellule della blastocisti protagoniste delle prime fasi dell'embriogenesi. Problematiche tecniche, etiche e legali ci impongono di scartare linee di ricerca su di esse. Naturalmente, quanto più avanti si procede nelle fasi di sviluppo embrionale, fetale e quindi post-natale o adulto, tanto più il numero delle cellule staminali diventerà minore e parallelamente diminuiranno le loro capacità. Si passa dalla *totipotenza* delle cellule blastocistiche (la capacità di dare origine a tutti i tipi cellulari), alla *pluripotenza* delle cellule del tardo periodo embrionale (la capacità di dare origine a quasi tutti i citotipi, anche quelli di diversa origine embriologica rispetto al tessuto in cui la cellu-

la staminale sia stata reperita), alla *multipotenza* delle cellule fetali e adulte (la capacità di dare origine solo a citotipi che abbiano la stessa origine embriologica del tessuto in cui la staminale sia stata reperita), tra cui sostanzialmente non vi sono grandi differenze, essendo i tessuti di un organismo in massima parte definitivamente sviluppati all'inizio del periodo fetale. Secondo lo stesso iter, dalla cellula staminale embrionale a quella adulta, aumenteranno le difficoltà tecniche perché questa sia identificata e isolata. Tuttavia, come anzidetto, anche nell'organismo post-natale esistono cellule che possono essere definite staminali, fisiologicamente coinvolte nei processi di omeostasi e nella riparazione cellulare. Fino ad oggi questo gruppo di cellule veniva adoperato solo nei trapianti di midollo osseo per la cura di malattie della linea ematologica.

Recenti scoperte hanno rivelato capacità sorprendenti di queste cellule, denominate *Adult Stem Cells* (ASCs), e dette capacità sono individuabili sostanzialmente in una multipotenzialità differenziativa (7). Per lungo tempo si è ritenuto infatti che le ASCs potessero dar luogo ad un numero ristretto di tipi cellulari: ciò vuol dire che si pensava che da una cellula staminale del tessuto emopoietico si potessero ottenere solo cellule della linea emopoietica. Oggi vi sono evidenze scientifiche che queste ultime cellule, situate all'interno del midollo osseo, sottoposte a particolari segnali, possano differenziarsi anche in miociti o cellule simil neuronali (8, 9). All'interno del midollo osseo un'altra possibilità ci viene offerta dalle *cellule stromali*, che *in vitro* proliferano e danno origine ad una popolazione di cellule aderenti non ematopoietiche che prendono il nome di *cellule stromali del midollo osseo* (*Bone Marrow Stromal Cells*, BMSCs) (10). All'interno di questa popolazione eterogenea esiste un particolare sottogruppo cellulare di cellule staminali mesenchimali (MSCs) o cellule staminali scheletriche (SSCs), in grado, in coltura, di andare incontro ad un numero illimitato di divisioni cellulari. Una volta reimpiantate *in vivo*, in modelli sperimentali, queste cellule sono in grado di differenziarsi in tutti i citotipi riscontrabili nell'osso adulto quali l'osteoblasta, il condroblasta, fino allo stesso adipocita ed a cellule simil-fibroblastiche stromali di supporto per l'ematopoiesi (11-13). La ricerca fino ad ora svolta ha messo l'accento sulla capacità delle BMSCs di differenziarsi in osteoblasti, pur conservando una multipotenzialità differenziativa (14-16). In questa chiave, cellule ottenute tramite espansione clonale *ex vivo* di stroma midollare potrebbero fornire un numero illimitato di progenitori cellulari ossei, in grado di promuovere la riparazione o la rigenerazione di difetti scheletrici una volta reimpiantate all'interno dello stesso organismo donatore (3). Fino ad oggi le BMSCs hanno rappresentato l'unico citotipo di ASCs utilizzato in modelli sperimentali per il "Bone Tissue Engineering" o ingegneria del tessuto osseo (6).

### **Ingegneria del tessuto osseo mediante cellule staminali del midollo osseo e stimoli chimico-fisici**

Le capacità rigenerative dell'osso, fisiologicamente, sono alquanto limitate. Il tessuto osseo è infatti in grado di riparare solo difetti che non comportino la diastasi dei frammenti per più di 5 mm, ma non riesce a fronteggiare patologie che

comportino deficienze scheletriche come malformazioni, postumi di gravi infezioni, traumi o deformità scheletriche, patologie ossee congenite, nelle quali si ha una notevole perdita di sostanza ossea. Talvolta una rigenerazione fisiologica del tessuto è teoricamente possibile, ma prevede tempi estremamente lunghi e invalidanti, a causa della scarsità di elementi cellulari in grado di proliferare e deporre matrice calcificata. La stessa chirurgia demolitiva post-oncologica pone seri problemi nel momento della sostituzione della quota di osso asportata. Le attuali tecniche che prevedono il trapianto di osso autologo, omologo o eterologo, ovvero l'impianto di materiali alloplastici, portano ognuna con sé delle controindicazioni che ne pregiudicano talora l'impiego: scarsità o inadeguatezza del sito donatore, rigetto da parte dei tessuti dell'ospite, possibile trasmissione di patogeni (18). Prerogativa fondamentale per tutti i tipi di innesto è un'adeguata vascolarizzazione: l'osso *in vivo* infatti è un tessuto riccamente vascolarizzato poiché la sua matrice extracellulare calcificata impedisce gli scambi metabolici per semplice diffusione. Il processo di vascolarizzazione o rivascolarizzazione tuttavia non è dovuto solamente alle condizioni della rete vasale del sito accettore, ma anche e soprattutto ad una "disponibilità" dell'innesto ad essere invaso da elementi neoangiogenetici o in alcuni casi a fornirli esso stesso.

Naturalmente la soluzione ideale è rappresentata dall'osso autologo, in cui lo stesso soggetto sia donatore ed accettore allo stesso tempo. Come si può immaginare, questa soluzione è destinata a piccoli difetti, difetti il cui volume possa essere rimpiazzato da tessuto osseo rintracciato nell'organismo in una sede alternativa, senza tuttavia indebolire in maniera eccessiva quest'ultima. Bisogna poi considerare i postumi ed i disagi arrecati al paziente durante due diversi interventi effettuati l'uno per il prelievo e l'altro per la messa *in situ* dell'innesto. Il volume dell'innesto, infine, non può superare le dimensioni di pochi millimetri cubi, pena la mancata guarigione e la necrosi dei tessuti a causa di un'insufficiente rivascolarizzazione.

L'innesto di osso autologo si configura quindi come una procedura riservata a difetti lievi, nonché dispendiosa sotto il profilo biologico ed economico. L'innesto di osso omologo/allogenico, con osso prelevato cioè da un donatore che appartenga alla stessa specie dell'accettore (solitamente un cadavere), non ha trovato mai grande spazio nel panorama chirurgico, a causa della difficile gestione dall'espianto, della conservazione e del trasporto, del trapianto di tessuto osseo. In primis vi è infatti da considerare l'ostacolo tutt'altro che semplice della compatibilità antigenica, che porterebbe in ogni caso il paziente verso una terapia con immunosoppressori e relativi effetti collaterali.

Questo problema può essere eliminato sottoponendo l'innesto al congelamento o a trattamenti con radiazioni o sostanze chimiche, ma non bisogna dimenticare che con la conseguente morte cellulare perderemo ogni capacità osteogenetica. In secundis vi è la possibilità di trasmissione di patogeni, problema che potrebbe essere risolto con i trattamenti sopracitati a proposito della compatibilità antigenica, ma con le medesime conseguenze. Per quanto riguarda il rapporto tra volume del trapianto e i processi di guarigione, l'innesto omologo/allogenico presenta gli stessi problemi già visti per l'innesto autologo.

L'innesto eterologo, che individua il donatore in un organismo appartenente a specie diversa dall'accettore, prevede di fatto l'utilizzo di osso irradiato e deproteizzato che in fin dei conti avrà perso ogni capacità osteoinduttiva e osteogenetica, mantenendo solo quella osteoconduttiva, che talvolta risulterà deficitaria venendo i frammenti dell'innesto incapsulati in una matrice fibrosa.

I materiali alloplastici, infine, hanno il ruolo di semplici mantenitori di spazio e come guida per la proliferazione e il differenziamento cellulare, la cosiddetta osteoconduttività, non avendo alcuna capacità osteogenetica né osteoinduttiva, sebbene da qualche tempo siano utilizzati come mezzo di delivery di fattori osteoinduttivi, come le proteine morfogenetiche dell'osso (BMP) (19, 21-24). Questi materiali possono essere riassorbibili, come i polimeri a base di acido lattico e glicolico, e non riassorbibili, come l'idrossiapatite. Nella loro struttura inoltre possono essere inseriti complessi oligo-amminoacidici tali da mimare molecole naturali di ancoraggio delle cellule alla matrice connettivale. I materiali riassorbibili essi si ripropongono di "ritirarsi", digeriti dal metabolismo cellulare, dopo che la loro trama sia stata invasa da elementi cellulari osteogenici.

Un'alternativa valida alle metodiche chirurgiche che prevedono l'utilizzo di innesti ossei ci viene dall'*ingegneria tissutale* che oggi è in grado di fornire tessuti mineralizzati. Il protocollo terapeutico ipotizzato si fonda sull'utilizzo di cellule staminali prelevate dal soggetto stesso in cui tali cellule verranno reimpiantate successivamente. Siffatta terapia potrebbe essere sfruttata in chirurgia ortopedica per la rigenerazione ossea.

Nell'organismo post-natale le ASCs (*Adult Stem Cells*) finora utilizzate sono state le cellule stromali del midollo osseo (*Bone Marrow Stromal Cells*, BMSCs), popolazione eterogenea, di cui un particolare sottogruppo, le cellule staminali mesenchimali (MSCs) o cellule staminali scheletriche (SSCs), sono in grado, in coltura, di andare incontro ad un numero illimitato di divisioni cellulari. Una volta reimpiantate *in vivo*, in modelli sperimentali, queste cellule sono in grado di differenziarsi in osteoblasta, la cellula che è responsabile della formazione del tessuto osseo.

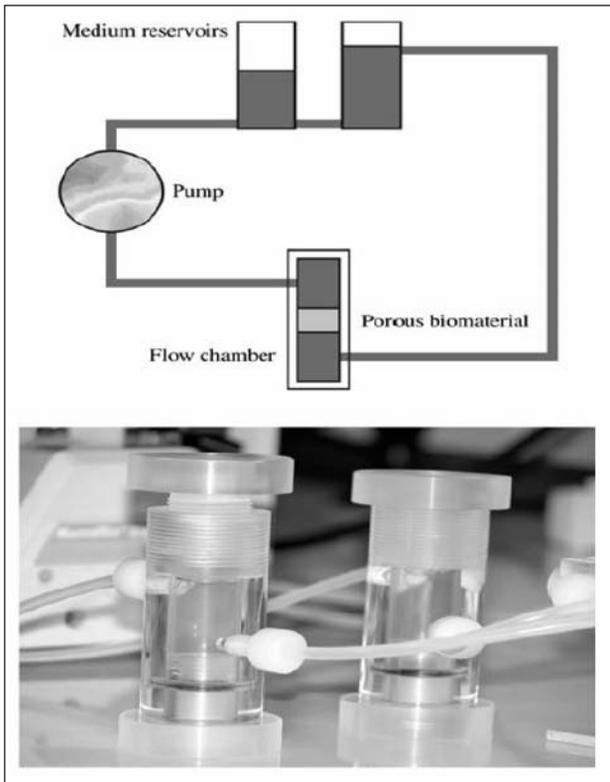
In questa chiave, cellule ottenute tramite espansione clonale *ex vivo* di stroma midollare, potrebbero fornire un numero illimitato di progenitori cellulari ossei, in grado di promuovere la riparazione o la rigenerazione di difetti scheletrici, una volta reimpiantate all'interno dello stesso organismo donatore.

La produzione di osso da parte delle cellule staminali stromali, tuttavia, necessita della presenza di un'intelaiatura organizzata tridimensionale (*biomateriali tridimensionali*) (18) alla quale le cellule staminali possano aderire e proliferare inizialmente *in vitro* e che le sostenga *in vivo* per un periodo abbastanza lungo per assicurare la differenziazione e quindi l'osteogenesi. Fino ad oggi si è evidenziato che l'osteogenesi da parte delle cellule staminali in coltura non procede nell'organismo donatore senza un veicolo che le sostenga come un'impalcatura (*scaffold o biomateriale tridimensionale*) per un tempo sufficiente a favorire la vascolarizzazione di queste cellule e sostenerle poi durante le fasi di differenziazione (6, 10, 18). Numerosi studi hanno segnalato infatti che l'osteogenesi non procede quando la sospensione di cellule staminali è iniettata semplicemente nel

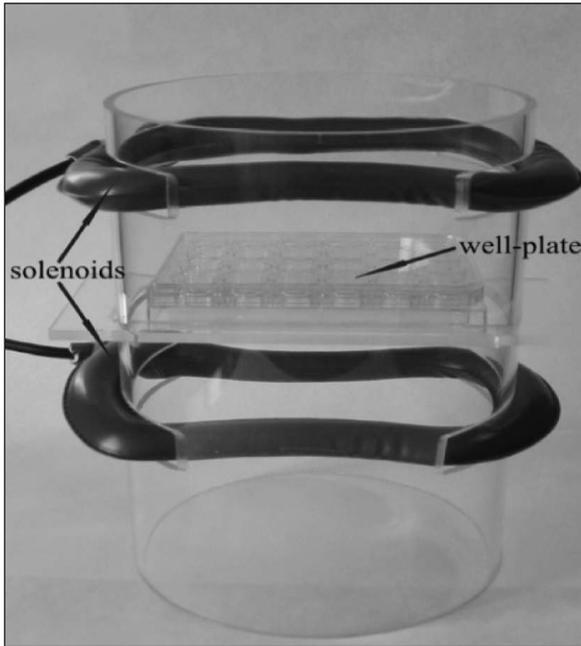
sottocute come sospensione cellulare o quando è legata ad un veicolo rapidamente riassorbito dall'organismo ospite (19).

Inoltre la forma tridimensionale di questa intelaiatura corrisponderà alla forma finale del tessuto osseo di nuova formazione, quello che possiamo cioè definire "shape addressing". Un altro punto fondamentale della ricerca è l'identificazione dei fattori differenziativi che potrebbero "spingere" le cellule staminali verso un loro differenziamento in senso osteogenico, attivando o inducendo geni specifici. Tali fattori sono numerosi ed eterogenei e al momento non è stata chiarita l'esatta sequenza in cui questi fattori agirebbero, per cui appare necessario oggi valutare tra questi quali abbiano effettiva capacità di stimolazione alla proliferazione ed alla differenziazione. Ciò renderebbe anche possibile un impiego più ampio non solo in campo sperimentale ma anche in campo clinico. I fattori maggiormente impiegati sono:

- BMP o proteine morfogenetiche dell'osso, in grado di legarsi a specifici recettori di membrane e tramite cascate enzimatiche promuovere la formazione di precursori osteoblastici da elementi indifferenziati. Tra le BMP le più utilizzate oggi in questo campo sono la 2, la 4 e la 7 (25, 26, 28).
- Stimoli meccanici quali lo sforzo di taglio (30) (Fig. 1) e gli ultrasuoni (31).
- Stimoli elettromagnetici (32) (Fig. 2).



**Fig. 1** - FBioreattore a perfusione per l'ingegneria del tessuto osseo (30).



**Fig. 2** - Bioreattore elettromagnetico per l'ingegneria del tessuto osseo (32).

In definitiva, quindi, i tre elementi fondamentali senza di cui non vi può essere formazione di tessuto osseo sia *in vitro* che *in vivo* sono: l'OSTEOGENESI, di pertinenza degli elementi cellulari, l'OSTEOINDUZIONE, da ascrivere a fattori diversi ed eterogenei di origine extra e intracellulare e l'OSTEOCONDUZIONE, da ricercare nella matrice extracellulare, sia essa naturale o artificiale.

L'ingegneria tissutale ossea ci offre, infine, una chance nella correzione dei difetti ossei non solo da un punto di vista quantitativo, inteso come un deficit volumetrico, ma anche qualitativo, un difetto cioè che risieda all'interno della cellula stessa, l'osteoblasta, responsabile della formazione del tessuto.

Dopo il prelievo del midollo osseo e la separazione delle cellule staminali, queste vengono fatte proliferare *in vivo*: se il difetto alla base della patologia è solo di tipo "quantitativo", inteso come un deficit osseo volumetrico, le cellule non subiranno alcun intervento particolare; nel caso più complesso di patologie a base genetica come l'*osteogenesi imperfecta*, la letteratura testimonia la possibilità di modificare il genoma di queste cellule, "spegnendo" o "accedendo" alcuni geni difettivi nell'organismo donatore e, dopo adeguata proliferazione, reimpiantare queste cellule in cui l'originale difetto genico alla base della patologia sia stato corretto (3, 6).

## Bibliografia

1. Erickson CA, Reedy MV. Neural crest development: the interplay between morphogenesis and cell differentiation; *Curr. Top. Dev. Biol.* 1998; 40: 177.

2. Bianco P, Kuznetsov SA, Riminucci M, Fisher LW, Spiegel AM, Robey PG. Reproduction of human fibrous Dysplasia of bone in immunocompromise by transplanted mosaics of normal and Gsalpha-mutated skeletal progenitor cells. *J Clin Inv.* 1998; 101: 1737-44.
3. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman S, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow derived mesenchymal cells in children with Osteogenesis Imperfecta. *Nature Med.* 1999; 6: 1282-86.
4. Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban L and Troulis MJ. Formation of a mandibular condyle in vitro by tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61: 94-100.
5. Chen F, Mao T, Tao K, Chen S, Ding G, Gu X. Bone graft in the shape of human mandibular condyle reconstruction via seeding marrow-derived osteoblasts into porous coral in a nude mice model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60: 1155-59.
6. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature.* 2001; 414: 118-21.
7. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284: 143-147.
8. LaBonne C, and Bronner-Fraser M. Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999; 15: 81.
9. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 3908.
10. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cells.* 2001 19(3): 180-92.
11. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio G. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998; 279: 1528.
12. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science.* 1999; 283: 534.
13. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003; 116: 1827-35.
14. Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson CR, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco MG, Cossu G, Vescovi AL. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci.* 1998; 3: 986.
15. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.* 1994; 1: 71.

16. Ducy P, Schinke T and Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 2000; 289: 1501.
17. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364(9429): 149-55.
18. Hutmacher DW. Scaffolds in Tissue engineering bone and cartilage; *Biomaterials*. 2002; 21: 2529-43.
19. Mankani MH, Kresbach PH, Satomura K, Kuznetsov SA, Hoyt R, Robey PG. Pedicle bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. *Arch Surg*. 2001; 136: 263-70.
20. Terese Winslow eds; *Stem cells: Scientific progress and future research directions*; NIH-Department of Health and Human Services June 2001.
21. Saito N, Okada T, Horiuchi H, Murakami N, Takahashi J, Nawata M, Ota H, Nozaki K and Takaoka K. A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. *Nature Biotechnology*. 2001, 19: 332-335.
22. Laurencin CT, Attawia MA, Lu LQ, Borden MD, Lu HH, Gorum WJ, Lieberman JR. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration; *Biomaterials*. 2001 22:1271-1277.
23. Saito N, Okada T, Horiuchi H, Ota H, Takahashi J, Murakami N, Nawata M, Kojima S, Nozaki K and Takaoka K. Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers; *Bone*. 2003; 32: 381-386.
24. Murakami N, Saito N, Takahashi J, Ota H, Horiuchi H, Nawata M, Okada T, Nozaki K, Takaoka K. Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in a combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier. *Biomaterials*. 2003; 24: 2153-2159.
25. Nakashima M. Induction of Dentin Formation on Canine Amputated Pulp by recombinant Human Bone Morphogenetic Proteins (BMP)-2 and -4; *J Dent Res*. 1994 73(9): 1515-1522.
26. van den Dolder J, de Ruijter AJE, Spauwen PHM, Jansen JA. Observation on the effect of BMP-2 on rat bone marrow cells cultured on titanium substrates of different roughness. *Biomaterials*. 2003; 24: 1853-1860.
27. Kim S, Koga T, Isobe M, Kern BE, Yokochi T, Chin YE, Karsenty G, Taniguchi T and Takayanagi H. Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation. *Genes & Development*. 2003; 17: 2153-2159.
28. Larrain J, et al. BMP-binding modules in a chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Development*. 2000 127: 821-830.
29. Ishaug-Riley S, Crane-Kuger G, Yaszemski MJ, Mikos AG. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*. 1998; 19: 1405-1412.
30. Fassina L, Visai L, Asti L, Benazzo F, Speziale P, Tanzi MC, Magenes G. "Calcified matrix production by SAOS-2 cells inside a polyurethane porous

- scaffold, using a perfusion bioreactor”, *Tissue Engineering*, May-June 2005; 11(5-6): 685-700.
31. Fassina L, Saino E, Sbarra MS, Visai L, Cusella De Angelis MG, Mazzini G, Benazzo F, Magenes G. “Ultrasonic and electromagnetic enhancement of a culture of human SAOS-2 osteoblasts seeded onto a titanium plasma-spray surface”, *Tissue Engineering*, 2009; IN PRESS.
  32. Fassina L, Visai L, Benazzo F, Benedetti L, Calligaro A, Cusella De Angelis MG, Farina A, Maliardi V, Magenes G. “Effects of electromagnetic stimulation on calcified matrix production by SAOS-2 cells over a polyurethane porous scaffold”, *Tissue Engineering*, July 2006; 12(7): 1985-1999.

## **Le norme di buona fabbricazione per l'impiego di cellule staminali a scopo terapeutico**

*Paolo Rebullà, Rosaria Giordano, Francesca Chelli, Valentina Parazzi*

Dipartimento di Medicina Rigenerativa, Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

### **Introduzione**

Gli ultimi anni hanno visto una rapida evoluzione delle norme che regolano l'impiego di cellule staminali a scopo terapeutico. Il sito dell'AIFA riporta sinteticamente tale evoluzione ([www.agenziafarmaco.it/TERAPIE\\_CELLULARI](http://www.agenziafarmaco.it/TERAPIE_CELLULARI)), con lo scopo di fornire un aggiornamento sugli aspetti regolatori dei prodotti medicinali per terapia cellulare somatica.

Il 7 gennaio 2009 il sito AIFA riportava diversi documenti, suddivisi in tre categorie: normative nazionali, normative internazionali e linee guida. Di seguito sono riportati i titoli delle normative nazionali e internazionali. Una breve descrizione del contenuto di ogni documento è riportata al sito dell'AIFA.

### **Normative Nazionali**

1. Decreto Legislativo 24 aprile 2006 n. 219. Attuazione della direttiva 2001/83/CE (e successive direttive di modifica) relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE
2. Decreto del Presidente della Repubblica n. 439 del 21 settembre 2001 Regolamento di semplificazione delle procedure per la verifica e il controllo di nuovi sistemi e protocolli terapeutici sperimentali.
3. Decreto 26 aprile 2002. Accertamento della composizione e innocuità dei farmaci di nuova istituzione prima della sperimentazione clinica sull'uomo. Individuazione della documentazione da sottoporre all'Istituto superiore di sanità ai sensi dell'art. 4, comma 2, del decreto del Presidente della Repubblica 21 settembre 2001, n. 439.
4. Decreto legislativo 24 giugno 2003, n. 211. Attuazione della direttiva 2001/20/CE relativa all'applicazione della buona pratica clinica nell'esecuzione delle sperimentazioni cliniche di medicinali per uso clinico.

5. Decreto legislativo 6 novembre 2007 n. 200. “Attuazione della direttiva 2005/28/CE recante principi e linee guida dettagliate per la buona pratica clinica relativa ai medicinali in fase di sperimentazione a uso umano, nonché requisiti per l’autorizzazione alla fabbricazione o importazione di tali medicinali”
6. Decreto Legislativo 24 aprile 2006 n. 219. Attuazione della direttiva 2001/83/CE (e successive direttive di modifica) relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE
7. Decreto 18 marzo 1996. Modalità per la vigilanza sulle officine di produzione, centri di saggio e di sperimentazione (area dei farmaci)
8. Decreto 2 marzo 2004. Istituzione di una banca dati per il monitoraggio della terapia genica e la terapia cellulare somatica
9. Decreto 5 dicembre 2006. Utilizzazione di medicinali per terapia genica e per terapia cellulare somatica al di fuori di sperimentazioni cliniche e norme transitorie per la produzione di detti medicinali
10. Determinazione 21 giugno 2007. Individuazione degli impieghi di medicinali per terapia cellulare somatica considerati clinicamente e scintificamente consolidati.
11. Determinazione 6 agosto 2007. Rettifica della determinazione 21 giugno 2007, relativa alla individuazione degli impieghi di medicinali per terapia cellulare somatica considerati clinicamente e scientificamente consolidati.
12. Decreto legislativo 6 novembre 2007 n. 191. “Attuazione della direttiva 2004/23/CE sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l’approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e di cellule”
13. Decreto 18 Dicembre 2007. “Proroga dell’autorizzazione alla produzione di medicinali per terapia genica e cellulare somatica di cui al decreto 5 dicembre 2006”
14. Comunicato relativo ai requisiti di qualità farmaceutica per la produzione di prodotti per terapia cellulare somatica già consolidati nella pratica clinica approvati dall’ISS
15. Decreto 24 dicembre 2008. “Proroga dell’autorizzazione alla produzione di medicinali per terapia genica e cellulare somatica di cui al decreto 5 dicembre 2006”

### **Normative Internazionali**

DIRETTIVA 2001/83/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 6 novembre 2001 recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano

DIRETTIVA 2003/63/CE DELLA COMMISSIONE del 25 giugno 2003 che modifica la direttiva 2001/83/CE del Parlamento europeo e del Consiglio recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano

DIRETTIVA 2003/94/CE DELLA COMMISSIONE dell’8 ottobre 2003 che sta-

bilisce i principi e le linee direttrici delle buone prassi di fabbricazione relative ai medicinali per uso umano e ai medicinali per uso umano in fase di sperimentazione

DIRETTIVA 2004/23/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 31 marzo 2004 sulla definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani

DIRETTIVA 2006/17/CE DELLA COMMISSIONE dell'8 febbraio 2006 che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda determinate prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani

DIRETTIVA 2006/86/CE DELLA COMMISSIONE del 24 ottobre 2006 che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani

REGOLAMENTO (CE) N. 1394/2007 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 13 novembre 2007 sui medicinali per terapie avanzate recante modifica della direttiva 2001/83/CE e del regolamento (CE) n. 726/2004 (applicabile dal 30 dicembre 2008).

### **Allestimento della Cell Factory 'Franco Calori' del Policlinico di Milano**

La Cell Factory 'Franco Calori' della Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena di Milano è un laboratorio sterile in cui vengono coltivate cellule umane a scopo di trapianto da parte di personale dedicato, specificamente formato secondo le norme di buona fabbricazione (Good Manufacturing Practices, GMP). La costruzione della Cell Factory ha avuto avvio alla fine degli anni Novanta, contemporaneamente alle prime importanti scoperte sulle potenzialità terapeutiche delle cellule staminali, quando risultò evidente che le semplici metodiche di frazionamento del sangue utilizzate nei centri trasfusionali e nelle banche del sangue placentare non erano idonee a garantire la sicurezza di manipolazioni complesse e prolungate di particolari stipiti cellulari, come le cellule staminali. Per questo tipo di manipolazioni, è stata quindi identificata la necessità di costruire ambienti tecnologicamente sofisticati e totalmente dedicati a questo tipo di lavorazione, da eseguirsi con modalità analoghe alla produzione farmaceutica (1).

La formazione sul campo (il cosiddetto '*training-on-the job*') costituiva ha rappresentato la strategia più efficace per sviluppare all'interno dell'Ospedale una struttura certificata secondo le norme GMP. Dal momento che nessun ospedale pubblico italiano possedeva allora all'avvio della Cell Factory una struttura GMP, all'inizio del programma un medico specialista in ematologia clinica e di laboratorio e con esperienza clinica nell'ambito del trapianto di cellule emopoietiche ha seguito un corso di formazione presso il Cell Processing Laboratory del National Institute of Health di Bethesda (USA). Accanto al significativo beneficio di natu-

ra professionale, la certificazione conseguita dal medico negli Stati Uniti è stata successivamente utile per l'acquisizione formale, in Italia, della idoneità a Direttore Tecnico di officina farmaceutica secondo il D.Lvo 219. Tale certificazione viene rilasciata in Italia dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA).

Parallelamente all'acquisizione delle necessarie professionalità, è stato avviato il progetto di costruzione della Cell Factory. Lo spazio disponibile comprendeva un'area di circa 80 m<sup>2</sup> situata all'ultimo piano del Padiglione Marangoni, un edificio la cui struttura iniziale risale al XVII secolo e nel quale sono presenti importanti vincoli architettonici. Il progetto iniziale consisteva nella realizzazione di due camere sterili. La realizzazione della Cell Factory ha richiesto il superamento di alcune difficoltà di carattere tecnico, derivanti principalmente dallo spazio ristretto e dai vincoli architettonici. Nonostante tali difficoltà, era comunque necessario definire una corretta disposizione dei laboratori così da garantire che le cappe a flusso laminare in cui si manipolano le cellule (che presentano la più bassa classe di contaminazione – il livello A) fossero collocate in un ambiente in classe B circondato da un'area in classe C, a sua volta comunicante con una zona in classe D - secondo il concetto della classe di contaminazione progressiva. Era inoltre necessario riservare, in conformità alle norme GMP, uno spazio controllato adeguato per l'ingresso, la vestizione, il cambio degli abiti e l'uscita degli operatori e dedicare una parte dell'area alla quarantena e al controllo di qualità dei materiali. Dopo aver concluso un lungo processo di validazione della struttura e delle procedure, la Cell Factory 'Franco Calori' ha ottenuto dall'AIFA la certificazione GMP il 5 luglio 2007.

Attualmente, la Cell Factory 'Franco Calori' è impegnata nello studio e nella preparazione di prodotti cellulari in ematologia, neurologia, cardiologia, otorinolaringoiatria, prevalentemente nell'ambito di studi clinici di fase I-II (2-5).

Sulla base dell'esperienza sin qui maturata, crediamo che l'azione più significativa da intraprendere perché la terapia cellulare progredisca anche nel nostro Paese sia la promozione della collaborazione fra le Cell Factory certificate GMP a livello nazionale e i clinici interessati a sperimentare le proprietà terapeutiche delle cellule staminali e di popolazioni selezionate di cellule più mature, ingegnerizzate per interferire con il sistema immunitario, combattere le patologie neoplastiche e trattare infezioni resistenti ai protocolli terapeutici attualmente disponibili.

### **Bibliografia essenziale**

1. Giordano R, Lazzari L, Rebulli P. Clinical grade cell manipulation. *Vox Sang.* 2004; 87: 65-72.
2. Gammaitoni L, Lucchi S, Bruno S, Tesio M, Gunetti M, Pignochino Y, Migliardi G, Lazzari L, Aglietta M, Rebulli P, Piacibello W. Serial transplantations in nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice of transduced human CD34+ cord blood cells: efficient oncoretroviral gene transfer and ex vivo expansion under serum-free conditions. *Stem Cells.* 2006; 24: 1201-12.

3. Zangrossi S, Marabese M, Brogginì M, Giordano R, D'Erasmus M, Montelatici E, Intini D, Neri A, Pesce M, Rebullà P, Lazzari L. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells*. 2007; 25: 1675-80.
4. Ciulla MM, Ferrero S, Montelatici E, Gianelli U, Braidotti P, Calderoni S, Paliotti R, Annoni G, De Camilli E, Busca G, Magrini F, Bosari S, Lazzari L, Rebullà P. Assessment of selective homing and contribution to vessel formation of cryopreserved peripherally injected bone marrow mononuclear cells following experimental myocardial damage. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2006; 6: 141-9.
5. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Jacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 301-13.

**CELLULE STAMINALI  
E RIGENERAZIONE DEL MIOCARDIO**



## Quali cellule utilizzare per la rigenerazione del miocardio?

Caterina Frati<sup>2,4</sup>, Gallia Graiani<sup>2,4</sup>, Costanza Lagrasta<sup>2,4</sup>, Francesca Ferraro<sup>1</sup>, Mirca Lazzaretti<sup>2</sup>, Alice Belletti<sup>2</sup>, Francesco Fagnoni<sup>5</sup>, Eugenio Quaini<sup>6</sup>, Lucia Prezioso<sup>1</sup>, Carlotta Reni<sup>4</sup>, Roberto Sala<sup>2</sup>, Federico Quaini<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Biomediche, Università di Parma.

<sup>2</sup>Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Anatomia Patologica, Università di Parma.

<sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università di Parma.

<sup>4</sup>Centro Interdipartimentale "G. Olivetti - L. Vitali Mazza - A. Tardini" per lo Studio e Applicazioni Cliniche delle Cellule Staminali Cardiache (CISTAC), Università di Parma.

<sup>5</sup>Laboratorio di Oncologia Sperimentale, IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri, Pavia.

<sup>6</sup>Dipartimento di Cardiocirurgia, Poliambulanza, Brescia

Gli attuali sforzi scientifici della cardiologia rigenerativa sono orientati alla ricerca della forma più appropriata di terapia cellulare per ricostituire massa miocardica funzionante. Le evidenze sperimentali e cliniche sino ad ora accumulate sia in vivo che in vitro sul ruolo delle cellule staminali nella riparazione del danno d'organo hanno portato all'approvazione di protocolli terapeutici che comprendono la iniezione di cellule staminali midollari o progenitori ottenuti da muscolo scheletrico. I risultati attualmente ottenuti appaiono incoraggianti tanto da stimolare un approfondimento di questa nuova possibilità terapeutica. Mentre in termini di peso relativo nei processi di riparazione dopo danno ischemico non è noto quello posseduto dalle cellule staminali circolanti o da quelle residenti, appare in ogni caso evidente che anche nel cuore esista un processo differenziativo che porta alla formazione di cellule differenziate che possiedono caratteristiche funzionali complete. Per questo motivo, cellule ottenute da piccoli frammenti di miocardio umano (H) sono state espanse in coltura ed è stato studiato *in vitro* ed *in vivo* il potenziale cardiogenico. Queste sono state confrontate con cellule staminali mesenchimali midollari (BM) ottenute dallo stesso paziente all'atto cardiocirurgico. Inoltre, su placente umane a termine abbiamo effettuato uno studio morfometrico, morfologico ed immunoistochimico per identificare cellule staminali e loro siti di accumulo preferenziali. Le cellule miocardiche, hanno mostrato caratteristiche morfologiche ed immunofenotipiche simili alle cellule staminali mesenchimali midollari. Dal confronto è emerso che le due popolazioni possiedono simili modalità di crescita anche se era evidente un maggiore capacità delle cellule H a formare cardiomiociti ed una maggiore potenzialità vasculoge-

nica per BM. Abbiamo inoltre documentato che H hanno proprietà immunogeniche simili a BM suggerendo un loro impiego prospettico in condizioni eterologhe. Iniettate nel miocardio infartuato di ratti e topi immunosoppressi, H sono in grado di rigenerare cardiomiociti e vasi coronarici. I risultati preliminari sulle placente umane, hanno mostrato che il numero e le dimensioni dei villi e del loro stroma vascolare si dispone con un gradiente dalla porzione fetale verso quella deciduale o materna. È stato inoltre documentato che esistono cellule *c-kit<sup>pos</sup>/CD34<sup>neg</sup>/Ck18<sup>neg</sup>* a fenotipo indifferenziato preferibilmente disposte all'interno dei capillari del villo ma in parte riscontrate in forma di clusters addossati allo stroma.

In conclusione, esistono nell'uomo diverse sorgenti di cellule progenitrici dotate di potenzialità riparativa cardiaca. La terapia dell'insufficienza cardiaca deve essere basata sull'identificazione di un approccio individualizzato per singola patologia e singolo paziente.

## Differenziazione delle cellule staminali verso il fenotipo cardiomiocitario

Antonio Paolo Beltrami

Istituto di Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Udine

Durante l'embriogenesi del topo, i progenitori miocardici vanno incontro a quattro processi specifici che sono sequenziali e parzialmente sovrapposti: specificazione del mesoderma cardiogenico (acquisizione di un destino cardiaco-specifico ancora reversibile), determinazione delle aree cardiogeniche simmetriche e bilaterali (acquisizione di un destino cardiaco-specifico irreversibile), *patterning* delle aree cardiogeniche (acquisizione di un organizzazione spaziale di destino cellulare), differenziamento cardiomiocitario (acquisizione di determinanti molecolari responsabili della maturazione funzionale delle cellule) e formazione del tubo cardiaco.

### Cardiogenesi precoce

I progenitori miocardici possono essere identificati, durante lo stadio precoce di gastrula, come una piccola popolazione di cellule (circa 50 nel topo) localizzata nell'epiblasto e distinta in due piccoli gruppi disposti ai due lati della linea mediana vicino alla porzione craniale del solco primitivo. Durante la gastrulazione tali cellule vanno incontro ad una transizione epitelio-mesenchimale, si muovono craniolateralmente a semicerchio per localizzarsi nella piastra mesodermica laterale. Fattori che svolgono un ruolo chiave in questo processo sono: *Twist*, *Snail* e *Brachyury*. Le vie di segnalazione di Wnt ed FGF (4 ed 8) sembrano giocare un ruolo cruciale in questa fase.

Nell'embrione di pollo, la polarità cranio-caudale che tali progenitori hanno nel solco primitivo viene preservata nel tubo cardiaco. Ciononostante, espianti di cellule epiblastiche e del solco primitivo trapiantate eterotopicamente mostrano che tali cellule sono specificate ma non determinate ad un destino miocardico fino a quando non effettuano il loro ingresso dentro al solco primitivo e migrano dentro alle piastre laterali del mesoderma, possibilmente in risposta a segnali provenienti dai tessuti circostanti. I più precoci determinanti molecolari associati al differenziamento cardiomiocitario sono *Mesp1/2* ed *Fgf8*. L'espressione di questi fattori

è alta durante la gastrulazione, si riduce nel mesoderma e sono ri-espressi in diversi tessuti, incluso il cuore, a stadi più tardivi. Essi giocano un ruolo chiave nella formazione del cuore.

### **Specificazione del mesoderma cardiogenico**

Una volta che si vengono a localizzare nelle piastre mesodermiche laterali i progenitori cardiaci vengono denominati mesoderma cardiogenico. L'esatta localizzazione di quest'ultimo è difficile da identificare poiché non è un tessuto statico ed è stato fino ad ora tracciato localizzandolo in relazione a punti di repere transienti quali il solco primitivo.

Inoltre i progenitori cardiaci si formano gradualmente nel corso di diversi stadi di sviluppo e crescono in parte in seguito a proliferazione delle cellule stesse ed in parte per reclutamento di altre cellule. Diversi segnali provenienti dall'endoderma cranio-laterale, bilanciati da altri segnali inibitori, sono richiesti per indurre la specificazione miocardica.

Molecole candidate alla specificazione miocardica includono diversi membri della superfamiglia del TGF $\beta$ , quali le bone morphogenic proteins (BMP) oltrechè membri della famiglia del fibroblast growth factor (FGF). Diverse evidenze indicano, inoltre, che la via non canonica di Wnt e Sonic Hedgehog (SHH) facilitano l'induzione miocardica mentre la via canonica di Wnt ha funzione inibitoria.

In *Drosophila*, Decapentaplegic (Dpp, membro della superfamiglia del TGF $\beta$  e molto simile a BMP2/4) viene prodotto dall'ectoderma dorsale ed induce l'espressione di Tinmann (ortologo del fattore di trascrizione Nkx2.5) e la formazione del vaso dorsale nel sottostante mesoderma. L'esposizione del mesoderma non cardiogenico a BMP2 *in vivo* induce l'espressione ectopica dei fattori cardiogenici Nkx2.5 e GATA4, mentre l'esposizione del mesoderma cardiogenico a Noggin (antagonista di BMP) o l'inibizione della via di segnalazione delle BMP inibiscono la formazione del tubo cardiaco.

Gli FGF hanno un effetto cardiogenico nelle stesse regioni in cui è attiva la via di BMP. Tra questi, un ruolo importante è svolto da FGF2, 4 ed 8. L'espressione di quest'ultimo da parte dell'endoderma induce l'espressione di Nkx2.5 e MEF2C da parte del mesoderma. Evidenze ulteriori dell'importanza di questa via vengono da studi effettuati su cellule ES non esprimenti il recettore 1 dell'FGF. Da tali ES è possibile ottenere cellule endoteliali, ma il differenziamento cardiomiocitario è inibito.

La via canonica di Wnt reprime il differenziamento cardiomiocitario, mentre ligandi non canonici di Wnt inducono differenziamento cardiomiocitario. Inibitori della via canonica di Wnt quali Dkk1 e Crescent stimolano la via Wnt/JNK e promuovono il differenziamento cardiomiocitario. Entrambi questi fattori sono secreti dal nodo durante la gastrulazione e possono iniziare la cardiogenesi nel punto di intersezione fra la zona, disposta sull'asse cranio-caudale, in cui la via canonica di Wnt è repressa ed il punto di massima concentrazione di BMP, lungo il gradiente dorso-ventrale.

## **Determinazione e formazione di un campo cardiaco bilaterale**

Una volta che i progenitori miocardici si localizzano nelle piastre mesodermiche laterali, esse si dividono in due strati: il mesoderma splanchnico (porzione più interna) e quello somatico (porzione esterna). Lo spazio compreso fra i due prende il nome di cavità celomatica. I progenitori miocardici originano dal mesoderma splanchnico.

I due campi cardiogenici bilaterali, in stadi presomitici, si giustappongono cranialmente, lungo la linea mediana, a formare una struttura falciforme.

Le cellule contenute nello splanchno-mesoderma assumono una forma colonnare e vengono determinate ad un destino miocardico tramite un complesso network di fattori trascrizionali al cui centro ritroviamo Nkx2.5.

Tale fattore, inizialmente identificato in *Drosophila (tinman)*, svolge un ruolo cruciale nella cardiogenesi, come dimostrato da studi su moscerini e topi deficienti per tale fattore. In quest'ultimo caso, gli animali muoiono pre-termine a causa di alterata morfogenesi sia del cono di afflusso che di quello di efflusso. Ciononostante, altri fattori NK2 probabilmente compensano per l'assenza di Nkx2.5, come dimostrato dalla comparsa di cardiomiociti battenti anche in animali Knock-Out (KO). L'assenza di Nkx2.5, d'altro canto, altera l'espressione di diversi geni miocardici dimostrando il ruolo cruciale svolto da questo fattore nella determinazione cardiomiocitaria.

Diversi Autori si sono cimentati nello studio della regolazione della trascrizione di tale gene. Sebbene essa sia molto complessa, sono stati identificati alcuni elementi, quali i fattori trascrizionali GATA, YY1 e Smad4, suggerendo un ruolo importante per il signalling di BMP nella regolazione di Nkx2.5.

La complessa attività trascrizionale di Nkx2.5 è inoltre modulata da modificazioni post-traduzionali, formando un omodimero nei siti di legame al DNA, venendo fosforilato in serina da Casein-Chinasi II (CKII) ed interagendo con altri fattori trascrizionali, quali GATA4, SRF, Tbx5, Tbx2, Tbx20, dHand, e Foxh1. Da ultimo l'attività trascrizionale di Nkx2.5 è antagonizzata da COUP-TF1 o Hmx1.

Bersagli trascrizionali di Nkx2.5 sono: ANP, l'actina  $\alpha$  cardiaca, CARP, il recettore adenosinico A1, la calreticulina, la connessina 40, NCX1, l'enzima convertente l'endotelina-1, HOP, la miocardina, Csm e MEF2C.

## **Morfogenesi dei campi cardiogenici e differenziamento**

Studi recenti hanno dimostrato l'organizzazione dei campi cardiogenici in strisce craniocaudali allineate lateromedialmente in cui i progenitori del cuore sinistro si trovano nella regione più laterale, mentre quelli del cuore destro sono localizzati più medialmente. Inoltre, la porzione più craniale dei campi andrà a formare la curvatura esterna del tubo cardiaco, mentre la porzione caudale formerà quella interna.

Differenze molecolari fra le diverse parti dei campi cardiogenici sono state identificate analizzando l'espressione di determinanti quali *Fgf10*, *Fgf8* ed *Isl1*. Semplificando, l'area cardiogenica può essere divisa in un primo campo cardio-

genico (formante l'intero ventricolo sinistro, parte del destro e gli atri) ed in un secondo campo cardiogenico, caratterizzato dall'espressione di *Isl1* (formante parte del ventricolo destro e degli atri e l'intero tratto di efflusso).

Ciononostante, da studi di analisi clonale è emerso che la restrizione clonale a singoli compartimenti non è assoluta, deponendo contro un modello perfettamente segmentale di sviluppo cardiaco. Inoltre, il fatto che ampi cloni contribuiscano a diversi lignaggi dimostra che essi segregano da un progenitore comune. A complicare ulteriormente il quadro, diversi progenitori mesodermici sono reclutati nelle aree cardiogeniche dalle aree circostanti.

Pertanto, al fine di evitare confusioni, diversi autori suggeriscono di distinguere le diverse aree cardiogeniche sulla base dell'espressione di geni chiave. Tra questi troviamo:

- *Tbx1*, che codifica per un fattore trascrizionale espresso dal mesoderma cefalico, dall'endoderma faringeo e da una parte del campo cardiogenico secondario. Esso è indotto da Shh tramite i fattori di trascrizione *Foxl1/c2/a2*, mantiene la proliferazione cellulare ed induce il differenziamento.
- *Tbx20* è espresso in tutti i progenitori cardiaci ed in cellule endocardiche e gioca un ruolo in entrambi i campi cardiogenici, come sottolineato dal fatto che topi KO hanno cuori piccoli, non ripiegati ed il cui miocardio parietale non differenzia.
- *dHand* ed *eHand*, che sono fattori chiave nell'asimmetria ventricolo destro ventricolo sinistro, rispettivamente.
- *Tbx5* che mostra un gradiente, mantenuto dall'acido retinoico, lungo il tubo cardiaco e che è massimamente espresso a livello senoatriale.

Le fasi finali della morfogenesi cardiaca e del differenziamento richiedono l'intervento di diverse proteine della matrice (quali fibronectina, Tenascina C) e regolatori della motilità (quali RhoA). Il differenziamento terminale, invece, coinvolge l'espressione di proteine deputate all'omeostasi del Calcio (NCX1) e di proteine strutturali.

### **Identificazione di determinanti molecolari coinvolti nella cardiogenesi mediante studio del differenziamento di ES in vitro**

Una delle applicazioni più promettenti delle cellule staminali embrionali consiste nel loro impiego nell'ambito dello screening di molecole responsabili del differenziamento cardiomiocitario. In questo modo sono stati testati diversi fattori, di cui elenchiamo i principali qui di seguito.

- *BMP*. Come descritto in precedenza, tali fattori svolgono un ruolo cruciale nella specificazione del mesoderma cardiogenico. Il priming di ES murine (mES) con TGFβ1 e BMP2 aumenta il differenziamento cardiomiocitario sia quantitativamente che qualitativamente. L'associazione attivina e BMP4, invece, aumenta il differenziamento di cellule umane ES (hES). Di notevole importanza appare, invece, l'osservazione dell'effetto inibitorio di alte concentrazioni di siero sul differenziamento di hES mediante BMP2 e 4.

- *Wnt*. Come esposto in precedenza, l'attivazione della via canonica di Wnt (Wnt1, 3A ed 8) sembra inibire la cardiogenesi, seppur sia stato dimostrato che Wnt3A e Wnt8 inducano differenziamento nella linea di cellule staminali di carcinoma embrionario murino (EC) P19Cl6. In realtà ciò che emerge è che Wnt3A favorisce le fasi precoci di differenziamento, mentre ha un'attività inibitoria nelle fasi più tardive. Wnt11, agonista della via non canonica, aumenta il differenziamento cardiaco attivando JNK e PKC.
- *FGF*. Diversi membri di questa famiglia (FGF 1, 2 e 4) vengono secreti da regioni embrionali necessarie per il differenziamento cardiaco. L'FGF2, secreto dall'endoderma, sembrerebbe indurre una miogenesi cardiaca. L'aggiunta di FGF2 durante il differenziamento delle ES aumenta l'espressione di Nkx2.5, dimostrando un ruolo nella regolazione trascrizionale di questo fattore. Ciò che appare chiaro è che essi cooperano con BMP per indurre cardiogenesi, come dimostrato dalla combinazione FGF2/BMP2, capace di aumentare il differenziamento delle mES.
- *HGF*. Esso è un potente mitogeno che svolge importanti ruoli nel differenziamento, nella proliferazione, nella migrazione e nella sopravvivenza. Inoltre cardiomiociti immaturi esprimono il recettore (cMet) per questa proteina. HGF aumenta in maniera specifica il differenziamento cardiomiocitario di mES.
- *Ossitocina*. Se somministrata al feto altera la cardiogenesi, determinando malformazioni cardiache. L'aggiunta di OT a cellule P19 ne aumenta il differenziamento cardiomiocitario.- *IGF*. Secondo alcuni autori IGFI o II stimolano il differenziamento cardiomiocitario a partire da ES.
- *Altri fattori*. Molti altri fattori, tra cui la Dinorfina B, l'acido retinoico, l'ossido nitrico, la vitamina C ed i radicali liberi sono stati chiamati in causa nella modulazione del differenziamento miocitario.

In conclusione, sebbene i protocolli attualmente utilizzati per indurre il differenziamento di cellule staminali verso il lineage cardiomiocitario si siano basati perlopiù sull'utilizzo di cocktail di fattori di crescita empiricamente determinati, lo studio degli step differenziativi di specificazione, determinazione e differenziamento terminale indicano che tanto il timing di somministrazione di specifici fattori sia altrettanto critico quanto l'identificazione delle molecole chiave. Tenendo conto di ciò si potranno progettare protocolli differenziativi più razionali e, possibilmente, più efficaci.

### **Bibliografia essenziale**

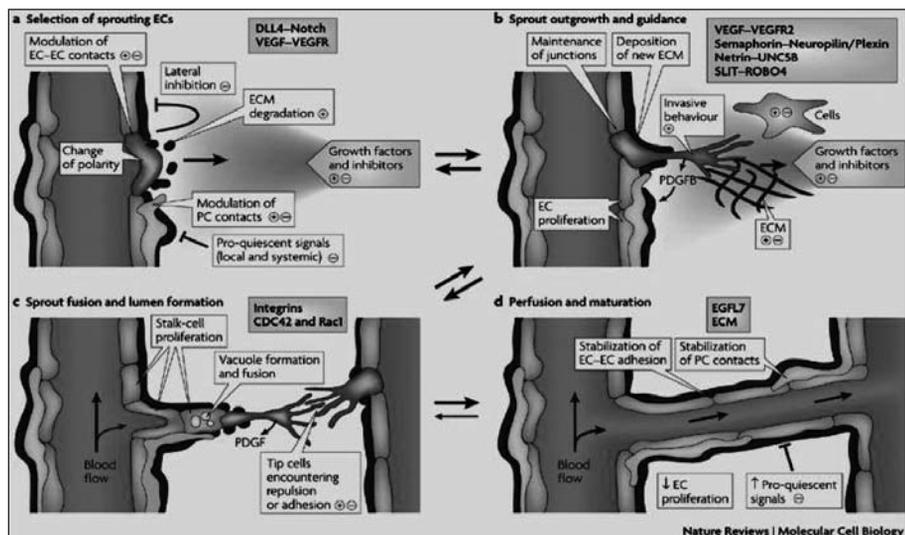
1. Singh M, Terada N. Trends Cardiovasc Med. 2007; 17, 96.
2. Olson EN. Harvey Lect. 2002; 98, 41.
3. Chen K, Wu L, Wang ZZ. J Cell Biochem. 2008; 104, 119.
4. Abu-Issa R, Kirby ML. Annu Rev Cell Dev Biol. 2007; 23, 45.
5. Wu SM, Chien KR, Mummery C. Cell. 2008; 132, 537.
6. Martin-Puig S, Wang Z, Chien KR. Cell Stem Cell 2008; 2, 320.

## Neoformazione vascolare e riparazione del danno miocardico

Paolo Madeddu

Experimental Cardiovascular Medicine, University of Bristol, U.K.

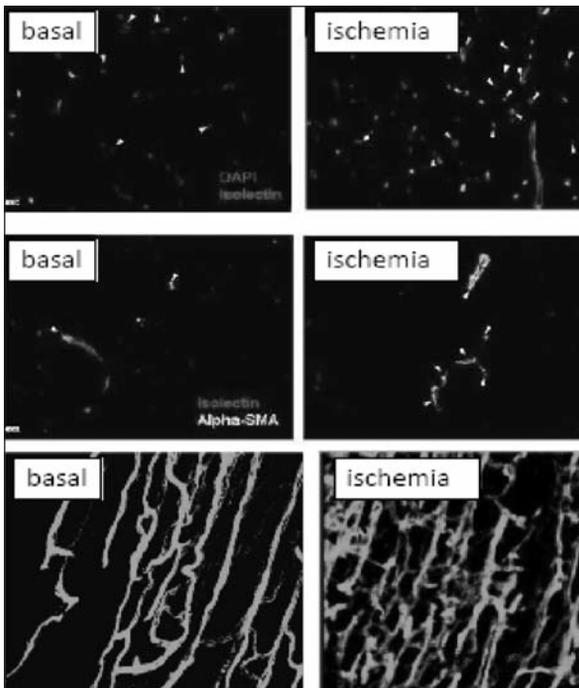
Le malattie cardiovascolari rappresentano la causa principale di morte in entrambi i sessi nei paesi del mondo occidentale. Secondo il Centro per il Controllo e la Prevenzione delle Malattie, circa 61 milioni di americani sono affetti da malattie cardiache. L'American Heart Association ha riportato che approssimativamente 870.000 soggetti sono morti per cause cardiache nel 2004. In Gran Bretagna, 275.000 di persone ogni anno presentano un infarto del miocardio e 120.000 di questi infarti hanno un esito infausto.



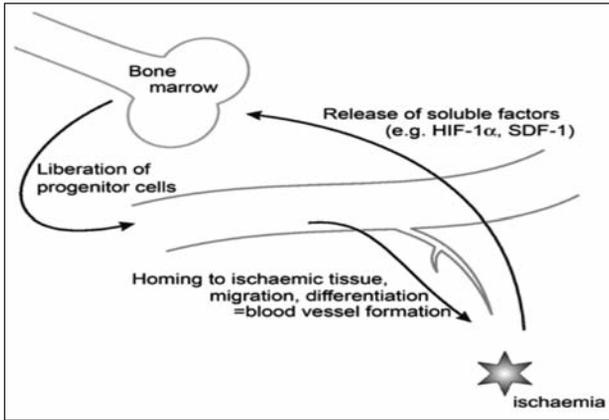
**Fig. 1** - Rappresentazione schematica del processo di "sprouting angiogenesis". Per effetto di un gradiente di fattori di crescita liberati nell'ambiente ischemico, singole cellule endoteliali sono selezionate e cambiano polarità divenendo "tip cells". Queste cellule migrano nella direzione dello stimolo seguite da cellule endoteliali di accompagnamento che proliferano mantenendo il contatto col vaso originale. Nella fase successiva di stabilizzazione, le cellule endoteliali secernono fattori che reclutano periciti ed altre cellule di supporto (Adams and Alitalo, Nature Reviews, 2007).

L'infarto miocardico è una condizione di sofferenza acuta del cuore per inadeguato supporto di nutrienti e ossigeno in conseguenza di una placca aterosclerotica che si ulcera e favorisce la formazione di un trombo occludente. Anche se le cellule cardiache soggette ad ischemia muoiono nella maggior parte entro poche ore, una frazione sopravvive nell'area circostante grazie allo spontaneo ristabilirsi del flusso sanguigno. Procedure mediche di dissolvimento del trombo e di rivascularizzazione precoce mediante angioplastica consentono il salvataggio di una significativa parte del cuore ischemico. Tuttavia, il recupero funzionale successivo a tali procedure dipende principalmente dalla capacità suppletiva di circoli collaterali e del microcircolo intramiocardico. Stimolati dal rilascio di citochine e fattori di crescita, i piccoli vasi sanguigni del cuore si moltiplicano al fine di rifornire nutrienti e ossigeno alla zona di confine tra cuore sano e infartuato (una area critica nota come "border zone").

Per molto tempo, questo processo di crescita vascolare è stato interamente attribuito alla proliferazione di cellule residenti nel cuore. Negli ultimi 10 anni, il ruolo dei progenitori endoteliali nella neovascolarizzazione postnatale è stato oggetto di intenso studio, a seguito della scoperta rivoluzionaria che cellule progenitrici del midollo osseo dotate di potere rigenerativo vengono rilasciate nella circolazione sanguigna in seguito ad un insulto ischemico o danno tissutale. A parte i monociti, che sono noti essere implicati nella fase "montante" della angiogenesi, una frazione molto scarsa di progenitori con potenziale angiogenico è stata identificata nel sangue circolante di soggetti con infarto miocardico. Tali



**Fig. 2** - Immagini tratte da microscopia a fluorescenza identificanti strutture capillari (pannelli superiori) ed arteriole (pannelli intermedi) in muscoli prelevati in condizioni basali e dopo induzione di ischemia. Si può notare l'incremento numerico dei vasi (angiogenesi). Nei pannelli inferiori, il processo angiogenico è illustrato in preparati "whole mounting". Si nota la aumentata densità vascolare, la presenza di tip cells e di ponti vascolari che connettono vasi a decorso parallelo (Paolo Madeddu, dati non pubblicati).



**Fig. 3** - Rappresentazione schematica di meccanismi coinvolti nella mobilizzazione di EPCb dal midollo osseo come conseguenza di ischemia.

Questo processo è regolato da citochine rilasciate nel contesto dell'ambiente ischemico e rilasciate in circolo. Le EPC raggiungono dalla circolazione il tessuto ischemico e qui vengono incorporate complementando la angiogenesi indotta da cellule vascolari residenti. (Spinetti et al., Cardiovasc Res. 2008)

progenitori, dopo aver raggiunto il tessuto ischemico, sembrano essere in grado di differenziare in cellule della parete vascolare, così contribuendo alla generazione di nuovi vasi in situ (vasculogenesi). La frazione monocitaria viene identificata in citofluorimetria per essere positiva per antigeni di superficie CD45 e CD14, tipici dei leucociti. Queste cellule svolgono il ruolo di aprire letteralmente dei pertugi nel tessuto ischemico grazie alla liberazione di proteasi che degradano la matrice. I cunicoli provvisori vengono poi abitati da cellule endoteliali che migrano (tip cells) accompagnate da un corteo di cellule al seguito (sprouting angiogenesis). Queste strutture provvisorie sembrano essere supportate fisicamente dalla funzione paracrina di progenitori, identificati in citofluorimetria da markers di superficie CD34, KDR, a CXCR4. Tale funzione, consistente nella liberazione di fattori trofici per l'endotelio, sembra prevalente rispetto alla capacità di dar vita direttamente a cellule vascolari mediante un processo di differenziamento delle cellule progenitrici. Il processo di vasculogenesi del cuore viene poi completato dal reclutamento di cellule perivascolari (periciti e cellule muscolari lisce) finalizzato alla formazione di vasi maturi (arteriologenesi). La esatta definizione di progenitori endoteliali (EPC) rimane tuttavia ancora incerta dato che, accanto alla caratterizzazione antigenica, le valutazioni morfologiche necessarie per la loro identificazione si basano su saggi in cultura sui quali non si è trovato un definitivo consenso. Le popolazioni che emergono da questi saggi consistono in rare cellule proangiogeniche, che aderiscono precocemente al collagene (entro 24 ore) e danno luogo a colonie endoteliali tardive capaci di notevole espansione (late EPC) e una più abbondante frazione cellulare che aderisce alla fibronectina dopo 2 giorni, ma poi genera rapidamente colonie non espansibili (early EPC). Le "late EPC" si ritiene debbano corrispondere alla frazione circolante CD34/KDR/CXCR, mentre the "early EPC" deriverebbero dai monociti identificati in citofluorimetria come CD45/CD14.

Bisogna tener conto che sia le cellule vascolari residenti che i progenitori liberati dal midollo sono funzionalmente alterati nei pazienti con cardiopatia ischemica, come conseguenza dei fattori di rischio associati, tra i quali il diabete pare avere un ruolo predominante. Le recenti applicazioni di medicina rigenerativa

potranno diventare davvero efficaci quando si riuscirà a “rivitalizzare” il potenziale funzionale dei progenitori da iniettare nel cuore infartuato. Varie procedure sono attualmente contemplate, dalla selezione per sorteggio di cellule progenitrici immature al condizionamento ex vivo farmacologico e genetico (ex vivo gene therapy).

### **Bibliografia essenziale**

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997; 275: 964-967.
2. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 3422-7.
3. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007; 109: 1801-9.
4. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003; 107: 1164-9.
5. Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, Ng MK. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51: 660-8.
6. Moldovan NI, et al. Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization - The drilling of metalloelastasepositive tunnels in ischemic myocardium. *Circ Res*. 2000; 87: 378-84.

## Segnali di danno e funzione delle cellule staminali nell'infarto miocardico acuto e nell'insufficienza cardiaca cronica

*Maurizio C. Capogrossi*

Laboratorio di Patologia Vascolare, Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI), Roma

Il cuore è stato per lungo tempo considerato un organo terminalmente differenziato in cui le cellule cardiache, i cardiomiociti, sono stabiliti dalla nascita e non sono in grado di proliferare durante la vita post-natale. La perdita di tali cellule, per esempio in seguito ad un danno ischemico, costituisce un evento irreversibile in cui il tessuto contrattile formato dai cardiomiociti viene sostituito da tessuto fibroso non contrattile determinando, a lungo termine, un deterioramento della funzionalità cardiaca.

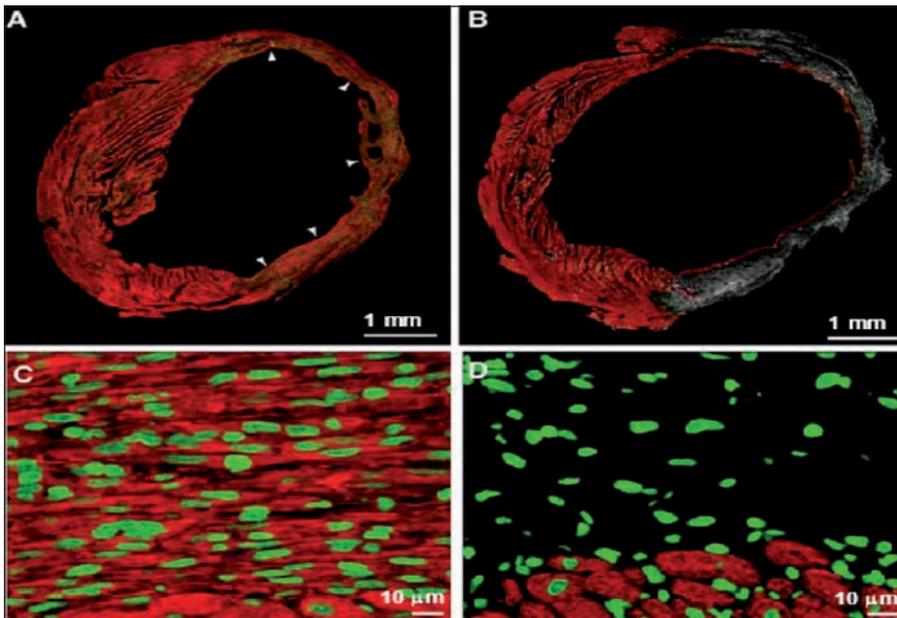
Tuttavia alcuni organismi, come le salamandre (Flink, 2002) e il pesce zebra (Poss et al. 2002), sono in grado di rigenerare completamente il miocardio. Le molecole coinvolte e i segnali attivati durante il processo di rigenerazione non sono stati completamente caratterizzati e, ad oggi, questi modelli animali rappresentano uno strumento importante per comprendere e sviluppare strategie volte ad indurre un processo rigenerativo nei mammiferi. La scoperta di cellule staminali residenti nel miocardio (Beltrami et al., 2003; Messina et al., 2004) e nell'epicardio (Limana et al. 2007), capaci di rispondere alla domanda fisiologica e quindi di mantenere l'omeostasi del tessuto cardiaco nel corso della vita, ha portato ad una ridefinizione del cuore come organo capace di rigenerare. In seguito ad un danno ischemico, cellule staminali cardiache (CSC) proliferano e differenziano in cellule cardiovascolari. L'identificazione dei meccanismi che regolano tali processi biologici è importante sia per rispondere alla domanda del perché il cuore non attiva un processo rigenerativo completo dopo danno, sia per sviluppare approcci terapeutici efficaci nel riparo del cuore stesso.

Un ruolo importante nei processi rigenerativi è svolto dalla citochina High Mobility Group Box 1 (HMGB1). HMGB1 è una proteina ubiquitaria di 215 amminoacidi, principalmente situata nel nucleo delle cellule, in cui modula l'interazione fisica fra i fattori di trascrizione e la cromatina (Bianchi ed Agresti, 2005). HMGB1 può essere liberata passivamente nel mezzo extracellulare dalle cellule necrotiche e mediante secrezione attiva da parte delle cellule infiammatorie. La frazione extracellulare di HMGB1 segnala la presenza di danno tissutale e interagendo con specifici recettori, tra cui RAGE e TLR2/4, attrae sia le cellu-

le che rappresentano una prima linea di difesa contro il danno e l'infezione microbica (neutrofili, monociti, NK e cellule dendritiche) (Ulloa e Messmer, 2006), sia le cellule che mediano la ricostruzione del tessuto, comprese le cellule staminali (Palumbo ed altri, 2004; Palumbo et al. 2007).

Abbiamo recentemente dimostrato che HMGB1 è in grado di modulare la funzione delle CSC (Limana et al., 2005). In particolare, HMGB1 ha un effetto chemotattico sulle CSC *in vitro* e la somministrazione di HMGB1 *in vivo* in un modello murino di infarto del miocardio determina la proliferazione delle CSC e il loro differenziamento in nuovi cardiomiociti nella regione infartuata (Fig. 1). Tali cellule esprimono infatti le proteine tipiche dei cardiomiociti, l'alfa actina sarcomerica (Fig. 1) e il fattore trascrizionale MEF2C (Fig. 2).

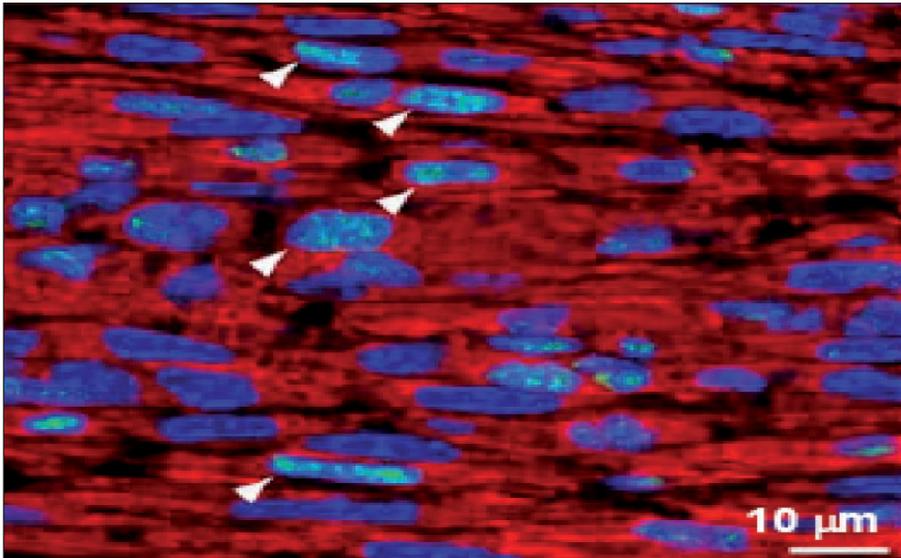
La rigenerazione tessutale che si osserva in seguito al trattamento con HMGB1 si accompagna ad un miglioramento della funzione cardiaca. Valutazioni ecocardiografiche ed emodinamiche effettuate fino a quattro settimane dal trattamento, dimostrano un significativo aumento della frazione di eiezione ed una diminuzione della pressione telediastolica nei cuori che hanno ricevuto HMGB1 rispetto ai cuori di controllo (Fig. 3). Al fine di caratterizzare i meccanismi coinvolti nel processo rigenerativo abbiamo analizzato le variazioni di espressione genica mediante la tecnologia Affymetrix utilizzando RNA ottenuto da miocardio infar-



**Fig. 1** - HMGB1 induce la formazione di tessuto rigenerante nel cuore infartuato.

(A,B) Sezione trasversale di ventricolo sinistro infartuato a cui è stata somministrata HMGB1 (A) o una proteina di controllo (B). Gli animali sono stati sacrificati dopo una settimana. Le frecce indicano la zona di rigenerazione. In (C) e in (D) è evidenziata a maggior ingrandimento una porzione della regione infartuata ripettivamente di (A) e (B). I cardiomiociti neoformati nella regione infartuata dei cuori trattati con HMGB1 sono stati identificati mediante immunofluorescenza con l'anticorpo diretto contro l' $\alpha$ -actina sarcomerica (in rosso).

I nuclei delle cellule sono evidenziati dalla colorazione con Hoechst (in verde).



**Fig. 2** - Le cellule neoformate nei cuori trattati con HMGB1 esprimono il fattore trascrizionale cardiaco MEF2C. Analisi immunohistochemica effettuata con un anticorpo che riconosce il fattore MEF2C (in magenta) e un anticorpo diretto contro l'alfa actina sarcomerica (in rosso). I nuclei sono marcati con ioduro di propidio (in blu).

tuato non trattato e trattato con HMGB1 dopo tre giorni dall'induzione dell'infarto. Risultati preliminari suggeriscono che HMGB1 è in grado di modulare l'espressione di geni codificanti per fattori di crescita, citochine e chemochine, geni implicati nella regolazione della proliferazione cellulare e nel rimodellamento della matrice extracellulare.

In una prima fase abbiamo analizzato come la variazione dell'espressione di citochine chemochine e fattori di crescita nel tessuto cardiaco influenzasse la funzionalità delle CSC. A tale scopo abbiamo isolato e coltivato i fibroblasti cardiaci, che insieme ai cardiomiociti rappresentano la popolazione cellulare più abbondante nel miocardio. Tali cellule sono state quindi trattate con HMGB1 e il terreno condizionato è stato utilizzato per coltivare le CSC. Mediante quest'approccio sperimentale abbiamo dimostrato che in presenza di HMGB1 i fibroblasti rilasciano nel terreno di coltura fattori in grado di stimolare la migrazione e la proliferazione delle CSC (Fig. 4).

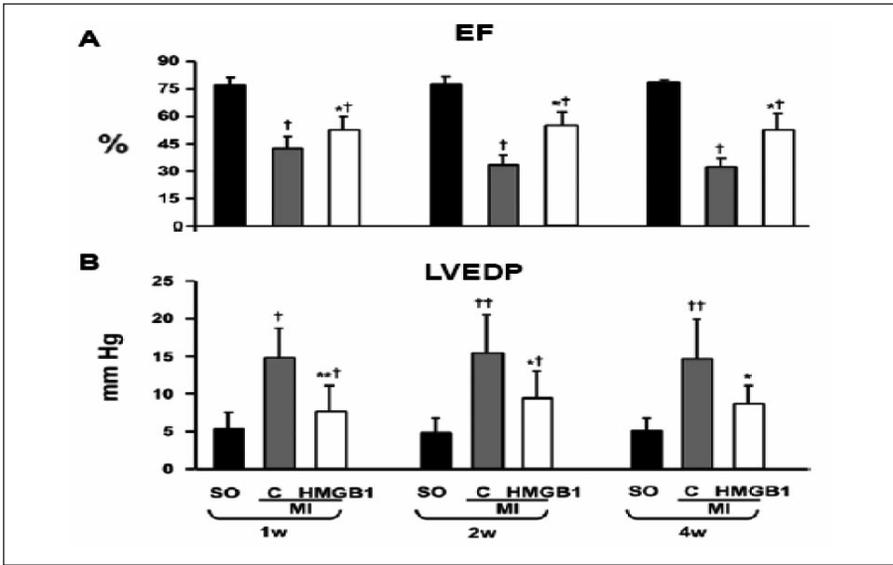
Un'analisi condotta sui terreni condizionati delle cellule trattate con HMGB1, ha rilevato un aumento significativo dei seguenti fattori: VEGF, MIP1a, GMCSF, IFN gamma, IL10, IL4, IL1 beta, IL1 ra, IL9 e TNF alfa (Rossini et al. 2008).

In conclusione, HMGB1 rappresenta una nuova molecola capace di indurre un meccanismo di rigenerazione modulando, sia direttamente sia attraverso un meccanismo paracrino, la funzione delle CSC residenti nel miocardio.

Ad oggi, gli approcci terapeutici basati sull'utilizzo delle cellule staminali sono i seguenti:

- a) iniettare cellule staminali direttamente nel tessuto danneggiato;
- b) aumentare la mobilizzazione e il reclutamento delle cellule staminali endogene.

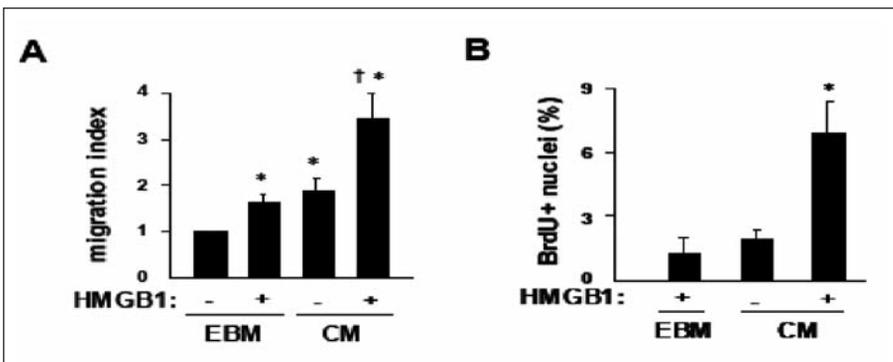
I nostri risultati dimostrano che una terapia basata sulla somministrazione di specifici fattori di crescita, potrebbe essere una valida alternativa all'isolamento delle CSC, le quali, a causa del loro ridotto numero, richiedono un passaggio *in vitro* di amplificazione prima del reimpianto nel cuore danneggiato.



**Fig. 3** - Valutazione della funzione cardiaca a 1, 2 e 4 settimane dal trattamento con HMGB1. (A) La frazione di eiezione (EF) e (B) la pressione tele diastolica del ventricolo sinistro (LVEDP), sono rispettivamente aumentate e diminuite nei cuori infartuati trattati con HMGB1 rispetto ai cuori non trattati (C). SO indica gli animali non infartuati.

In (A): † e \* p<0.001 vs SO e C

In (B): \*p<0.01 e \*\*p<0.001 vs C; † p<0.01 e ††p<0.001 vs SO



**Fig. 4** - Effetto del terreno di coltura dei fibroblasti cardiaci (cFb) trattati con HMGB1 sulle CSC. Il terreno dei fibroblasti cardiaci (CM) cresciuti in presenza di HMGB1 (10 ng/ml) determina un aumento della migrazione (A) e della proliferazione (B) delle CSC. La proliferazione è stata valutata come numero di cellule che erano positive per la Bromodesossuriidina. Come controllo è stato utilizzato il terreno EBM con (+) e senza HMGB1(-).

In (A): \*p<0.05 vs EBM (-); † p<0.05 vs EBM (+) e CM (-)

In (B) \*p<0.05 vs CM non trattato ed EBM

### Bibliografia essenziale

1. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003; 114: 763-776.
2. Bianchi ME, Agresti A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*. 2005; 15: 496-506.
3. Flink IL. Cell cycle reentry of ventricular and atrial cardiomyocytes and cells within the epicardium following amputation of the ventricular apex in the axolotl, *Amblystoma mexicanum*: confocal microscopic immunofluorescent image analysis of bromodeoxyuridine-labeled nuclei. *Anat Embryol (Berl)*. 2002; 205: 235-244.
4. Limana F, Zacheo A, Mocini D, Mangoni A, Borsellino G, Diamantini A, De Mori R, Battistini L, Vigna E, Santini M, Loiaconi V, Pompilio G, Germani A, MC. Capogrossi. Identification of cardiac and endothelial precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res*. 2007; 101: 1255-65.
5. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004; 95: 911-921.
6. Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol*. 2004; 164: 441-449.
7. Palumbo R, Galvez BG, Pusterla T, De Marchis F, Cossu G, Marcu KB, Bianchi ME. Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. *J Cell Biol*. 2007; 179: 33-40.
8. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science*. 2002; 298: 2188-2190.
9. Rossini A, Zacheo A, Mocini D, Totta P, Facchiano A, Castoldi R, Sordini P, Pompilio G, Abeni D, Capogrossi MC, Germani A. HMGB1-stimulated human primary cardiac fibroblasts exert a paracrine action on human and murine cardiac stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 44: 683-93.
10. Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17: 189-201.

## Il rischio di aritmia nella terapia cellulare del danno miocardico

*Carlo Napolitano*

U.O. di Cardiologia Molecolare, IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri, Pavia

The application of molecular biology has provided major advancements in several areas of modern medicine, and cardiology is not an exception. Ten years ago a term like “Molecular Cardiology” would have been meaningless; today it immediately suggests to clinicians very specific and well-defined diseases that are encountered in daily practice.

The field of cardiac arrhythmias has been particularly influenced by the developments of molecular medicine, and the innovation in this area has progressed so rapidly that now, 15 years after the discovery of the first genes predisposing to sudden cardiac death (1), electrophysiologists already use results of genetic analysis to guide the treatment of their patients (2). Researchers in the field of molecular medicine are now setting quite ambitious goals, and several laboratories have committed aims at finding cures for inherited and acquired diseases such as repairing of damaged myocardium after infarct. Terms like “gene therapy” and “cell therapy” are encountered more and more often when browsing the medical literature, and while it is unlikely that these therapies will become available in the next few years, it is very plausible that we will see the introduction of these treatments during our lifetime.

A few years ago we suggested that a brilliant study reporting one of the first attempts to control rapid AV conduction during atrial fibrillation by gene transfer in swine (3) was the dawn of “molecular electrophysiology,” (4) anticipating a time in which electrophysiologists would use catheters to deliver cell therapy and genetic therapies. Recently, with the pioneering studies exploring the feasibility of the “biological pacemaker,” (5) it seems that molecular electrophysiology may become a reality sooner than expected.

On the other hand Stem cell therapies have been suggested as experimental strategies for treatment of ischemic heart disease (by induction of angiogenesis) and heart failure (by improving the mechanical performance of the heart). The rationale underlying these strategies is the possible improvement of myocardial function by repopulating the diseased areas with a new pool of functional cells. Based on this assumption, a variety of cell types have been suggested as potential

sources of cell transplantation; some, such as autologous skeletal myoblasts and bone marrow-derived progenitor cell transplantation, have already reached the clinical stage. Although most efforts in the field have focused on defining new stem cell sources and assessing the effects of stem cell delivery on global myocardial performance, little emphasis has been placed on the electrophysiologic impact of these procedures. Among the most important issues that were raised by several Authors, is the possible arrhythmogenic risk of cell therapy procedures. In skeletal myoblast trials, a disturbingly high incidence of ventricular arrhythmias was noted in the initial stages of clinical follow-up (7, 8). Although a direct causal relationship is hard to prove in these non-controlled trials, this potentially life-threatening side effect warrants further consideration given the expected high incidence of ventricular arrhythmias in this patient population.

A typical example of potential pro arrhythmic mechanism is that of skeletal myoblasts. These cells, generate structures that have completely different physiologic properties from host cardiomyocytes. Moreover, because of their lack of gap junctions, these myotubes are completely uncoupled from the surrounding ventricular myocytes and therefore may act as anatomic obstacles, increasing tissue inhomogeneity. Interestingly there are molecular strategies being developed to overcome such limitations. Moreover, an elegant study demonstrated that genetically modifying wild-type skeletal myoblasts to overexpress Cx43 resulted not only in elimination of this proarrhythmic effect but even in a pronounced antiarrhythmic outcome (8). Hence, transplantation of skeletal myoblasts carrying the MCK-Cx43 transgene significantly reduced the prevalence of inducible ventricular tachyarrhythmias (11). Although cell grafting theoretically could increase the potential for arrhythmias, the opposite also may occur. For example, cardiomyocyte transplantation in the infarct border zone may facilitate the emergence of new re-entrant ventricular arrhythmias by generating slow conduction channels in this area. On the other hand, the same strategy can be used as a novel antiarrhythmic approach. If cardiomyocytes transplantation will result in efficient regeneration of the infarct, existing slow conduction pathways within the scar may be eliminated, reducing the arrhythmogenic risk. In this respect, it is interesting to note that we and others have been able to improve myocardial performance in the rat chronic infarct model with transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes (12, 13).

Finally, it is important to observe that while the proarrhythmic potential of skeletal myoblasts has been proven, the evidence of proarrhythmic effect upon delivery of other cell type such as bone-marrow derived cells, appears much lower. In the future, thanks to the improved capabilities of cell manipulation before delivery the safety of cell therapy is going to be significantly improved.

## References

1. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*. 1995; 80: 795-803.

2. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R, Cappelletti D. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1866-1874.
3. Donahue JK, Heldman AW, Fraser H, McDonald AD, Miller JM, Rade JJ, Eschenhagen T, Marban E. Focal modification of electrical conduction in the heart by viral gene transfer. *Nat Med.* 2000; 6: 1395-1398.
4. Priori SG, Napolitano C. From catheters to vectors: The dawn of molecular electrophysiology. *Nat Med.* 2000; 6: 1316-1318.
5. Qu J, Plotnikov AN, Danilo P Jr, Shlapakova I, Cohen IS, Robinson RB, Rosen MR. Expression and function of a biological.
6. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42: 2063-2069.
7. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41: 1078-1083.
8. Roell W, Lewalter T, Sasse P, et al. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature.* 2007; 450: 819-824.
9. Caspi O, Huber I, Kehat I, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50: 1884-1893.
10. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol.* 2007; 25: 1015-1024.

## Effetti paracrini esercitati da cellule staminali adulte nella riparazione del danno miocardico

Massimiliano Gnechi<sup>1,2</sup>, Elisabetta Cervio<sup>1</sup>, Patrizia Danieli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Cardiologia Sperimentale e Cellule Staminali, Unità di Cure Intensive Coronariche, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Ematologiche, Pneumologiche e Cardiovascolari, Sezione di Cardiologia, Università di Pavia

Le malattie cardiovascolari rappresentano nel loro insieme la maggiore causa di morbilità e mortalità tra le popolazioni occidentalizzate (1). In particolare lo scompenso cardiaco post-ischemico è una delle patologie più gravi e la sua prevalenza è in continua crescita poiché l'età media delle popolazioni occidentalizzate è in aumento e le terapie disponibili, pur migliorando l'aspettativa di vita, non sono curative. In pazienti colpiti da infarto miocardico acuto esteso, non ripulso in tempi opportuni, si assiste frequentemente ad un'espansione dell'area infartuale e ad un assottigliamento di parete a livello delle zone necrotiche. A ciò segue un aumento dei diametri ventricolari ed un processo di rimodellamento anatomico e strutturale del cuore che, quando insufficiente a far fronte al carico di lavoro richiesto dall'organismo, risulta in una diminuzione della gittata cardiaca e conseguente quadro clinico di scompenso (2). Tra le terapie attualmente a disposizione del cardiologo esistono farmaci in grado di rallentare, ed in parte ridurre, la gravità di tale rimodellamento patologico; nessun intervento terapeutico può tuttavia realmente impedire che nel tempo un paziente di questo tipo sviluppi scompenso cardiaco e soprattutto nessun farmaco attualmente disponibile è in grado di ripristinare lo *status quo ante* (3). Il risultato che ne deriva è rappresentato da un crescente numero di pazienti affetti da una seria patologia cronica la cui aspettativa di vita è molto limitata e sempre accompagnata da una qualità di vita pessima, caratterizzata da sintomi invalidanti e continue ospedalizzazioni. Il trapianto cardiaco è ad oggi l'unico trattamento in grado di salvare la vita a molti di questi pazienti; tuttavia, la scarsità di donazioni, il rigetto acuto o cronico dell'organo ricevuto e i problemi legati alla terapia antirigetto rendono questo approccio ampiamente insufficiente per far fronte a tale drammatica condizione patologica. In termini economici, la gestione del paziente scompensato si traduce in un enorme carico sulla Struttura Sanitaria.

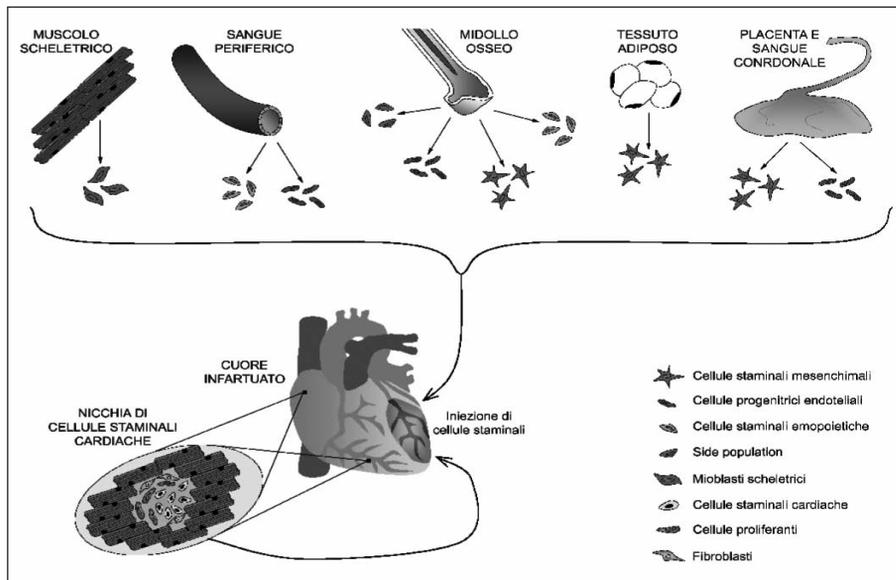
Per tutti questi motivi esiste un urgente bisogno di nuovi e rivoluzionari interventi

terapeutici in grado di indurre la regressione del rimodellamento ventricolare post-ischemico ovvero di prevenirlo. In questa ottica, una terapia cellulare rigenerativa/curativa che utilizzi cellule staminali adulte (ASCs) autologhe rappresenta una delle più grandi promesse (4). Incoraggianti risultati sperimentali hanno già dimostrato la fattibilità ed efficacia di tale strategia e anche i primi studi clinici, seppure realizzati su popolazioni poco numerose e gravati da vizi metodologici, hanno comunque fornito risultati incoraggianti (5-8).

### Terapia cellulare per il trattamento del danno miocardico

I tipi cellulari fino ad ora studiati a livello sperimentale includono cellule mononucleate di derivazione midollare (BM-MNCs), cellule midollari non frazionate (BMCs), cellule staminali emopoietiche (HSCs), cellule progenitrici endoteliali (EPCs), cellule staminali mesenchimali (MSCs) e cellule cardiache staminali (CSCs) (Fig. 1). Studi sperimentali effettuati su roditori e maiali hanno permesso di documentare come, dopo iniezione intramiocardica in cuori infartuati, le cellule staminali siano in grado di ridurre il danno d'organo e migliorare la funzionalità ventricolare (4, 5).

Ma come agiscono le cellule staminali? La rigenerazione cardiaca derivata dalla transdifferenziazione delle ASCs in cardiomiociti e cellule endoteliali è stata originariamente proposta come il principale meccanismo d'azione (9, 10). Tuttavia, di recente è stato dimostrato che la maggior parte delle cellule di derivazione



**Fig. 1** - Fonti di cellule staminali adulte per il trattamento dell'infarto miocardico. I tipi cellulari fino ad ora studiati a livello sperimentale comprendono le MSCs (midollo osseo, tessuto adiposo, sangue cordonale o placenta), le HSCs (midollo osseo e sangue periferico), le EPCs (midollo osseo, sangue periferico e sangue cordonale) e le CSCs (nicchie cardiache).

midollare non possiederebbero in realtà un grande potenziale rigenerativo (11, 12). Nel caso delle HSCs poi la capacità di transdifferenziare in cardiomiociti è stata addirittura messa in forte dubbio e ad oggi la diatriba scientifica è ancora accesa (12). Recentemente è stato ipotizzato che fenomeni di fusione cellulare tra cardiomiociti nativi e cellule staminali trapiantate possano giustificare in parte i risultati ottenuti in modelli animali (13, 14).

A prescindere dal fatto che la generazione di nuovi cardiomiociti avvenga per transdifferenziazione o fusione cellulare, è stato dimostrato da più laboratori che il numero di cardiomiociti rigenerati è troppo limitato per poter giustificare una

**Tab. 1** - Fattori paracrini secreti da cellule staminali adulte.

Fattori secreti	Abbreviazione	Funzione Esercitata
Adrenomedullin	ADM	Citoprotezione
Angio-associated migratory protein	AAMP	Angiogenesi
Angiogenin	ANG	Angiogenesi, proliferazione cellulare
Angiopoetin-1	AGPT1	Migrazione cellulare, stabilizzazione dei vasi
Bone morphogenetic protein-2	BMP2	Sviluppo
Bone morphogenetic protein-6	BMP6	Crescita e differenziamento cellulare
Connective tissue growth factor	CTGF	Angiogenesi, crescita cellulare
Endothelin-1	EDN1	Citoprotezione, proliferazione cellulare
Fibroblast growth factor-2	FGF2	Proliferazione cellulare e migrazione
Fibroblast growth factor-7	FGF7	Proliferazione cellulare e stabilizzazione
Hepatocyte growth factor	HGF	Citoprotezione, angiogenesi, migrazione cellulare
Insulin-like growth factor-1	IGF-1	Citoprotezione, migrazione cellulare, contrattilità
Interleukin-1	IL-1	Induzione di VEGF
Interleukin-6	IL-6	Induzione di VEGF
Kit ligand/Stem cell factor	KITLG (SCF)	Proliferazione cellulare e migrazione
Leukemia inhibitory factor	LIF	Proliferazione cellulare, citoprotezione
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	Proliferazione cellulare, risposta infiammatoria
Matrix metalloproteinase-1	MMP1	Riorganizzazione della matrice cellulare, formazione dei tubuli
Matrix metalloproteinase-2	MMP2	Riorganizzazione della matrice cellulare, formazione dei tubuli
Matrix metalloproteinase-9	MMP9	Riorganizzazione della matrice cellulare
Monocyte chemoattractant protein-1	MCP-1	Migrazione dei monoliti
Macrophage-specific colony-stimulating factor	M-CSF	Proliferazione e migrazione dei monociti
Placental growth factor	PGF	Proliferazione cellulare
Plasminogen activator	PA	Degradazione di molecole della matrice cellulare
Platelet-derived growth factor	PDGF	Proliferazione cellulare e migrazione
Pleiotrophin	PTN	Proliferazione cellulare
Secreted frizzled-related protein-2	SFRP2	Sviluppo, citoprotezione
Stem cell-derived factor-1	SDF-1	Mobilizzazione dei progenitori cellulari
Thrombospondin-1	THBS1	Migrazione cellulare
Thymosin-β4	TMSB4	Migrazione cellulare, citoprotezione
Tissue inhibitor of metalloproteinase-1	TIMP-1	Migrazione cellulare
Tissue inhibitor of metalloproteinase-2	TIMP-2	Migrazione cellulare
Transforming growth factor-β	TGF-β	Maturazione dei vasi, proliferazione cellulare
Tumor necrosis factor-α	TNF-α	Degradazione di molecole della matrice cellulare, proliferazione cellulare
Vascular endothelial growth factor	VEGF	Citoprotezione, proliferazione, migrazione, angiogenesi

ripresa funzionale significativa come quella osservata dopo trattamento con ASCs. Di conseguenza, è stato ipotizzato che i benefici anatomici e funzionali osservati in cuori infartuati trattati con ASCs potrebbero in realtà essere in parte dovuti alla secrezione di fattori solubili da parte delle cellule trapiantate che, agendo per via paracrina, sarebbero in grado di proteggere il cuore, indurre neovascolarizzazione, ridurre il rimodellamento ventricolare, aumentare la contrattilità, migliorare il metabolismo cardiaco e promuovere la rigenerazione miocardica endogena (15).

### **Meccanismi paracrini mediati dalle cellule staminali**

A supporto dell'ipotesi paracrina è stato dimostrato che le ASCs, in modo particolare le MSCs, producono e secernono un elevato numero di citochine, chemochine e fattori di crescita (Tab. 1). Inoltre, l'ipossia aumenta la produzione di molti di questi fattori; è ragionevole supporre che le cellule iniettate a livello della zona ischemica del miocardio riescano quindi a recepire lo stimolo ipossico e a produrre, di conseguenza, maggiori quantità di fattori ipossia-sensibili (16, 17).

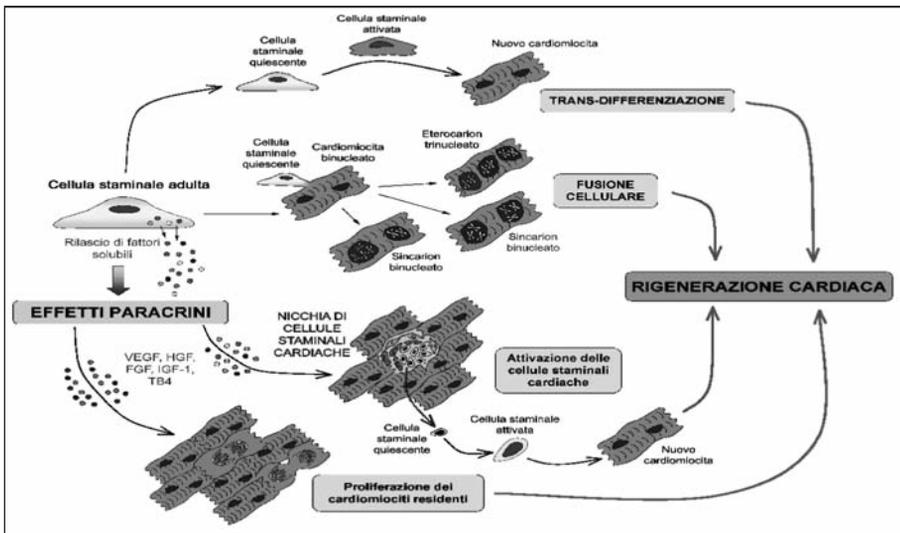
Esperimenti eseguiti utilizzando il mezzo condizionato (CM) ottenuto da cellule staminali hanno permesso di dimostrare che in effetti i fattori solubili rilasciati sono da soli in grado di mediare diversi effetti cardio-riparativi (18, 19). L'effetto paracrino che maggiormente influenza la limitazione dell'area infartuale è la citoprotezione. La prima evidenza in assoluto a supporto dell'effetto citoprotettivo esercitato dalle cellule staminali si è avuta con le MSCs (16-18). Il CM derivato da MSCs di origine midollare si è rivelato citoprotettivo sia *in vitro* che *in vivo*. In particolare, il CM di MSCs sovra-esprimenti il gene Akt riduce in modo molto significativo l'apoptosi in cardiomiociti isolati di ratto esposti a bassa concentrazione di ossigeno (16-18). Cosa più importante, è stato dimostrato che l'iniezione intramiocardica di CM concentrato in cuori infartuati di ratto riduce l'area necrotica rispetto ai controlli trattati con salina (16-18). Altri gruppi hanno in seguito confermato le proprietà cardioprotettive delle MSCs e di altri tipi di ASCs (19-21). Una prima analisi del profilo d'espressione delle ASCs ha permesso di identificare alcuni fattori, la cui azione citoprotettiva era già nota, implicati nella cardioprotezione. Tra questi ricordiamo: VEGF, bFGF, HGF, IGF-1, PDGF e timosina beta-4 (Tab. 1).

Un altro importante effetto biologico positivamente influenzato per via paracrina è il processo di neovascolarizzazione. È noto che vari tipi di ASCs possono essere incorporati all'interno di strutture vascolari e differenziare in cellule endoteliali mature e cellule muscolari lisce. Tuttavia, il numero di cellule incorporate è estremamente basso e non tale da poter giustificare l'aumento di vascolarizzazione e flusso documentato da molti studi. Di per contro, vari fattori liberati dalle ASCs sono notoriamente pro-angiogenici, basti pensare a VEGF, bFGF ed alle Angiopoietine. Epstein e colleghi hanno dimostrato in modo molto elegante come le MSCs aumentino la perfusione tramite rilascio di fattori paracrini in un modello di ischemia degli arti inferiori (17). In tale modello i livelli proteici di VEGF

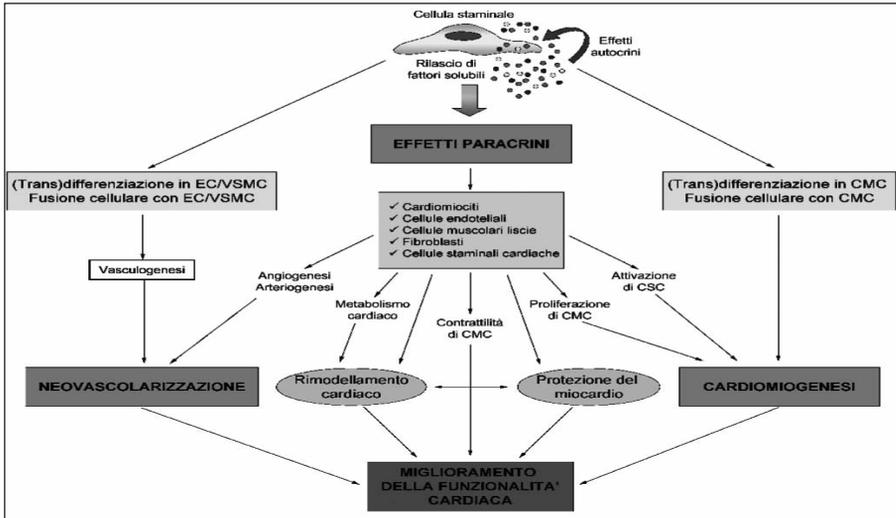
e bFGF a livello tissutale erano significativamente più elevati rispetto ai controlli e il numero di cellule incorporate era molto basso. Di per contro il numero di capillari nel gruppo trattato con MSCs era di gran lunga superiore ai controlli. Anche le EPCs aumentano il numero di capillari e collaterali in parte tramite rilascio di fattori vasculotropici (22).

I fattori solubili rilasciati dalle ASCs possono agire anche a livello della matrice extracellulare e condizionare in modo favorevole il processo di rimodellamento ventricolare. Le MSCs, per esempio, producono un elevato numero di molecole coinvolte nella biogenesi della matrice extracellulare (metalloproteinasi, proteasi della serina, collagene). Non meraviglia quindi la scoperta che la somministrazione di MSCs può ridurre la deposizione di tessuto fibrotico nel cuore ed in altri organi quali fegato, polmoni e reni (15, 23). Inoltre, le ASCs possono limitare i processi infiammatori locali mediante rilascio di sostanze antiossidanti ed anti-infiammatorie (24, 25).

Recentemente è stato anche suggerito che la somministrazione di ASCs potrebbe influenzare positivamente la contrattilità miocardica. Takahashi e colleghi hanno dimostrato che il CM derivato da MNCs di origine midollare è in grado di migliorare la frazione d'accorciamento e la velocità di contrazione e il rilascio di cardiomiociti isolati da ratto adulto (19). È importante notare che in tale esperimento il CM derivato da cellule preventivamente esposte ad ipossia esercitava un effetto più marcato rispetto al CM da cellule incubate in condizioni di normossia. La natura dei fattori inotropi coinvolti è al momento sfuggente anche se l'IGF-1 potrebbe essere implicato (26).



**Fig. 2** - Meccanismi coinvolti nella rigenerazione cardiaca. Si ipotizza che le ASCs possano portare alla rigenerazione cardiaca attraverso tre distinti meccanismi. La transdifferenziazione in cardiomiociti è stato il primo meccanismo proposto. La fusione delle ASCs con cardiomiociti residenti costituisce una seconda ipotesi. Infine, fattori paracrini solubili rilasciati dalle cellule staminali potrebbero indurre l'attivazione, la migrazione e il differenziamento delle cellule staminali cardiache residenti e/o incrementare la proliferazione di cardiomiociti nativi.



**Fig. 3** - Meccanismi d'azione delle cellule staminali adulte nella riparazione del danno miocardico. La vasculogenesi e la cardiomiogenesi per transdifferenziazione delle ASCs in cellule endoteliali (EC), cellule muscolari lisce (VSMC) o cardiomiociti (CMC) sono i meccanismi originariamente proposti. La fusione cellulare è in seguito stata dimostrata ma la valenza biologica di tale fenomeno rimane ad oggi esclusiva. Infine, gli effetti paracrini esercitati dalle ASCs giocano un ruolo molto importante specialmente in termini di protezione e rimodellamento del miocardio. Le cellule staminali trapiantate rilasciano sostanze biologicamente attive in grado di esercitare benefiche azioni paracrine sulle cellule cardiache. Tali fattori possono peraltro esercitare anche azione autocrina modulando la biologia delle cellule staminali stesse.

Interessante anche segnalare la dimostrazione di come il metabolismo cardiaco in ratti e maiali infartuati trattati con iniezione di cellule staminali sia migliore rispetto ai controlli (27, 28). In particolare, le profonde anomalie bioenergetiche rilevabili normalmente dopo infarto risultano attenuate nei cuori trattati con terapia cellulare a fronte di un numero di cellule attecchite assai modesto; ciò fa pensare che anche in questo caso il rilascio di mediatori umorali, più che la transdifferenziazione delle cellule trapiantate, possa giocare un ruolo meccanicistico prevalente.

Infine è stata proposta un'ipotesi molto suggestiva, ovvero che meccanismi paracrini possano favorire la rigenerazione endogena cardiaca. È ormai assodato che anche il cuore, come il resto degli organi, possiede cellule staminali residenti in grado di differenziare in cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce (29, 30). Le CSCs risiedono in nicchie situate in prevalenza a livello del tessuto atriale e del ventricolo destro. Si ritiene che le CSCs partecipino in modo costante al mantenimento dell'omeostasi cardiaca andando a rimpiazzare le cellule che quotidianamente vengono perse per fenomeni di apoptosi (30). Tuttavia il potere rigenerativo delle CSCs non è sufficiente a far fronte all'enorme perdita di massa cardiaca che si verifica in seguito ad infarto. Per tale ragione sarebbe auspicabile l'identificazione di molecole in grado di favorire la rigenerazione endogena. Purtroppo ad oggi i segnali che regolano la biologia delle CSCs è ancora elusiva. È però stato dimostrato che la somministrazione a livello della

zona peri-infartuale di HGF e IGF-1 è in grado di favorire la migrazione, la differenziazione e l'attecchimento delle CSCs, determinando di conseguenza la rigenerazione della zona necrotica (31).

Dal momento che le MSCs producono e rilasciano sia HGF che IGF-1 è stato ipotizzato che uno dei meccanismi che contribuisce alla riparazione miocardica dopo iniezione di MSCs sia proprio un miglioramento della rigenerazione endogena (Figura 2). Dati a favore di tale ipotesi ci vengono da studi in cui si è dimostrato come in seguito ad iniezione di MSCs a livello cardiaco si assista ad un aumento di cardiomiociti in proliferazione non derivanti dalle cellule trapiantate (32). Uno studio condotto *in vitro* ha inoltre dimostrato che le EPCs sono in grado di indurre la migrazione e la crescita di CSCs mediante secrezione di VEGF, IGF-1 e SDF-1 (33). Esperimenti conclusivi in tale direzione sono tuttora auspicabili.

Considerati nel loro insieme tutti questi dati sperimentali avvalorano e confermano l'ipotesi paracrina, suggerendo che, oltre dalla rigenerazione miocardica e vascolare, l'azione riparatoria che le ASCs determinano in cuori infartuati venga mediata anche dal rilascio di sostanze solubili in grado di esercitare effetti benefici sulle cellule viciniori (Fig. 3).

### Scoperta di fattori paracrini e terapie molecolari

La dimostrazione che le ASCs sono in grado di produrre e secernere sostanze terapeutiche rappresenta una scoperta molto importante dal momento che, piuttosto che trapiantare cellule, in futuro potremmo essere in grado di somministrare specifiche proteine o altri fattori solubili. Ovviamente una strategia che preveda l'iniezione di cellule è ancora ragionevole dal momento che ad oggi i fattori paracrini coinvolti non sono del tutto noti e che altre variabili potrebbero agire in modo sinergico.

Tuttavia, nel caso in cui specifici fattori o un insieme di fattori in grado di mediare un miglioramento della funzione cardiaca o la riduzione dell'area infartuale venissero identificati una translazione a livello clinico sarebbe perseguibile. Ma come fare ad identificare le molecole coinvolte e potenzialmente terapeutiche? Identificare l'intero spettro di sostanze prodotte dalle ASCs e definirne il meccanismo d'azione rappresenta un compito molto difficile.

Tuttavia, servendosi di metodiche *high throughput* messi a disposizione dagli avanzamenti tecnologici già oggi siamo in grado di identificare alcune delle molecole d'interesse.

Per esempio, l'analisi comparativa del profilo d'espressione di MSCs native con MSCs sovraesprimenti il gene Akt ha permesso di dimostrare che la proteina Sfrp2 gioca un ruolo importante nella citoprotezione miocardica<sup>34</sup>. Esiste poi la possibilità di andare ad identificare una serie di proteine non ancora descritte, ma che potenzialmente sono coinvolte nella riparazione miocardica. Oltre ad Sfrp2, circa altri 650 trascritti sono risultati o sovraespressi o sottoespressi dalle Akt-MSCs quando paragonate alle MSCs native. Un'analisi computerizzata dei dati ha permesso di stimare che 5 geni, codificanti per proteine la cui funzione è ad

**Tab. 2** - Geni codificanti per nuove proteine differientemente espresse e secrete in Akt-MSCs rispetto a MSCs native in condizioni di normossia o ipossia.

Nuovo Gene	Massa molecolare della proteina (kDa)	Funzione Ipotizzata
Gene 1	60	Fattore angiogenico
Gene 5	15	ECRG4 (esophageal cancer-related gene 4)
Gene 8	120	Glicoproteina extracellulare (2 domini di fibronectina e Abl3-BP)
Gene 12	40	Fattore di sopravvivenza (attiva nuove chinasi di Akt)
Gene 13	7	Non nota

oggi sconosciuta, potrebbero essere coinvolti (Tab. 2). Le caratteristiche di tali fattori dovranno essere determinate in modo preciso, ma la speranza è quella di poter isolare una molecola potenzialmente terapeutica e dati preliminari confermerebbero questa ipotesi.

Un altro approccio utile all'identificazione dei fattori paracrini è la proteomica. Negli ultimi anni sono state sviluppate e migliorate numerose tecniche di proteomica che hanno permesso l'identificazione di specifiche mappe proteiche coinvolte nella crescita e differenziazione delle cellule staminali (35). Sicuramente l'introduzione della spettrometria di massa è stata l'innovazione più significativa. Con tale metodica si riesce a determinare la quantità di una proteina anche quando questa è presente in concentrazioni molto basse, nell'ordine delle femtomoli. Anche gli array proteici si sono già rivelati interessanti e promettono di divenire uno strumento molto utile in un futuro prossimo. È inoltre probabile che campi di ricerca quali la fosfoproteomica, la glicomica e l'interactomica (studio dell'interazione proteina-proteina) diverranno presto importanti aree di ricerca per lo studio della biologia delle cellule staminali.

Una volta identificata una proteina d'interesse subentrano problematiche legate all'impiego terapeutico. La limitazione principale di una qualsiasi terapia con proteine consiste nel riuscire a determinare e a mantenere costanti le concentrazioni terapeutiche al fine di indurre l'effetto desiderato. Differenti effetti terapeutici potrebbero richiedere differenti concentrazioni e tempi di somministrazione. Differenze sostanziali tra la biologia degli animali da esperimento e l'uomo rendono il compito ancor più difficile.

È stato per esempio dimostrato che una singola dose di specifici fattori di crescita è in grado di aumentare l'angiogenesi in modelli animali ma non nell'uomo (36, 37). La stabilità delle proteine e la loro farmacocinetica rappresentano altri possibili ostacoli. Per far fronte a tali problematiche sono in via di sperimentazione varie strategie per manipolare e rendere stabili le proteine tanto che terapie molecolari che utilizzano proteine e peptidi stanno velocemente diventando una realtà (38). Ad oggi la maggior parte dei preparati proteici sono somministrati per via parenterale anche se strategie alternative sono in fase di sperimentazione. L'uso di biopolimeri o nanoparticelle al fine di ottenere un rilascio controllato delle proteine o ancora la somministrazione tramite cerotti rappresentano soluzioni potenzialmente interessanti<sup>39,40</sup>.

Anche se la strada che porta ad un uso estensivo di terapie molecolari nell'uomo

è piena di ostacoli noi crediamo che il costante sviluppo tecnologico permetterà la creazione di nuove classi di farmaci che in futuro ci permetteranno di curare le patologie cardiovascolari in modo completamente diverso da come facciamo oggi.

## Bibliografia

1. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007; 93: 1137-46.
2. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000; 101: 2981-8.
3. McMurray JJ, Pfeffer MA. Heart failure. *Lancet*. 2005; 365: 1877-89.
4. Melo LG, Pachori AS, Kong D, Gneccchi M, Wang K, Pratt RE, Dzau VJ. Molecular and cell-based therapies for protection, rescue, and repair of ischemic myocardium: reasons for cautious optimism. *Circulation*. 2004; 109: 2386-93.
5. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol*. 2005; 23: 845-56.
6. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006; 355: 1210-21.
7. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J*. 2006; 27: 2775-83.
8. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al-Mallah M, Dawn B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007; 167: 989-97.
9. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; 410: 701-5.
10. Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 1999; 100: II247-56.
11. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004; 428: 668-73.
12. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferen-

- tiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004; 428: 664-8.
13. Alvarez-Dolado M, Pardo R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003; 425: 968-73.
  14. Noiseux N, Gneocchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, Dzau VJ, Pratt RE. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*. 2006; 14: 840-50.
  15. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008; 103: 1204-19.
  16. Gneocchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J*. 2006; 20: 661-9.
  17. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004; 94: 678-85.
  18. Gneocchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2005; 11: 367-8.
  19. Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291: H886-93.
  20. Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res*. 2006; 98: 1414-21.
  21. Xu M, Uemura R, Dai Y, Wang Y, Pasha Z, Ashraf M. In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; 42: 441-8.
  22. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*. 2003; 107: 461-8.
  23. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005; 112: 1128-35.
  24. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science*. 2002; 298: 597-600.

25. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42: 88-97.
26. Freestone NS, Ribaric S, Mason WT. The effect of insulin-like growth factor-1 on adult rat cardiac contractility. *Mol Cell Biochem.* 1996; 163-164: 223-9.
27. Feygin J, Mansoor A, Eckman P, Swingen C, Zhang J. Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: H1772-80.
28. Gneccchi M, He H, Melo LG, Noiseux N, Morello F, de Boer R, Zhang L, Pratt RE, Dzau V, Ingwall JS. Early beneficial effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells overexpressing Akt on cardiac metabolism after myocardial infarction. *Stem Cells.* 2009; In Press.
29. Parmacek MS, Epstein JA. Pursuing cardiac progenitors: regeneration redux. *Cell.* 2005; 120: 295-8.
30. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev.* 2005; 85: 1373-416.
31. Linke A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, Castaldo C, Cascapera S, Bohm M, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Hintze TH, Kajstura J, Anversa P. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 8966-71.
32. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2005; 115: 326-38.
33. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 39: 733-42.
34. Mirosou M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gneccchi M, Noiseux N, Mu H, Pachori A, Dzau V. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 1643-8.
35. Park HW, Shin JS, Kim CW. Proteome of mesenchymal stem cells. *Proteomics.* 2007; 7: 2881-94.
36. Hughes GC, Post MJ, Simons M, Annex BH. Translational physiology: porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *J Appl Physiol.* 2003; 94: 1689-701.
37. Post MJ, Laham R, Sellke FW, Simons M. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovasc Res.* 2001; 49: 522-31.

38. Malik DK, Baboota S, Ahuja A, Hasan S, Ali J. Recent advances in protein and peptide drug delivery systems. *Curr Drug Deliv.* 2007; 4: 141-51.
39. Zhang G, Nakamura Y, Wang X, Hu Q, Suggs LJ, Zhang J. Controlled release of stromal cell-derived factor-1 alpha in situ increases c-kit<sup>+</sup> cell homing to the infarcted heart. *Tissue Eng.* 2007; 13: 2063-71.
40. Segers VF, Tokunou T, Higgins LJ, MacGillivray C, Gannon J, Lee RT. Local delivery of protease-resistant stromal cell derived factor-1 for stem cell recruitment after myocardial infarction. *Circulation.* 2007; 116: 1683-92.

# La terapia cellulare della cardiopatia ischemica

*Giulio Pompilio*

Centro Cardiologico "Monzino" IRCCS, Milano

Nell'ultimo quinquennio vi è stato un incremento esponenziale di studi clinici di fase I e II di terapia cellulare cardiaca (TCC) con cellule staminali autologhe del midollo osseo per il trattamento della cardiopatia ischemica acuta (infarto del miocardio) e cronica (cardiomiopatia) (1).

In tutti gli studi clinici fin qui condotti, è stato confermato un eccellente profilo di sicurezza della TCC nonostante evidenti disomogeneità a riguardo del numero di cellule iniettate, nella tipologia dei pazienti trattati, delle strategie di somministrazione e dei criteri utilizzati per valutare l'efficacia della terapia.

Per le suddette ragioni, non è attualmente possibile trarre conclusioni definitive a proposito dell'efficacia clinica della TCC, sebbene recenti metaanalisi abbiano fornito materiale di approfondimento e discussione.

Quest'articolo offre un'analisi critica degli studi condotti finora e valuta dal punto di vista della biologia cellulare e della cardiologia clinica le informazioni di rilievo pubblicate dal 2002, così come ciò che emerge dagli studi clinici tuttora in corso. In particolare, vengono qui analizzati i tipi cellulari utilizzati, i protocolli di ricerca e le metodiche per valutare l'efficacia di ogni singola modalità di trattamento.

## **Midollo osseo: fonte preferenziale di cellule per studi clinici**

Il midollo osseo costituisce una sede privilegiata di un elevato numero di cellule staminali e progenitori; vi si trovano cellule staminali ematopoietiche, cellule staminali mesenchimali (stromali) e progenitori vascolari (endothelial progenitor cells o EPC), cellule che sono state proposte come cellule utilizzabili in ambito terapeutico cardiovascolare (2).

## **Caratteristiche delle cellule midollari utilizzate nei trial clinici**

La cellula progenitrice candidata alla terapia cellulare cardiaca deve possedere, oltre che un potenziale differenziativo (per es. in cardiomiociti e/o cellule endoteliali), la capacità di autorinnovarsi, creando un proprio microambiente per la

riparazione endogena (1, 3). Non esiste oggi un candidato ideale per scopi terapeuti cardiovascolari. Differenti tipi cellulari sono stati valutati in clinica.

#### *Cellule non selezionate (cellule mononucleate)*

La manipolazione più semplice che segue l'aspirazione di sangue midollare comporta l'isolamento selettivo di cellule mononucleate a bassa densità. La frazione che ne risulta (mononuclear cells o MNC) è composta principalmente (95%) da cellule mieloidi.

All'interno di questa popolazione eterogenea, le cellule progenitrici/staminali a differenti stadi di differenziamento verso le linee ematopoietica, endoteliale e/o mesenchimale (CD34+, CD133+ o CFU-F) rappresentano non più del 2-4% delle MNC totali. La maggior parte degli studi clinici ad oggi effettuati nell'infarto miocardico hanno utilizzato la frazione mononucleare.

#### *Cellule selezionate*

##### *a) Progenitori del midollo osseo con alta espressione di CD34/CD133.*

Gli antigeni CD34/CD133 sono glicoproteine transmembrana O-glicosilate coinvolte nella trasduzione del segnale, di adesione cellulare e di homing. Vengono espressi in numerose cellule staminali/progenitori, a diversi stadi di sviluppo e localizzazione tissutale, incluse cellule ematopoietiche, endoteliali, stromali, nervose e cellule tumorali dei tessuti molli.

Nel midollo osseo la frequenza della popolazione di CD34+ è circa 1 su 10.000 cellule nucleate o poco meno. Questi progenitori hanno la capacità di differenziare in cellule endoteliali mature e promuovere neovascolarizzazione, sebbene la loro esatta identificazione sia ancora oggetto di intensi studi.

##### *b) Progenitori del midollo osseo con alta espressione di livelli di aldeide deidrogenasi (ALDH)*

Una nuova strategia di purificazione cellulare per l'isolamento di cellule deputate alla riparazione cardiaca è basata sull'espressione di aldeide deidrogenasi nelle cellule midollari. È stato dimostrato che circa l'1% dei cellule nucleate del midollo osseo possiede alti livelli di attività ALDH. Una volta selezionate, queste cellule esibiscono un fenotipo CD34+/CD38- e CD34+/CD133+. Anche questi progenitori hanno dimostrato differenziamento endoteliale e capacità angiogenica in vitro ed in vivo.

##### *c) Cellule mesenchimali*

Le cellule mesenchimali rappresentano una sottopopolazione di cellule che hanno la potenzialità di autorinnovarsi, commissionarsi e di differenziarsi. MSC si differenziano in numerosi fenotipi: i mioblasti scheletrici, i miociti cardiaci, cellule endoteliali e progenitori delle cellule muscolari lisce e vascolari ed in periciti. Studi preclinici hanno mostrato che dopo infusione, l'MSC espanse ex vivo si innestano e sopravvivono per lungo tempo in diversi tessuti ed organi, incluso il tessuto cardiaco, dove promuovono la neovascolarizzazione e la funzionalità del miocardio danneggiato.

## **Modalità di somministrazione**

### *Intramiocardica*

La via più diretta per la somministrazione di cellule staminali nel cuore infartuato è senza dubbio l'iniezione intramiocardica per via epicardica. La procedura è semplice ed è basata sull'inoculazione delle cellule per via diretta nel muscolo cardiaco. Le cellule vengono somministrate nelle zone perinfartuali oppure nelle aree ischemiche. Tale modalità risulta la più idonea per pazienti candidati a bypass aorto-coronarico.

### *Intracoronarica*

Finora la somministrazione intracoronarica di cellule staminali è la metodologia di trapianto cellulare più diffusa ed utilizzata. L'infusione delle cellule avviene attraverso un catetere per angioplastica gonfiato a basse pressioni per impedire il flusso retrogrado nelle coronarie target. Tale strategia è utilizzata soprattutto nei trial di terapia cellulare dell'infarto acuto.

### *Trans-endocardica*

La procedura transendocardica si avvale di un dispositivo in grado di realizzare un mappaggio elettromeccanico cardiaco (NOGA) e di valutare le zone di miocardio ischemico o ibernato. Successivamente viene eseguita con apposito catetere l'iniezione della soluzione cellulare. Rispetto all'infusione intracoronarica la somministrazione trans-endocardica sembrerebbe più precisa e specifica.

La scelta della via di somministrazione è importante per assicurare il raggiungimento del prodotto cellulare nella zona di miocardio di interesse, al momento opportuno e nelle condizioni che meglio garantiscano la vitalità e la funzionalità delle cellule (4).

La scelta della via di somministrazione deve tener conto di numerosi fattori, tra i quali il tipo di cardiopatia ischemica: per l'infarto miocardico acuto la via di somministrazione intracoronarica, tramite l'incannulazione selettiva del vaso responsabile dell'infarto, è la metodica più pratica, sicura ed efficace per un trattamento diretto della zona infartuata. La via di somministrazione transendocardica rappresenta una valida alternativa ed è una tecnica attualmente in fase di studio. Per l'insufficienza cardiaca postinfartuale entrambe le procedure, somministrazione intracoronarica e transendocardica, si sono dimostrate sicure ed efficaci. La tecnica di somministrazione transendocardica che prevede inizialmente una valutazione elettromeccanica cardiaca si è dimostrata utile per identificare con precisione le aree miocardiche ibernato. La iniezione intramiocardica diretta è invece la più indicata per pazienti candidati a by-pass coronarico.

## **Valutazione della sicurezza e degli effetti in loco dopo inoculazione cellulare**

Evidenze riportate in quasi tutti gli studi clinici hanno dimostrato la fattibilità e la sicurezza dell'inoculazione intramiocardica di cellule staminali del midollo osseo. In tutti i trials clinici i pazienti sono stati monitorizzati per valutare l'as-

senza di effetti collaterali, di tossicità e modificazioni dei parametri clinici, ematologici, biochimici e cardiaci postumi all'infusione cellulare per un periodo di follow-up da 6 a 12 mesi. Complessivamente i pazienti hanno dimostrato di tollerare bene il trattamento, senza complicanze o effetti collaterali (aritmie, ischemie postprocedurali, perdita di contrattilità miocardica e/o restenosi) (5).

### **Valutazione di efficacia**

La valutazione di efficacia della terapia cellulare cardiaca è basata sulla capacità dei progenitori cellulari di rigenerare cardiomiociti e di stimolare la neo-angiogenesi. Gli endpoint clinici valutati sono stati perciò la perfusione del miocardio ischemico e l'eventuale recupero funzionale regionale o globale del ventricolo sinistro, tramite ventricolografia, ecocardiografia, scintigrafia (SPECT), PET e RM cardiaca.

Complessivamente, possiamo affermare che i risultati ottenuti non sono omogenei, e che saranno necessari altri studi randomizzati e multicentrici. Tuttavia, fatta salva la disomogeneità delle metodiche utilizzate e dei pazienti trattati, vi è oggi la convinzione che alcune categorie di pazienti possano beneficiare maggiormente: in particolare pazienti con infarto condizionante depressione della funzione ventricolare, pazienti con ischemia refrattaria non più candidabile a rivascolarizzazione meccanica e pazienti con cardiomiopatia dilatativa ad eziologia ischemica con quote significative di miocardio ibernato (5, 6).

In tali condizioni cliniche, sarà però necessario in futuro associare ad eventuali miglioramenti di parametri funzionali, valutazioni in merito alla prognosi dei pazienti.

### **Follow-up**

Nella maggior parte dei casi i tempi di follow-up sono stati limitati a circa 7-12 mesi (5,6). Gli effetti a lungo termine della terapia con cellule staminali adulte non sono ancora stati valutati. In un singolo studio, il miglioramento della frazione di eiezione osservato a 6 mesi, non è stato riscontrato nel controllo a 18 mesi. Altri studi hanno dimostrato beneficio nei pazienti trattati con cellule anche ad 1 anno di distanza.

### **Conclusioni**

La terapia rigenerativa cardiaca è un campo di ricerca clinica e sperimentale molto recente. Inizialmente la scelta dell'uso di cellule staminali da midollo osseo è stata supportata dall'ipotesi della loro potenziale plasticità. Più recentemente, gli studi clinici si basano invece sul concetto che l'infusione di EPC (CD34+ e/o CD133+) promuova angiogenesi e di conseguenza migliori il quadro perfusionale miocardico in condizioni di ischemia. I risultati disponibili ad oggi non sono tuttavia conclusivi a riguardo della reale efficacia clinica di questa strategia terapeutica, sebbene alcuni trials siano incoraggianti in termini di miglio-

mento perfusionale e funzionale del miocardio ischemico. Nel prossimo futuro, gli studi clinici saranno condotti per rispondere in primo luogo a domande a riguardo dell'efficacia, in termini di endpoints surrogati (funzionali) o clinici (mortalità e morbilità), ma anche per poter dare risposta in merito a:

- la scelta del tipo cellulare migliore,
- la dose terapeutica ideale,
- la via di somministrazione e le migliori metodiche di valutazione dell'eventuale effetto terapeutico.

Tutto questo dovrà sempre più essere modellato a seconda delle diverse situazioni cliniche da affrontare.

Un secondo problema di grande rilevanza sarà quello di superare le barriere biologiche determinate dai molteplici fattori di rischio di questi pazienti (diabete, ipertensione, fumo etc.) che rischiano di limitare significativamente la capacità riparativa delle cellule impiantate (problema dei cattivi donatori).

Per i suddetti motivi, appare chiaro quanto sarà in futuro importante e stretta l'interazione tra clinica e scienza di base, che dovranno parlare lo stesso linguaggio e procedere come vasi comunicanti.

### **Bibliografia essenziale**

1. Segers VFM, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008; 451: 937-42.
2. Jackson KA, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001; 107: 1395-1402.
3. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*. 2005; 115, 572-583.
4. Lasala GP, Minguell JJ. Bone Marrow-derived Stem/Progenitor Cells: Their Use in Clinical Studies for the Treatment of Myocardial Infarction. *Heart, Lung and Circulation*. 2008, Epub.
5. Impact of Intracoronary Cell. Therapy on Left Ventricular Function in the Setting of Acute Myocardial Infarction A Collaborative Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Clinical Trials. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 50: 1761-7.
6. Abdel-Latif A, et al. Adult Bone Marrow - Derived Cells for Cardiac Repair A Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007; 167: 989-997.

## Prospettive di terapia cellulare in cardiologia

*Ciro Indolfi, Sabato Sorrento, Iolanda Aquila, Daniele Torella*

Cattedra di Cardiologia, Università di Catanzaro

Quando si verifica un danno miocardico che provoca uno scompenso cardiaco, nessuna terapia è in grado, nel tempo, di migliorare la funzione cardiaca. Pertanto negli ultimi anni vi è stato uno straordinario interesse sulla possibilità di rigenerare il tessuto miocardico per curare le malattie cardiache.

È noto che, dopo la nascita, la quasi totalità dei miociti cardiaci esce dal ciclo cellulare dopo una fase terminale di divisione cellulare. Su questa base, il cuore postnatale è stato giustamente considerato come un organo post-mitotico. Negli ultimi anni, però, è stato dimostrato che alcuni organi considerati post-mitotici (cuore, cervello) hanno in realtà un potenziale rigenerativo.

In modelli sperimentali sono state utilizzate miociti fetali, cellule staminali embrionali, mioblasti scheletrici, progenitori endoteliali (EPCs) e cellule derivanti dal midollo osseo per ricostituire il miocardio post-infartuale con nuovi miociti e/o strutture vascolari (1).

### *Cellule staminali embrionali*

Le cellule staminali embrionali rappresentano la fonte più intuitiva di cellule primitive che potrebbero essere usate per riparare i tessuti degenerati o danneggiati. Purtroppo, la loro tendenza a formare teratomi è un serio ostacolo per il loro uso. Inoltre, un importante problema etico e la necessità della terapia immunosoppressiva per la natura eterologa queste cellule ne limitano il loro futuro uso clinico. La recente produzione *in vitro* di iPS (induced-pluripotent stem cells) attraverso la riprogrammazione genomica di cellule umane somatiche adulte ottenuta mediante la trasfezione di soli 4 geni, ha aperto l'orizzonte all'utilizzo autologo di queste cellule nella terapia rigenerativa. Ad oggi, comunque, non esistono ancora studi che dimostrino che queste cellule siano capaci di rigenerare tessuto cardiaco in vivo nell'animale da esperimento.

### *Cellule staminali cardiache*

È stato recentemente dimostrato che il cuore adulto contiene un pool di cellule staminali cardiache (CSCs) residenti in grado di generare nuovi cardiomiociti e strutture vascolari (2). Questi dati hanno radicalmente cambiato la tradizionale visione del cuore come organo post-mitotico. Inoltre, l'esistenza del potenziale rigenerativo delle CSCs ha chiarito l'origine dell'inspiegata presenza di una sottopopolazione di miociti immaturi proliferanti nel miocardio adulto. La scoperta dell'esistenza delle cellule staminali cardiache supporta l'ipotesi di una nuova omeostasi cellulare cardiaca, che considera il cuore come organo con capacità auto-rigenerante. Benché le cellule staminali cardiache endogene possano in fieri rappresentare il miglior tipo cellulare per la ricostituzione stabile del miocardio, non esistono ancora studi clinici che abbiano testato l'efficacia delle cellule staminali cardiache nella rigenerazione cardiaca nell'uomo.

### *Cellule derivanti dal midollo osseo e progenitori endoteliali*

Le cellule derivanti dal midollo osseo, insieme ai progenitori endoteliali (EPCs), sono state utilizzate in numerosi trials clinici (3-6).

### *Meccanismo d'azione delle cellule derivate dal sangue o dal midollo sulla funzione cardiaca*

Al momento attuale non vi sono documentate spiegazioni meccanicistiche che dimostrano il meccanismo responsabile del modesto miglioramento della funzione cardiaca post-infartuale nei pazienti trattati con cellule del midollo autologo o progenitori circolanti. È improbabile che queste cellule, dato il tipo cellulare ed il numero di cellule iniettate aumentino la funzione cardiaca rigenerando i miociti in necrosi dopo infarto. L'ipotesi più probabile è quella di un effetto "angiogenetico" o "paracrino". Il meccanismo d'azione delle cellule derivate dal sangue o dal midollo può essere attribuito alla vasculogenesi da parte dei progenitori endoteliali o delle cellule mononucleari. Un altro meccanismo possibile è legato all'effetto paracrino o all'effetto cell-help-cell delle cellule staminali mesenchimali. Questo effetto chaperone o paracrino è mediato attraverso il rilascio di fattori di crescita, proteine antiapoptotiche, proteine angiogeniche, altri fattori trofici o immunomodulanti o ancora il reclutamento e l'attivazione delle cellule staminali cardiache.

### **Impatto della terapia cellulare intracoronarica sulla funzione ventricolare sinistra in pazienti con infarto miocardico acuto**

L'infarto miocardico acuto è una delle cause maggiori di scompenso cardiaco e successiva alta mortalità nel mondo occidentale. La terapia trombolitica e l'angioplastica primaria hanno dimostrato una grande efficace terapeutica riducendo mortalità e morbilità. L'angioplastica coronarica può ristabilire il flusso coronarico normale in più del 90% dei pazienti con infarto miocardico. Terapie alternative per migliorare la disfunzione ventricolare miocardica con l'utilizzo di cellule staminali o progenitori endoteliali sono stati utilizzati come complemento della trombolisi o dell'angioplastica primaria.

Subgroup analysis determining the significance of timing of stem cell infusion following AMI, and stem cell dose administered on LVEF		
Subgroup	Weighted mean difference (95% CI)	P-value
Timing of BMSC infusion (range)		
Within 7 days (1-7 days)	1.99 (0.25, 3.73)	0.02
>7 days (7-21 days)	6.78 (2.24, 11.32)	0.003
BMSC dose administered*		
<10 <sup>7</sup> cells	1.00 (-1.77, 3.77)	0.48
<10 <sup>8</sup> cells	1.51 (-1.96, 4.98)	0.39
<10 <sup>9</sup> cells	3.60 (1.04, 6.16)	0.006
<10 <sup>10</sup> cells	6.00 (2.28, 9.72)	0.002

AMI, acute myocardial infarction; BMSC, bone marrow stem cells; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; LVEF, left ventricular ejection fraction.  
\*Measured as MNC counts.

**Tab. 1** - Adattata da Martin-Rendon E, et al. Eur Heart J. 2008; 29: 1807-18.

Il razionale per la terapia cellulare in corso d'infarto miocardico acuto deriva dall'assunto che queste cellule possono riparare o sostituire il tessuto cardiaco e vascolare. Una recente metanalisi ha analizzato 13 studi randomizzati (811 pazienti) che hanno paragonato gli effetti dell'angioplastica primaria con cellule staminali derivate dal midollo osseo autologo (autologous bone marrow-derived stem cell, BMSC) rispetto all'angioplastica primaria da sola<sup>(6)</sup>. Innanzitutto, i risultati di questi studi pubblicati hanno dimostrato un'apparente sicurezza del trattamento con BMSCs in corso d'infarto miocardico, anche se gli eventi avversi non sono stati da tutti riportati. Invece in tutti gli studi pubblicati, riportati nelle metanalisi, sono stati misurati e analizzati i volumi tele-diastolici e tele-sistolici e la frazione di eiezione del ventricolo sinistro.

Quando sono stati raggruppati tutti i risultati ottenuti dalla somministrazione di cellule di derivazione midollare, è stato dimostrato, almeno fino a 6 mesi di follow-up, che il trattamento induce un modesto miglioramento della funzione ventricolare sinistra misurata come riduzione del volume tele sistolico (-3,5%) e tele-diastolico ed un significativo aumento della frazione di eiezione (+2.99 %) del ventricolo sinistro.

La figura 1 mostra la forest plot delle differenze medie [WMD, with 95% confidence interval (CI)] della frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) nei pazienti trattati con BMSCs paragonati ai controlli. L'infusione di BMSCs migliora significativamente la LVEF del 2.99% (95% CI, 1.26, 4.72, P <0.0007). Il miglioramento della frazione di eiezione sembra essere maggiore quando le BMSCs sono state infuse >7 giorni (Tab. 1), confermando i risultati dello studio REPAIR-AMI che ha dimostrato un effetto più efficace quando somministrati dopo 6 giorni.

Lo studio TOPCARE-AMI (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction) ha paragonato la somministrazione intracoronarica di BMSCs o EPCs in pazienti con infarto miocardico acuto. I pazienti trattati con entrambi i tipi di cellule hanno avuto un simile miglioramento dell'infarct size, LVEF e perfusione coronarica. Il beneficio si è mantenuto almeno fino al dodicesimo mese. Al contrario, nel BOOST trial (Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration) la som-

ministrazione di BMSCs ha significativamente aumentato la EF a sei mesi, ma l'effetto benefico è stato perso dopo i 12 mesi.

Nello studio ASTAMI (Autologous Stem Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction) non è stato invece dimostrato un effetto benefico della somministrazione intracoronarica di BMSCs attraverso la valutazione della funzione cardiaca con MRI cardiaca, anche se la LVEF misurata mediante ecocardiografia, aumentava del 3%.

Nei vari studi pubblicati è stata osservata una considerevole eterogeneità. Ad esempio, sono state utilizzate dosi differenti di cellule e ciò ovviamente rende difficile il paragone tra gli studi. È possibile che dosi di BMSC maggiori possano essere più efficaci nel migliorare la frazione di eiezione. La figura 2 riporta la forest plot delle differenze medie della frazione di eiezione [WMD, with 95% confidence interval (CI)] nei pazienti che ricevono differenti dosi di cellule staminali derivanti dal midollo (BMSCs). È evidente la somministrazione di un numero di cellule  $>10^8$  ha dimostrato un effetto terapeutico maggiore. Inoltre bisogna sottolineare che oltre al differente numero di cellule, nei vari studi pubblicati sono stati utilizzati metodi diversi per caratterizzare i tipi cellulari, così come l'estensione dell'area infartuale è differente nei vari studi. Infine è stato ipotizzato che nei pazienti con ampi infarti e severa riduzione dell'EF il beneficio della somministrazione delle BMSCs sia maggiore.

La somministrazione di BMSCs ha ridotto, nei vari studi, il volume telesistolico del ventricolo sinistro di 4.74 mL (95% CI, 27.84 to 21.64 mL,  $p < 0.003$ ), e l'area di lesione del 3.51% (95% CI, 25.91 to 21.11%,  $P 0.004$ ) senza alterare significativamente il volume telediastolico rispetto ai controlli (vedi figure 3-5). Un altro punto ancora non chiaro è la durata d'azione della terapia cellulare. Nella maggioranza dei casi i follow-up disponibili sono limitati a sei mesi. Alcune indicazioni provenienti dallo studio BOOST, ad esempio, suggeriscono l'ipotesi che il beneficio sulla funzione ventricolare sinistra potrebbe non persistere nel tempo.

In particolare, è importante sottolineare che in nessuno degli studi sopraelencati è possibile realmente affermare che siano state iniettate cellule staminali. Infatti, solo meno dell'1% delle cellule iniettate esprimevano markers di cellule potenzialmente staminali (quali c-kit, CD34 o CD133). Di quest'ultime ad oggi non è stata ancora individuata la sottofrazione con reali caratteristiche di cellule staminali multipotenti e ancor più importante non è stato mai dimostrato se tale popolazione abbia in realtà una robusta capacità differenziativa in cellule cardiache adulte.

In conclusione, negli ultimi anni sono stati portati a termine studi clinici su un limitato numero di pazienti che hanno valutato l'effetto della somministrazione intracoronarica di cellule del midollo o progenitori endoteliali in pazienti con infarto miocardico acuto. Innanzitutto la somministrazione intracoronarica di queste cellule non ha dimostrato, sinora, un'apparente tossicità. Gli studi di meta-analisi hanno invece dimostrato che la terapia cellulare induce un modesto (+2.9%), ma significativo, miglioramento della frazione di eiezione ventricolare sinistra con una parallela significativa riduzione dei volumi telesistolici del ven-

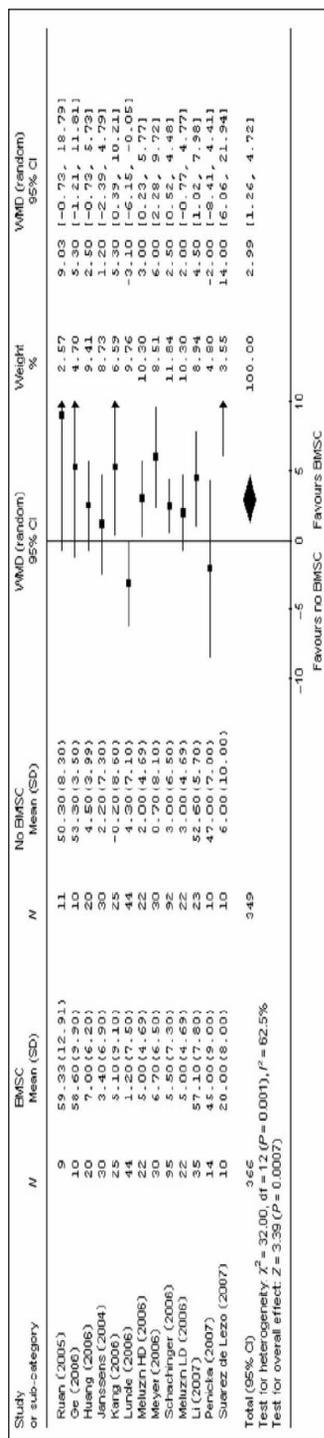


Fig. 1 - Forest plot for the left ventricular ejection fraction (LVEF). Adattata da Martin-Rendon E, et al. Eur Heart J. 2008; 29: 1807-18.

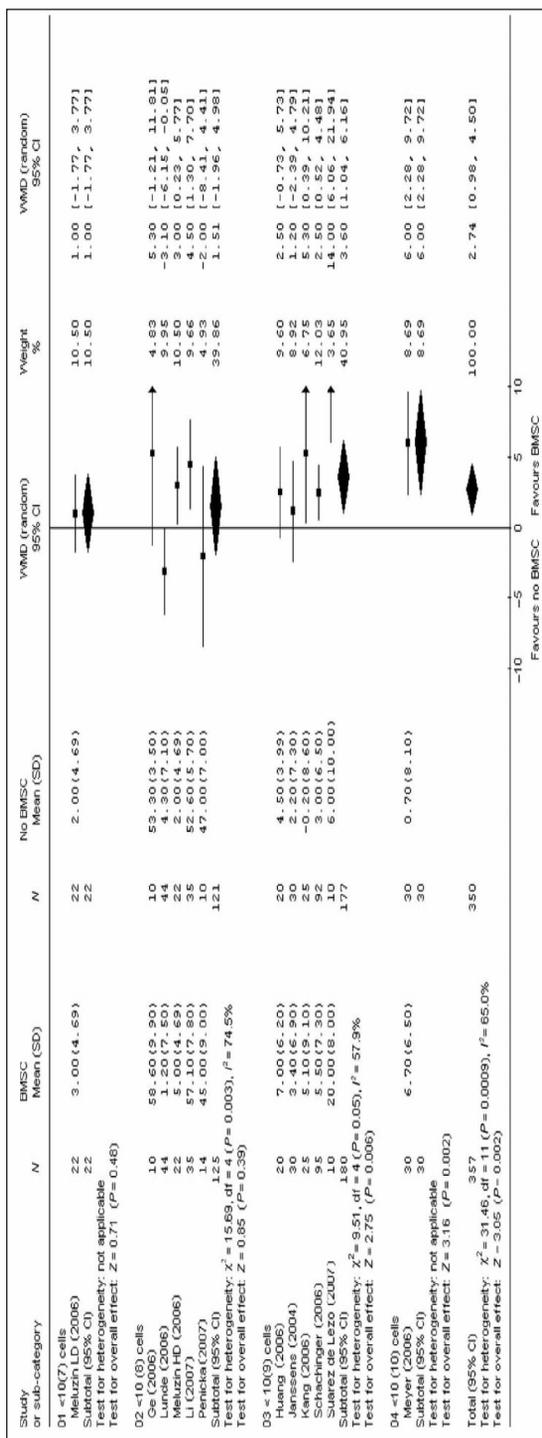


Fig. 2 - Forest plot per la left ventricular ejection fraction (LVEF) in pazienti che hanno ricevuto differenti dosi di bone marrow-derived stem cells (BMSCs) rispetto ai controlli. Le dosi di BMSC sono raggruppate per ordine di magnitudine (range da 1x107 a 2.46x109 cellule mononucleate). Adattata da Martin-Rendon E, et al. Eur Heart J. 2008;29: 1807-18.

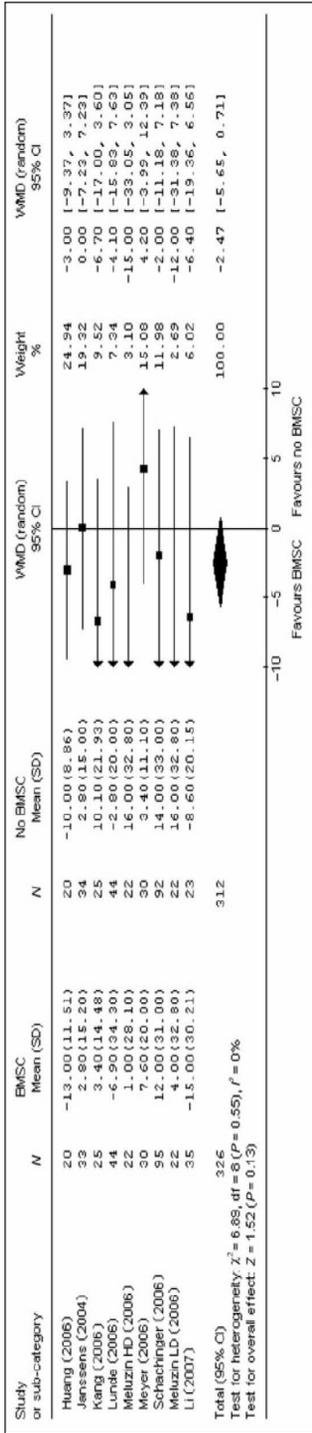


Fig. 3 - Forest plot per left ventricular end-diastolic volume (LVEDV). Adattata da Martin-Rendon E, et al. Eur Heart J. 2008;29:1807-18.

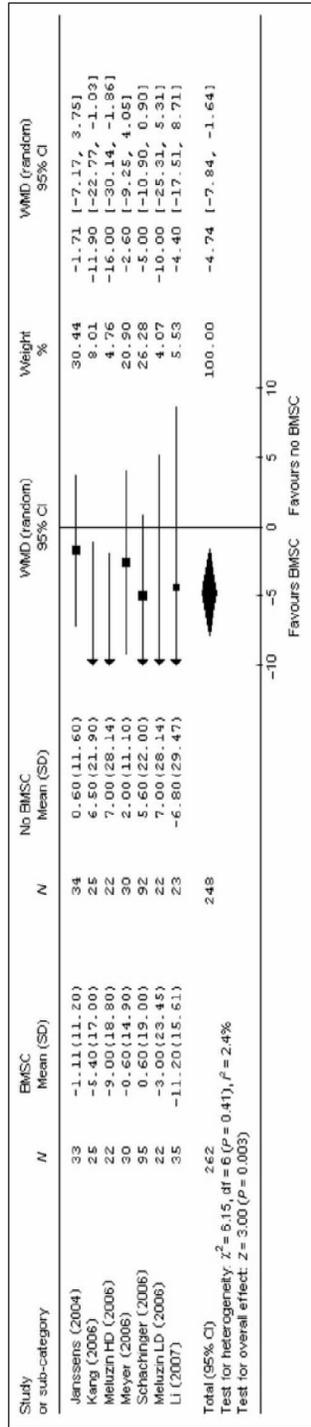


Fig. 4 - Forest plot per left ventricular end-systolic volume (LVESV). Adattata da Martin-Rendon E, et al. Eur Heart J. 2008;29:1807-18.

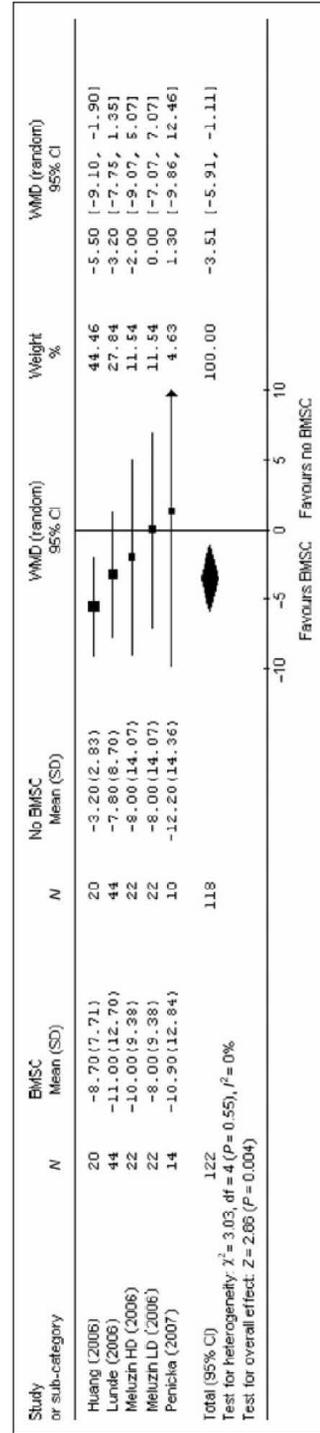


Fig. 5 - Forest plot per myocardial lesion area. Adattata da Martin-Rendon E, et al. Eur Heart J. 2008;29:1807-18.

tricolo sinistro (-4.74 mL). Rimangono molti punti ancora non chiari relativi alla terapia cellulare in corso d'infarto miocardico. Studi futuri dovranno dimostrare soprattutto il reale meccanismo d'azione, l'effettiva durata d'azione e il vero beneficio basato su end-point clinici rilevanti quali mortalità e morbilità di tale approccio terapeutico.

### **Bibliografia essenziale**

1. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest.* 2005;115:572-83.
2. Torella D, Ellison GM, Nadal-Ginard B, Indolfi C. Cardiac stem and progenitor cell biology for regenerative medicine. *Trends Cardiovasc Med.* 2005; 15: 229-36.
3. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al-Mallah M, Dawn B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007; 167: 989-97.
4. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, Vanderheyden M, Kim HS, Kang HJ, Strauer BE, Vetrovec GW. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50: 1761-7.
5. Burt RK, Loh Y, Pearce W, Beohar N, Barr WG, Craig R, Wen Y, Rapp JA, Kessler J. Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. *JAMA.* 2008; 299: 925-36.
6. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J.* 2008; 29: 1807-18.



**CELLULE STAMINALI E RIPARAZIONE  
DI ALTRI ORGANI E TESSUTI**



## Cellule staminali per riparare un danno renale

Marina Morigi, Barbara Imberti, Cinzia Rota

Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Bergamo

La capacità rigenerativa di alcuni organi in risposta ad un danno oppure a seguito del loro invecchiamento fisiologico è piuttosto limitata. Il rene ne rappresenta un esempio e il trattamento di malattie gravi quali quelle acute o croniche finora è rappresentato solamente dalla dialisi o dal trapianto d'organo. La medicina rigenerativa si propone come una alternativa terapeutica e intende sfruttare e potenziare l'abilità di alcune cellule, precursori e/o cellule staminali di sostituire le cellule danneggiate dei tessuti o di stimolare, attraverso un meccanismo paracrino, le cellule renali endogene a rigenerare. Tra le più interessanti strategie terapeutiche in via di studio c'è inoltre il trapianto di cellule e di interi organi ricostruiti *in vitro* con l'utilizzo di cellule staminali e supporti biodegradabili. La fonte cellulare più importante in questo momento sembra essere rappresentata dalle cellule staminali adulte prelevate dallo stesso paziente, quali quelle del midollo osseo, e dalle cellule staminali embrionali. Il recente sviluppo di una metodica per ottenere, da cellule adulte somatiche, cellule umane pluripotenti (inducible pluripotent stem cells, iPS) molto simili alle cellule embrionali, ha aperto la strada per ottenere cellule pluripotenti paziente-specifiche che potranno essere utilizzate evitando qualsiasi problema di rigetto nella rigenerazione dei propri tessuti. Tuttavia, l'identificazione delle condizioni che inducono la differenziazione delle cellule staminali in un organo maturo è uno dei punti focali ancora da studiare. Inoltre, la complessità anatomica del rene fa sì che quello della sua ricostruzione, utilizzando cellule proprie, rappresenti un traguardo molto ambizioso.

### Progenitori renali

Molti studi sono stati fatti per identificare la presenza di popolazioni di progenitori/cellule staminali nel rene. Rimane ancora controversa la loro localizzazione e le loro caratteristiche. Utilizzando diversi approcci metodologici (incorporazione e mantenimento a lungo termine della bromo-deossiuridina, BrdU; isolamento di

progenitori utilizzando marker espressi dal rene allo stadio embrionale) sono state identificati cellule progenitrici renali con diverse caratteristiche nel tubulo, nello spazio peritubulare, nella papilla renale e nella capsula di Bowman (1-6). Cellule staminali renali multipotenti, isolate dalla frazione tubulare di reni di ratto, che esprimevano marker come CD90, Oct4, Pax2, erano in grado di stimolare la rigenerazione renale e ridurre il danno se iniettate in animali con IRA da ischemia/riperfusione (3). Nella papilla renale, sono state isolate cellule BrdU positive, multipotenti, capaci quando iniettate di integrarsi nei tubuli danneggiati in seguito ad un danno acuto da ischemia riperfusione (5). Una popolazione diversa definita come 'side population' (per la sua capacità di non incorporare il colorante Hoechst), forse di origine ematopoietica, è stata isolata dal rene, con capacità di differenziare in diversi tipi cellulari oltre che renali (7). Inoltre, cellule CD133, isolate dal rene umano, che esprimevano in coltura marker come CD29, CD90, CD44 e CD73 e Oct4 erano in grado di differenziare in cellule endoteliali ed epiteliali (4). In topi NOD-SCID con IRA da glicerolo, tali cellule stimolavano il riparo del rene, integrandosi nei tubuli prossimali e distali. Recentemente, in reni adulti umani la capsula di Bowman glomerulare è stata identificata come una nuova nicchia per cellule staminali multipotenti positive per CD133 e CD24. Anche esse iniettate in topi immunodeficienti con IRA o trattati con adriamicina esercitavano un effetto protettivo sulla funzione e stimolavano la rigenerazione renale (6, 8).

### **Cellule staminali da midollo osseo**

I primi studi sulle cellule staminali del midollo osseo hanno messo in luce un asse tra midollo osseo e rene nei normali processi fisiologici di sostituzione di cellule tubulari senescenti e di riparo del danno sia nei modelli sperimentali che nell'uomo (9, 10). Sulla base di queste evidenze, il nostro gruppo per primo si è dedicato allo studio delle cellule staminali mesenchimali (MSC), dette anche stromali, da midollo osseo come possibile terapia cellulare nei modelli acuti e più recentemente nei modelli cronici di malattie renali. Le MSC sono cellule che producono la matrice stromale del midollo, supportano la crescita dei progenitori ematopoietici (11) e danno origine ad osteociti, condrociti e adipociti (12).

Il nostro gruppo ha dimostrato che in un topi con IRA indotta dal cisplatino, un farmaco anti-tumorale potenzialmente nefrotossico, l'infusione di cellule mesenchimali da midollo osseo di topo era in grado di migliorare la funzione renale e di preservare la struttura tubulare (13). Le cellule mesenchimali che arrivavano al rene danneggiato erano poche (1 cellula MSC/  $10^5$  cellule renali) e solo 8% di queste si trovavano all'interno dei tubuli e acquisivano un fenotipo tubulare. Il trattamento con MSC stimolava marcatamente la proliferazione delle cellule tubulari positive per il marker nucleare Ki-67, suggerendo che probabilmente le MSC esercitavano il loro effetto protettivo a livello renale soprattutto attraverso un'azione paracrina (13). Per comprendere i meccanismi alla base di questo fenomeno renoprotettivo abbiamo messo a punto in vitro un sistema di co-cultura di

MSC con cellule prossimali tubulari (PTEC) danneggiate da cisplatino (14). Le MSC proteggevano le PTEC dal danno indotto dal cisplatino promuovendo a 4 giorni la proliferazione delle cellule tubulari. Questo effetto proliferativo era mediato dall'IGF-1, un fattore altamente espresso dalle MSC. La co-coltura con MSC trasfettate con "small interfering (si) RNA" che bloccavano la traduzione dell'RNA messaggero per l'IGF-1, portava ad una significativa diminuzione della proliferazione delle PTEC danneggiate e ad un aumento dell'apoptosi di queste cellule (14). In animali con insufficienza renale acuta, l'infusione di MSC trasfettate con siRNA specifici per IGF-1 limitava il loro effetto protettivo sulla funzione renale e sulla struttura tubulare (14). Questi risultati indicano che le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo potrebbero rappresentare una valida alternativa per una futura applicazione terapeutica nell'uomo. In quest'ottica, il nostro gruppo ha studiato l'efficacia di MSC umane isolate da midollo osseo nel modello di IRA indotta in topi immunodeficienti (15). L'infusione di MSC umane diminuiva il danno renale a 4 giorni, a livello delle cellule tubulari prossimali renali, migliorava la funzione renale e riduceva significativamente la mortalità degli animali. Inoltre attraverso un meccanismo paracrino le MSC agivano localmente riducendo l'apoptosi, stimolando la proliferazione delle cellule renali tubulari, e preservando la microcircolazione renale. Il potenziale renotropico e rigenerativo delle MSC umane è stato chiaramente dimostrato, confermando che le MSC rappresentano una popolazione cellulare ideale per future terapie cellulari e per una possibile applicazione clinica in pazienti con IRA. Oltre a svolgere un ruolo fondamentale nel riparo del danno renale acuto, alcuni studi suggeriscono che le MSC possano essere in grado di esplicare un'azione anti-fibrotica e angiogenica in alcuni modelli sperimentali di nefropatie croniche come la malattia di Alport (16) e la glomerulonefrite mesangio-proliferativa (17), migliorando così la progressione verso la glomerulosclerosi. Appare quindi evidente che le MSC in virtù della loro peculiare abilità di stimolare la rigenerazione renale, insieme alla loro bassa immunogenicità e capacità di inibire la risposta immunitaria rappresentano una risorsa particolarmente interessante per la terapia cellulare nelle malattie renali.

### **Cellule embrionali ed ingegneria dei tessuti**

L'interesse per le cellule embrionali staminali si basa principalmente sulla loro capacità di proliferare indefinitamente e di differenziare in quasi tutti i tipi cellulari comprese le cellule germinali (18-20). Queste caratteristiche hanno generato numerose aspettative per la possibilità di trattare i pazienti con malattie di vario genere. Le cellule embrionali potrebbero essere quindi un'interessante fonte cellulare per il trapianto e rivoluzionare la medicina rigenerativa.

La differenziazione delle cellule embrionali in vitro passa solitamente attraverso la formazione dei corpi embrionali e la successiva esposizione a fattori di crescita e molecole note per essere importanti durante lo sviluppo dell'organo specifico. La predifferenziazione delle cellule embrionali, prima di un loro utilizzo in

vivo, è fondamentale per evitare la formazione di teratomi derivanti da cellule embrionali indifferenziate. Recentemente è stato dimostrato che cellule embrionali staminali di topo possono differenziare mediante formazione di corpi embrionali ed esposizione ad activina A in progenitori renali in grado di integrarsi in vivo nei tubuli prossimali renali (21). L'impiego delle cellule embrionali è tuttavia complicato da fattori immunologici per l'incompatibilità tra paziente e donatore. La tecnica del trasferimento nucleare permetterebbe di ottenere linee di cellule staminali embrionali pazienti-specifiche. Infatti, questa metodica prevede il trasferimento del nucleo di una cellula somatica prelevata dal paziente in un oocita enucleato. Dalla blastocisti che si ottiene viene isolato il nodo embrionale, fonte delle cellule staminali embrionali che saranno geneticamente identiche alle cellule del donatore del nucleo. Nonostante questa tecnica abbia funzionato molto bene nella sperimentazione animale, i ricercatori non sono stati in grado di ottenere risultati con cellule umane (22). Una recente metodica permette di indurre uno stato di pluripotenza nelle cellule somatiche mediante riprogrammazione diretta ad ottenere cellule staminali pluripotenti (iPS, induced pluripotent stem cells). Questo è stato dimostrato per i fibroblasti di topo che, sono stati trasfettati mediante retrovirus con quattro fattori di trascrizione, Oct-4, Sox2, c-Myc e Klf4 (23-26). Quando selezionati per la ri-espressione endogena dei geni chiave per la pluripotenza, Oct4 e Nanog, i fibroblasti embrionali erano indistinguibili dalle cellule embrionali derivate dalla blastocisti sia in termini di caratteristiche epigenetiche che di potenziale di sviluppo. Questi risultati sono poi stati trasferiti a cellule umane e usando un approccio simile è stato possibile ottenere cellule pluripotenti simili alle embrionali staminali (27-29).

Inoltre sono stati fatti progressi per migliorare la tecnica di trasfezione mediante l'impiego di adenovirus al posto dei più pericolosi retrovirus (30), e anche mediante una trasfezione di fattori di trascrizione che non includessero c-myc, un rischioso pro-oncogene (31, 32). Tale metodologia è stata attuata per differenziare le cellule iPS in cardiomiociti, neuroni, cellule che producono insulina e cellule ematopoietiche (33, 34). Neuroni generati da fibroblasti riprogrammati sono stati in grado di integrarsi e di migliorare i sintomi della malattia di Parkinson nei ratti (35). Potenzialmente queste cellule potrebbero essere indotte, nelle adeguate condizioni, a differenziare in cellule renali utili al riparo o alla ricostruzione dell'organo. Nella ricostruzione di un organo complesso come il rene l'utilizzo di cellule capaci di differenziarsi in cellule renali può essere associato all'impiego di biomateriali o supporti biologici (scaffold) adeguati a riprodurre l'intera struttura anatomica dell'organo.

A questo si dedica l'ingegneria dei tessuti. Una recente pubblicazione mostra, nel ratto, che la decellularizzazione di un organo quale il cuore mediante enzimi e soluzioni detergenti può permettere di ottenere un supporto biologico adeguato per la semina di cardiomiociti neonatali e cellule endoteliali che una volta perfusi aderiscono al supporto e ripopolano l'organo (36). La presenza di una matrice extracellulare intatta sulla superficie dello scaffold permetterà una migliore adesione e crescita cellulare. Dati preliminari hanno mostrato che cellule embrionali murine, iniettate attraverso l'arteria renale in un rene di ratto isolato e decellu-

larizzato, si localizzavano inizialmente nei vasi e poi nei tubuli acquisendo un fenotipo di cellule renali (37). Lo stesso approccio potrebbe essere applicato alle cellule iPS infatti la metodologia di derivazione delle iPS associata all'ingegneria dei tessuti potrà supportare la derivazione di cellule renali paziente-specifiche per la semina del rene decellularizzato geometricamente intatto e la ricostruzione di un organo "su misura".

## Bibliografia

1. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 14: 3138-3146, 2003.
2. Kitamura S, Yamasaki Y, Kinomura M, Sugaya T, Sugiyama H, Maeshima Y, Makino H. Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney. *Faseb J.* 19: 1789-1797, 2005.
3. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, Heremans Y, Lund T, Blackstad M, Jiang Y, Luttun A, Rosenberg ME. Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol.* 17: 3028-3040, 2006.
4. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, Camussi G. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol.* 166: 545-555, 2005.
5. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest.* 114: 795-804, 2004.
6. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 17: 2443-2456, 2006.
7. Hishikawa K, Marumo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Ichiyangi T, Kohike H, Komori T, Takahashi I, Takase O, Imai N, Yoshikawa M, Inowa T, Hayashi M, Nakaki T, Nakauchi H, Okano H, Fujita T. Musculin/MyoR is expressed in kidney side population cells and can regulate their function. *J Cell Biol.* 169: 921-928, 2005.
8. Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti M, Lazzeri E, Mazzinghi B, Ballerini L, Parente E, Becherucci F, Gacci M, Carini M, Maggi E, Serio M, Vannelli GB, Lasagni L, Romagnani S, Romagnani P. Regeneration of Glomerular Podocytes by Human Renal Progenitors. *J Am Soc Nephrol.* In press: 2009.
9. Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarajah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol.* 195: 229-235, 2001.
10. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kim Y, Rosenberg ME. A role for

- extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int.* 62: 1285-1290, 2002.
11. Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 7: 358-363, 2000.
  12. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells.* 19: 180-192, 2001.
  13. Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M, Remuzzi G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 15: 1794-1804, 2004.
  14. Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, Rota C, Corna D, Longaretti L, Rottoli D, Valsecchi F, Benigni A, Wang J, Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J Am Soc Nephrol.* 18: 2921-2928, 2007.
  15. Morigi M, Inrona M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, Rottoli D, Benigni A, Perico N, Zoja C, Rambaldi A, Remuzzi A, Remuzzi G. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells.* 26: 2075-2082, 2008.
  16. Prodromidi EI, Poulsom R, Jeffery R, Roufosse CA, Pollard PJ, Pusey CD, Cook HT. Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells.* 24: 2448-2455, 2006.
  17. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D, Floege J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 17: 2202-2212, 2006.
  18. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, 3rd, Boiani M, Scholer HR. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science.* 300: 1251-1256, 2003.
  19. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature.* 427: 148-154, 2004.
  20. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* 19: 1129-1155, 2005.
  21. Vigneau C, Polgar K, Striker G, Elliott J, Hyink D, Weber O, Fehling HJ, Keller G, Burrow C, Wilson P. Mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies generate progenitors that integrate long term into renal proximal tubules in vivo. *J Am Soc Nephrol.* 18: 1709-1720, 2007.
  22. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell.* 132: 567-582, 2008.
  23. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell.* 1: 55-70, 2007.
  24. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 448: 313-317, 2007.

25. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126: 663-676, 2006.
26. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 448: 318-324, 2007.
27. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131: 861-872, 2007.
28. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318: 1917-1920, 2007.
29. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 134: 877-886, 2008.
30. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 322: 949-953, 2008.
31. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 26: 101-106, 2008.
32. Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2: 10-12, 2008.
33. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Golland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 321: 1218-1221, 2008.
34. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 318: 1920-1923, 2007.
35. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 5856-5861, 2008.
36. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 14: 213-221, 2008.
37. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, Jorgensen M, Clapp WL, Ellison GW, Terada N, Batich CD. Tissue engineering: differentiation of murine pluripotent embryonic stem cells seeded in whole organ decellularized rat kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol*. 18: 603A (Abstract), 2007.

## Terapia cellulare per il diabete mellito di tipo 1

*Lorenzo Piemonti*

Istituto di Ricerca sul Diabete, Fondazione San Raffaele del Monte Tabor, Milano

In both type 1 and type 2 diabetes, insufficient numbers of insulin-producing beta cells are a major cause of defective control of blood glucose and its complications. Historical data indicate that between 67 and 90% of the original beta-cell mass (1) is destroyed in type-1 diabetic patients at onset, while recent studies using hyperglycemic clamp and glucagon stimulation have confirmed a 75% deficit compared to healthy control patients (2). Similarly, type-2 diabetes also presents a deficit in beta cell mass, which in later stages can be reduced by about 50% compared to a healthy individual (3).

Despite the substantial improvements in insulin therapy thanks to new commercial drugs and the adoption of intensive treatment regimens able to improve glycemic control, exogenous insulin administration cannot avoid the long-term complications of diabetes and the life expectancy of diabetic patients is still shorter compared to that of the general population (4, 5).

In principle, the treatment for type-1 diabetes and many cases of type-2 diabetes lies in the possibility of finding a beta cell mass substitute capable of performing two essential functions: assessing blood sugar levels and secreting appropriate levels of insulin in the vascular bed. Currently, the only available clinical therapy capable of restoring beta cell mass in diabetic patients is the allogenic/autologous transplantation of beta cells (somatic cell therapy with pancreas, Langerhans islets or beta cell transplantation).

Despite advances in recent years (6), allogenic somatic therapy is still problematic (for instance, the need for immunosuppression therapy and, in case of islet transplantation, the need for many donors for a single recipient and the short life of the transplantation). This has led to pay increasing attention to the potential use of stem cells, of embryonic and adult origin.

## Somatic cell therapy: islet transplantation

The possibility of islet transplantation holds a great deal of promise (7, 8). Clinical islet transplantation performed under the Edmonton protocol, a steroid-free immunosuppressive regimen first described by Shapiro et al. in 2000 (9), represented a groundbreaking innovation in the field of islet transplantation. Insulin independence with tight glycemic control was achieved for up one year following islet cell transplants in all enrolled subjects. However, in a recent publication, Shapiro *et al.* reviewed the feasibility and reproducibility of the Edmonton protocol at nine international centers, and the results were less encouraging. At one-year post islet transplant, only 44% of enrolled patients achieved insulin independence with adequate glycemic control, and 28% of enrolled subjects had achieved partial graft function with clinical improvement of diabetic control. Unfortunately, loss of islet function was observed in the majority of patients who initially achieved insulin independence (6).

There are numerous challenges currently facing the clinical application of islet cell transplantation. The first is harvesting sufficient islets for transplantation. Frequently, more than one pancreas is required in order to isolate enough islet cells to achieve insulin independence in one recipient. Islet isolation techniques and limited survival of islet grafts post-transplantation are also potential limitations of islet transplantation (7). Following islet harvest and purification, islets are currently transplanted into the portal vein, where they ultimately lodge in the liver. The exposure of islets to portal blood triggers an instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR) that causes the acute destruction of a significant portion of the transplanted islets (7, 10, 11). In addition, in the early period of implantation, localized ischemia may result from engraftment-induced islet embolism within the liver (12). Lastly, islet grafts have been shown to induce steatosis of surrounding hepatocytes (13), and there is evidence that intrahepatic transplanted islets display increased levels of glucagon unresponsiveness to hypoglycemia when compared to both islets transplanted intraperitoneally and to control animals (14). In an attempt to control IBMIR and circumvent the early complications associated with intrahepatic transplantation, low-molecular weight dextran sulfate, and surfacing coating with heparin have been suggested (15), and additional sites of implantation are being explored (16, 17).

Perhaps the most challenging problem facing clinical islet transplantation is the inexorable loss of islet function in the first 5 years post-transplantation leading to only 10% of recipients being insulin-free (18). This loss of function is not completely understood but believed to be caused by a combination of insufficient transplanted  $\beta$ -cell mass, allograft rejection, recurrent autoimmunity, incompatibility of the islet implantation site, and immunosuppressive regimens that are toxic to the islet grafts (19, 20). Although NOD mouse studies implicate recurrent autoimmunity in preventing the long-term survival of islet and pancreas allografts (21), the magnitude of this problem is less clear in humans where pancreas allografts enjoy relatively long-term survival under current immunosuppressive regimens (22). It is possible that islet allografts are more susceptible to recurrent

immunity than pancreas allografts. Immunosuppressive regimens that are non-toxic to the islet allograft have emerged as a vital component of islet cell transplantation. Indeed the success of the Edmonton protocol is attributed, at least in part, to the immunosuppressive protocol that omitted steroids, which are known to be toxic to islet  $\beta$ -cells. Nonetheless, it is possible that the current immunosuppressive strategies still have negative effects on islet graft function or are unable to completely control reactivity. Thus new strategies to reverse autoimmunity and induce long-term tolerance, including those that target co-stimulatory and adhesion molecules as well as growth factors, are being explored in mouse and non-human primate models.

### **Stem cell therapy**

Islet cell therapy is limited by the supply of islets cells available for transplantation. Stem cell therapy promises a nearly limitless and reproducible supply of transplantable and functional islets. The use of the patient's own adult stem cells would allow for the discontinuation of immunosuppression to control rejection although issues of recurrent autoimmunity would have to be resolved (23). Islets derived from allogeneic stem cells will likely elicit alloreactive immune responses that also have to be controlled. There appear to be multiple sources of stem cells capable of differentiating into  $\beta$ -cells located in the pancreas or in other organs, including the liver and intestine. In addition, the spleen, bone marrow and umbilical cord blood, as well as embryonic stem cells, are potential sources for undifferentiated cells and their ability to differentiate into  $\beta$ -cells are being explored (24).

### **Pancreatic stem cells**

The existence of the pancreatic stem cells in adults has recently become contentious, but there is substantial data to support its existence. During embryogenesis, stem cells within the pancreatic duct epithelium give rise to both the endocrine and acinar cells of the pancreas. Adult pancreatic duct cells retain the capacity for expansion and differentiation suggesting that adult pancreatic ducts may still harbor stem cells capable of differentiating into  $\beta$ -cells *in vivo*. This notion is supported by the ability of ductal tissue *in vitro* to be harvested, expanded, and cultured to form islet-like structures capable of glucose responsive insulin secretion. Several *in vitro* and *in vivo* studies (25-32) collectively support the existence of pancreatic progenitor cells residing in the adult pancreas capable of differentiating into glucose responsive insulin secreting cells that are able to maintain normoglycemia *in vivo*.

The existence of stem cells as the major source of new islets *in vivo* was recently questioned by studies of Dor et al. (33, 34). Using an approach of lineage tracing of newly forming adult  $\beta$ -cells, they reported that  $\beta$ -cell regeneration occurred primarily from the replication of existing  $\beta$ -cells during the normal maturation of a mouse, and after a 70% pancreatectomy. Their data concluded that terminally

differentiated  $\beta$ -cells retain proliferative capacity, and that these adult  $\beta$ -cells, and not stem or progenitor cells, are primarily responsible for  $\beta$ -cell regeneration and  $\beta$ -cell turnover *in vivo*. More recently, Brennand et al. (35) reported that all  $\beta$ -cells contribute equally to growth and maintenance and that no specialized subset of  $\beta$ -cells capable for replication existed in the adult mouse. Collectively, these observations stand in contrast to previous notions of neogenesis of  $\beta$ -cells from progenitor cells, located within the pancreas or from non-pancreatic compartments, as the primary source of  $\beta$ -cell regeneration *in vivo*. One argument could be that the normal growth in non-diabetic mice or following 70% pancreatectomy are not sufficient stimuli to illicit stem cell regenerative abilities, and that under specific conditions of  $\beta$ -cell destruction, stem cells may contribute more significantly to  $\beta$ -cell regeneration. Regardless of their role *in vivo*, if progenitor stem cells could be expanded and differentiated into  $\beta$ -cells *in vitro*, they could be used therapeutically in islet cell transplantation and thus remain an important area of investigation.

### **Beta cell differentiation starting from non-pancreatic stem/progenitor cells: mesodermal precursors (bone marrow, umbilical cord)**

The possibility of obtaining insulin-producing cells from mesodermal precursors (bone marrow and circulating blood cells) seems to be particularly appealing for the ease to find the material and the possibility of using an autologous source. *In vitro* it has been seen in different models (mice, rats and humans) that cells derived from bone marrow and, in particular, mesenchymal stem cells are capable of differentiating into insulin-producing cells and, in some cases, of reversing diabetes in animal models (36-40). Similarly, mesenchymal stem cells derived from fatty tissue (41) and subpopulations of monocytes derived from circulating blood (42, 43) have shown the ability to express insulin. In general, insulin expression levels reported for these models are low.

*In vivo* the studies aimed at assessing bone marrow contribution in pancreatic regeneration have reported contradictory results. Ianus et al. (44) reported that bone marrow contains cells with the ability to differentiate into competent beta cells *in vivo* thus demonstrating that 1.7-3% of pancreatic beta cells originate in bone marrow 4-6 weeks after bone marrow transplantation in mice. This data was not confirmed, though, by other teams and following studies have reported much lower frequencies (0.004%) or even a total absence of regeneration phenomena in beta cells of bone marrow origin (45-47). In addition, more in general, evidence that cell fusion rather than differentiation lies at the root of many processes of apparent differentiation of bone marrow into ectodermal or endodermal tissues makes these studies even more controversial (48, 49).

Recently, the potential role of bone marrow in beta cell regeneration has been reassessed from a different point of view. While direct differentiation is highly unlikely (50), a wide array of experimental evidence indicates that cells of bone marrow origin are capable of facilitating the endogenous regeneration of beta cells (48, 51-55) probably through the differentiation of endothelial precursors

and the induction of the c-Met/HGF pathway (56). These results have been recently corroborated by evidence that the infusion of mesenchymal stem cells in NOD/Scid mice after islets destruction using streptozotocin can increase the number of endogenous beta cells with the consecutive improvement of hyperglycemia (57).

Alongside bone marrow, some studies have reported that it is possible to use umbilical cord as a source of stem cells in diabetes therapy. The existence of mesenchymal stem cells or with embryonic traits in umbilical cord blood has been reported (58, 59) and some papers have described the possibility of differentiating cells expressing markers typical of endocrine cells (Isl-1, PDX-1, Pax-4 and Ngn3) (60) or capable of producing insulin starting from the umbilical cord (61-63). In type-1 and 2 diabetes murine models mesenchymal cells of umbilical cord origin have proven to be capable of influencing the survival of beta cells and glycemic control (64, 65).

### **Beta cell differentiation starting from embryonic stem cells**

Embryonic stem cells (ES), compared to all other potential beta cell resources, offer some advantages in theory: these can be derived from the same patient, have an unlimited ability to expand and, when inserted in the proper context (for instance, the embryo during development), are capable of yielding all types of body cells including beta cells. The first trial to have reported the generation of insulin-producing cells starting from murine embryonic stem cells dates back to 2000 (66). Using a cell trapping system, Soria et al. was able to obtain an insulin-secreting cell clone starting from undifferentiated ES cells. Cell clusters obtained from the clone, once transplanted in diabetic mice, have proven to be capable of inducing normoglycemia, although the number of insulin-positive cells obtained was rather small.

The possibility of obtaining structures similar to islets with the ability to secrete insulin in a regulated manner both *in vitro* and *in vivo* was then demonstrated by other teams in mice (67-72), monkeys (73) and humans (74-79). However, research in this field is rather controversial. In general, the generated cells are few and they do not have significant insulin content and physiologically regulated secretion. For some studies, it has been demonstrated that the insulin-positive cells generated by ES cells are actually not capable of synthesizing *de novo* insulin, but the positivity is allegedly due to the uptake of insulin from the culture medium (80, 81). Moreover, Milne et al. suggested that murine ES cells rapidly differentiate in extra-embryonic endoderm thus hypothesizing that the derived insulin-positive cells are not genuine beta cells (82). More in general, a crucial limitation to the use of ES cells in diabetic patients is the potential carcinogenicity (68, 69, 83). Besides scientific issues, there are many ethical issues related to the use of material of embryonic origin. Anyhow recent substantial advances in the field of the differentiation of human embryonic stem cells into beta cells (76, 84) suggest this approach as one of the most promising alternatives for future cell therapy applied to diabetes.

## Conclusions

This tremendous therapeutic potential has made research on stem cells to treat diabetes a sector of great interest. Nonetheless this field is rather controversial and difficult. Much information is still lacking on the molecular mechanisms and pathways of the signals controlling the expansion and differentiation of stem cells into insulin-producing beta cells. Many results have been achieved in animal models and from cell lines and it is still unclear whether primary human cells can be manipulated in the same manner. The generation of insulin-producing cells has not always been assessed with rigorous criteria and mere insulin expression is by no means adequate to determine a cell as being a beta cell. There are difficulties concerning in-vivo human models that can allow us to assess the growth and proliferation of beta cells and the control of carcinogenicity. Finally, it should not be underestimated that both type-1 and type-2 diabetes mellitus is not characterized by acute damage to beta cells (ischemia-like), which, while leading to the death of cells, vanishes in the course of time. Both insulin resistance and autoimmunity remain unvaried unless these, too, are modified in therapeutical terms and any therapy with new beta cells is destined to fail in the short term if it is not accompanied by the correction of the primary pathogenic noxa. Nonetheless, it can be assumed that in coming years cell therapies for diabetes mellitus will find new sources of insulin-producing cells thanks to studies in the field of stem cells.

## Bibliografia

1. Faber OK, Binder C, Diabetes. 1977; 26: 605-10.
2. Keymeulen B, et al., N Engl J Med. 2005; 352: 2598-608.
3. Butler AE, et al. Diabetes. 2003; 52: 102-10.
4. Hu FB, et al. Arch Intern Med. 2001; 161: 1717-23.
5. Franco OH, Steyerberg EW, Hu FB, Mackenbach J, Nusselder W. Arch Intern Med. 2007; 167: 1145-51.
6. Shapiro AM, et al. N Engl J Med. 2006; 355: 1318-30.
7. Rother KI, Harlan DM. J Clin Invest. 2004; 114: 877-83.
8. P. Witkowski, SB, Zakai, A. Rana, Z. Sledzinski, MA Hardy, Ann Transplant. 2006; 11: 5-13; discussion 32-43
9. Shapiro AM, et al. N Engl J Med. 2000; 343: 230-8.
10. Moberg L, et al. Lancet 2002; 360: 2039-45.
11. Piemonti L, et al. Diabetes 2002; 51: 55-65.
12. Yin D, et al. Am J Transplant. 2006; 6: 60-8.
13. Markmann JF, et al. Diabetes 2003; 52: 1591-4.
14. Gupta V, et al. Diabetes 1997; 46: 28-33.
15. Bennett BD, et al. Curr Biol 1996; 6: 1170-80.
16. al-Abdullah IH, Anil Kumar MS, Kelly-Sullivan D, Abouna GM. Cell Transplant. 1995; 4: 297-305.
17. Gustavson SM, et al. Am J Transplant. 2005; 5: 2368-77.
18. Ryan EA, et al. Diabetes. 2005; 54: 2060-9.

19. Braghi S, et al. *Diabetes*. 2000; 49: 218-24.
20. Jaeger C, Brendel MD, Hering BJ, Eckhard M, Bretzel RG. *Diabetes*. 1997; 46: 1907-10.
21. Okitsu T, Bartlett ST, Hadley GA, Drachenberg CB, Farney AC. *Am J Transplant*. 2001; 1: 138-45.
22. Ming CS, Chen ZH. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007; 6: 17-23.
23. Street CN, et al. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 667-83.
24. Lu P, et al. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007; 78: 1-7.
25. Seaberg R.M, et al. *Nat Biotechnol*. 2004; 22: 1115-24.
26. Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. *Diabetes*. 2004; 53: 2143-52.
27. Hao E, et al. *Nat Med*. 2006; 12: 310-6.
28. Ramiya VK et al. *Nat Med*. 2000; 6: 278-82.
29. Bonner-Weir S, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 7999-8004.
30. Yatoh S, et al. *Diabetes*. 2007; 56: 1802-9.
31. Kim BM, et al. *Diabetologia*. 2006; 49: 311-20 .
32. Heremans Y, et al. *J Cell Biol*. 2002; 159: 303-12.
33. Dor Y. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006; 2: 242-3.
34. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. *Nature*. 2004; 429: 41-6.
35. Brennand K, Huangfu D, Melton D. *PLoS Biol*. 2007; 5: e163
36. Jiang Y, et al. *Nature*. 2002; 418: 41-9.
37. Tang DQ, et al. *Diabetes*. 2004; 53: 1721-32.
38. Chen LB, Jiang XB, Yang L, World J, *Gastroenterol*. 2004; 10: 3016-20 .
39. SH Oh LB, et al. *Lab Invest*. 2004; 84: 607-17.
40. Moriscot C, et al. *Stem Cells*. 2005; 23: 594-603.
41. Timper K, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 341: 1135-40.
42. Zhao Y, Glesne D, Huberman E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 2426-31.
43. Ruhnke M, et al. *Gastroenterology*. 2005; 128, 1774-86.
44. Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA, *J Clin Invest*. 2003; 111: 843-50.
45. Lechner A, et al. *Diabetes*. 2004; 53: 616-23.
46. Choi JB, et al. *Diabetologia*. 2003; 46: 1366-74.
47. Taneera J, et al. *Diabetes*. 2006; 55: 290-6.
48. Wang X, et al. *Nature*. 2003; 422: 897-901.
49. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. *Science*. 2002; 297: 2256-9.
50. Butler AE, et al. *Diabetes*. 2007; 56: 1810-6.
51. Luo L, Badiavas E, Luo JZ, Maizel A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 361: 859-64.
52. Hasegawa Y, et al. *Endocrinology*. 2007; 148: 2006-15.
53. Mathews V, et al. *Diabetes*. 2004; 53: 91-8.
54. Li FX, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 12935-40.
55. Banerjee M, Kumar A, Bhonde RR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 328: 318-25.
56. Izumida Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 333: 273-282.

57. Lee RH, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 17438-43.
58. Hutson EL, Boyer S, Genever PG. *Tissue Eng*. 2005; 11: 1407-20.
59. Zhao Y, Wang H, Mazzone T. *Exp Cell Res*. 2006; 312: 2454-64.
60. Pessina A, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 323: 315-22.
61. Yoshida S, et al. *Stem Cells*. 2005; 23: 1409-16.
62. Denner L, et al. *Cell Prolif*. 2007; 40: 367-80.
63. Sun B, Roh KH, Lee SR, Lee YS, Kang KS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 354: 919-2.
64. Ende N, Chen R, Reddi AS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 321: 168-71.
65. Ende N, Chen R, Reddi AS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 325: 665-9.
66. Soria B, et al. *Diabetes*. 2000; 49: 157-62.
67. Lumelsky N, et al. *Science*. 2001; 292: 1389-94.
68. Blyszczuk P, Wobus AM. *Methods Mol Biol*. 2006; 330: 373-85.
69. Hori Y, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 16105-10.
70. Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B. *Diabetologia*. 2004; 47: 1442-51.
71. Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. *Diabetes* 2004; 53: 1030-7.
72. Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y, Miyazaki S, Miyazaki J. *Diabetes* 2003; 52: 1163-8.
73. Lester LB, Kuo HC, Andrews L, Nauert B, Wolf DP. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004; 2: 42.
74. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. *Stem Cells*. 2004; 22: 265-74.
75. Baharvand H, Jafary H, Massumi M, Ashtiani SK. *Dev Growth Differ*. 2006; 48: 323-32.
76. D'Amour KA, et al. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1392-401.
77. Jiang W, et al. *Cell Res* 2007; 17: 333-44.
78. Shim JH, et al. *Diabetologia* 2007; 50: 1228-38.
79. Jiang J, et al. *Stem Cells* 2007; 25: 1940-53.
80. Rajagopal J, Anderson WJ, SKume, Martinez OI, Melton DA. *Science* 2003; 299: 363.
81. Hansson M, et al. *Diabetes*. 2004; 53, 2603-9 (Oct, 2004).
82. Milne HM, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 328: 399-403.
83. T. Fujikawa, et al. *Am J Pathol*. 2005; 166: 1781-91.
84. D'Amour KA, et al. *Nat Biotechnol*. 2005; 23: 1534-41.

## **Ruolo delle cellule staminali mesenchimali nella terapia della sclerosi laterale amiotrofica**

*Franca Fagioli<sup>1</sup>, Ivana Ferrero<sup>1</sup>, Katia Mareschi<sup>1</sup>, Deborah Rustichelli<sup>1</sup>, Madalina Mereuta<sup>1</sup>, Alessandro Vercelli<sup>2</sup>, Letizia Mazzini<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Centro Trapianti Cellule Staminali e Terapia Cellulare, SC Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Infantile Regina Margherita di Torino.

<sup>2</sup>Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Forense, Università di Torino.

<sup>3</sup>Dipartimento di Neurologia, Ospedale Maggiore della Carità di Novara, Università del Piemonte Orientale

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), conosciuta anche come Morbo di Lou Gehrig o malattia di Charcot, è una patologia degenerativa del sistema nervoso centrale che interessa selettivamente i motoneuroni sia centrali (a livello della corteccia cerebrale), sia periferici (a livello del tronco encefalico e del midollo spinale). La morte progressiva e irreversibile dei motoneuroni si traduce sul piano clinico in una progressiva plegia di tutta la muscolatura spinale e bulbare, che si manifesta con disfagia, disartria, perdita del controllo dei muscoli scheletrici fino all'exitus generalmente determinato dalla insufficienza respiratoria nell'arco di 2 o 5 anni dall'esordio (1). L'eziopatogenesi della malattia è al momento attuale sconosciuta e non vi sono terapie in grado di modificarne il decorso. La più comune forma di SLA è quella sporadica (90-95%), mentre circa il 10% dei casi è di origine familiare ed è dovuta a difetti nel gene chiamato superossido dismutasi 1 (SOD1). Le mutazioni del gene SOD1 determinano la formazione di una proteina tossica per i motoneuroni. La SLA si manifesta in individui con un'età superiore ai 20 anni, ma l'età tipica dell'esordio per entrambe le forme è dai 50-60 anni. L'incidenza di tale patologia è 2 casi ogni 100000 abitanti l'anno. Le cause della SLA sono ancora sconosciute, ma comunque è stato accertato che si tratta di una malattia multifattoriale. Sono state identificate alterazioni della funzionalità cellulare dei motoneuroni, come un'iperattività dovuta ad un eccesso di glutammato, alterato metabolismo del calcio, alterato trasporto assonale e attivazione di proteasi e nucleasi. Sono stati evidenziati molti fattori che potrebbero indurre questi fenomeni cellulari come agenti virali, tossine ambientali (insetticidi e pesticidi) e reazioni autoimmuni dovute ad eccesso di anticorpi (2).

I trials clinici farmacologici, attualmente in corso, mirano da un lato a ridurre i

danni neuronali utilizzando fattori di crescita nervosi e dall'altro a preservare l'integrità cellulare residua attraverso l'utilizzo di farmaci ad azione antiossidante. I risultati, soddisfacenti nei modelli sperimentali sono assai poco confortanti nell'uomo. Nelle ultime ricerche sulla SLA, molto interesse è stato focalizzato su processi infiammatori e attivazione della microglia (3), quindi sul microambiente piuttosto che sui motoneuroni stessi (4).

La terapia cellulare con cellule staminali può rappresentare un nuovo approccio terapeutico nella SLA (5). Recenti studi hanno evidenziato che il trapianto di cellule staminali potrebbe avere effetti benefici piuttosto che sostituendo i motoneuroni danneggiati, migliorando il microambiente (6-7) e producendo fattori trofici (8).

Per studiare la capacità delle CSM isolate da midollo osseo di differenziare in senso neurale abbiamo condotto studi *in vitro* e *in vivo*. In particolare, negli studi *in vitro*, abbiamo studiato le CSM, isolate dal midollo osseo di donatori sani ed espanse *in vitro*, dal punto di vista morfologico, immunocitochimico, molecolare ed elettrofisiologico in condizioni basali e dopo trattamento con 3 differenti condizioni sperimentali già presentate in letteratura e una nuova condizione sperimentale costituita da Neural Progenitor Maintenance Medium (NPMM) contenente Fattore di Crescita Fibroblastico basale (FGFb) umano, Fattore di Crescita Epidermico (EGF), Fattore di Sopravvivenza Neuronale (NSF), per 2-3 settimane. I dati più interessanti sono stati ottenuti coltivando le CSM in NPMM, dove le cellule acquisivano nuove caratteristiche morfologiche, l'espressione di marcatori prima non presenti quali GFAP e NSE e nuove proprietà elettrofisiologiche mostrando l'espressione di correnti associate a canali del K<sup>+</sup> "ether-à-go-go" del tipo heag1 e heag2, necessari per la sopravvivenza e il differenziamento neuronale (9).

Per comprendere il potenziale di sopravvivenza, migrazione e differenziamento in senso neurale delle CSM *in vivo*, abbiamo impiantato CSM umane marcate con bisbenzimidide a livello del midollo spinale in topi transgenici per il gene della Superossidodismutasi1 (SOD1), usati come modello sperimentale della SLA. L'analisi immunostochimica mostrava la presenza di cellule marcate con bismenzimidide lungo l'asse cranio caudale del midollo spinale anche distanti dal sito di inoculo. In nessun animale analizzato le CSM formavano masse tumorali anche a distanza di 20 settimane dall'inoculo. È stata osservata la presenza di cellule marcate con bisbenzimidide positive per MAP-2 e GFAP. Nelle femmine dove la progressione della malattia è più lenta rispetto ai topi maschi, nei topi trapiantati rispetto agli animali di controllo si osservava una riduzione dell'astrogliosi e della microgliosi reattiva con un aumento della conta dei motoneuroni. I test comportamentali mostravano, inoltre, un miglioramento significativo della performance dopo trapianto intraspinale di CSM umane nei maschi trapiantati rispetto ai controlli (10).

Presso il nostro Centro sono stati effettuati due protocolli sperimentali di fase I che prevedono l'utilizzo di CSM autologhe isolate da midollo osseo in pazienti affetti da SLA. Le CSM vengono isolate mediante stratificazione su gradiente Percoll, espanse *in vitro* in MSC medium (Cambrex, USA), e al momento del-

l'utilizzo staccate, risospese in liquor cerebrospinale autologo e impiantate a livello del midollo spinale a seguito di una laminectomia. Prima dell'impianto le CSM sono state valutate per la sterilità, l'immunofenotipo, la citogenetica e la lunghezza del telomero per evitare qualsiasi problema di contaminazione o trasformazione durante l'espansione in vitro. La scelta innovativa di trapiantare le cellule direttamente nel midollo spinale permette alle CSM di superare la barriera emato-encefalica e agire direttamente nel tessuto danneggiato. CSM isolate da midollo osseo di donatori sani e pazienti affetti da SLA sono state analizzate per espansione, immunofenotipo, vitalità, sterilità, senescenza cellulare, cariotipo e potenziale differenziativo: non sono emerse differenze significative tra i due gruppi (11). Nel primo studio pilota, abbiamo verificato su 7 pazienti affetti da SLA, la fattibilità e la buona tollerabilità dell'impianto di cellule staminali mesenchimali autologhe nel midollo spinale, ed un rallentamento della progressione della malattia già dopo 3 mesi dal trapianto. Nessun paziente ha mostrato eventi avversi legati all'impianto cellulare e neoformazioni cellulari nella sede dell'impianto cellulare (12-14). Nel secondo protocollo sono stati arruolati 10 pazienti affetti da SLA, La procedura di espianto di midollo osseo è stata ben tollerata da tutti i pazienti e il numero medio di cellule raggiunto dopo espansione e trapiantato è stato pari a  $74.7 \times 10^6 \pm 32.2$ . Non vi sono stati eventi avversi intraoperatori o anestesiológicos, mentre le reazioni avverse osservate nel post-intervento erano di grado I e II (OMS grade) e sono tutti regrediti dopo un tempo massimo di 15 giorni. Le indagini neuroradiologiche seriate non hanno mostrato segni di danno parenchimale del midollo spinale riferibili a crescita anomala delle cellule o a danno chirurgico. Dall'analisi delle curve di progressione delle scale cliniche e funzionali si segnala in 3 pazienti, tra quelli con follow-up post-intervento di almeno 9 mesi, un rallentamento nella progressione dei parametri respiratori e muscolari. Pertanto le CSM possono rappresentare una buona fonte cellulare per intraprendere nuove strategie terapeutiche di terapia cellulare per le malattie degenerative o post-traumatiche.

### **Bibliografia essenziale**

1. Rowland LP, Shneider NA,. Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med* 2001; 344: 1688-1700.
2. Pasinelli et al. Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 2004; 43: 19-30.
3. Boillé S, Yamanaka K, Lobsiger C. et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006; 312: 1389-1392.
4. Borchelt DR. Amyotrophic Lateral Sclerosis-Are Microglia Killing Motor Neurons?. *N Engl J Med* 2006; 12: 1611-1613.
5. Morrison KE. Therapies in amyotrophic lateral sclerosis-beyond riluzole. *Curr. Opin. Pharmacol* 2002; 2: 302-309.
6. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M,

- McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW. Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science* 2003; 302: 113-117.
7. Corti S, Locatelli F, Donadoni C, Guglieri M, Papadimitriou D, Strazzer S, Del Bo R, Comi GP. Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* 2004; 127: 2518-2532.
  8. Hemendinger R, Wang J, Malik S, Persinski R, Copeland J, Emerich D, Gores P, Halberstadt C, Rosenfeld J. Sertoli cells improve survival of motor neurons in SOD 1 transgenic mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol* 2005; 196: 235-243.
  9. Mareschi K, Novara M, Rustichelli D, Ferrero I, Guido D, Carbone E, Medico E, Madon E, Vercelli A, Fagioli F. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K<sup>+</sup> channel types. *Exp Hematol.* 2006 Nov; 34(11): 1563-72.
  10. Vercelli A, Mereuta OM, Garbossa D, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* 2008; 31: 395-405.
  11. Ferrero I, Mazzini L, Rustichelli D, et al. Mesenchymal stem cells from healthy donors and sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis patients. *Cell Transplant* 2008; 17: 255-66.
  12. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, et al. Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 2006; 28: 523-6.
  13. Mazzini L., Mareschi K, Ferrero I, et al. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci* 2008; 265: 78-83.
  14. Mazzini L, Vercelli A, Mareschi K, Ferrero I, Testa L, Fagioli F. Mesenchymal stem cells for ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler* 2008; 11: 1-2.





Tipografia Viscontea  
Via Riviera, 39 - 27100 Pavia  
Tel. 0382/526253 r.a. - Fax 0382/423120

