

## Cellule staminali

Ogni giorno il corpo umano sostituisce milioni di cellule specializzate che muoiono per vecchiaia, per malattia o non svolgono adeguatamente la loro funzione.

Le cellule specializzate che muoiono sono sostituite da cellule specializzate simili che originano da cellule staminali adulte non ancora differenziate e che si differenziano all'occorrenza (stimolo ambientale) nel tipo di cellula da sostituire.

Questo capitolo non intende essere una fonte approfondita per conoscere le cellule staminali, bensì una guida per costruire le basi di questa nuova frontiera della conoscenza umana: la capacità di due gameti di originare un intero universo di oltre 200 diversi tipi di tessuto presenti nel corpo umano ci spinge a chiederci quali possano essere le possibilità terapeutiche che l'uomo metterà a frutto, apprendendo i meccanismi di totipotenza che sono alla base di queste cellule.

### Cenni storici

La parola cellula staminale venne usata per la prima volta dall'istologo Alexander Maksimov nel 1909 in un congresso di ematologia a Berlino (1), postulando l'esistenza di cellule staminali emopoietiche. Come spesso accade, bisogna però aspettare molti decenni per vedere pubblicati i primi studi su queste cellule.

Le prime ricerche cominciarono dopo la II guerra mondiale, osservando gli effetti che l'irradiazione aveva provocato sui residenti di Hiroshima e Nagasaki. Quella parte di cittadini che non era deceduta immediatamente per l'esposizione all'irradiazione, moriva lentamente per l'insorgenza di infezioni e disturbi coagulativi provocati dall'insufficienza midollare.

Nel 1956 il primo trapianto di midollo osseo nel topo irradiato dimostrò che nel midollo sono contenute cellule staminali (2).

Nel 1960 Joseph Altman e Gopal Das (3) presentano prove di neurogenesi adulta e di attività da parte di cellule staminali nel cervello: quanto affermano contraddice il dogma di Cajal che escludeva la possibilità di formazione di nuovi neuroni.

Nel 1961 McCulloch e Till dimostrarono l'esistenza di cellule *self-renewing* nel midollo osseo di topi (4, 5, 6) e l'anno dopo Kleinsmith (7) dimostrò l'esistenza di cellule staminali nel carcinoma embrionale o nel teratocarcinoma, capaci di rimanere indifferenziate in coltura e di specializzarsi, in presenza di terreni particolari, in cellule di molti tessuti. Questi lavori indicarono i paradigmi concettuali che ancora oggi la comunità scientifica impiega per progettare ricerche ed applicazioni cliniche.

Solo quattro anni dopo venne eseguito con successo il primo trapianto di sangue ottenuto dal midollo osseo (contenente cellule staminali emopoietiche) per curare una SCID (immunodeficienza combinata grave) (8).

Si deve quindi alla grande tradizione degli studi ematologici (9) l'aver indicato la strada che ha portato all'attuale enorme interesse per un possibile impiego terapeutico delle cellule staminali nella cura di un vasto spettro di patologie sulla base delle straordinarie potenzialità differenziative delle cellule staminali (10) isolate da adulto, da cordone ombelicale, da feto, da gonadi fetali (cellule embrionali germinali, EGSCs) e dall'embrione preimpianto (cellule staminali embrionali, ESCs). Le cellule staminali somatiche (non embrionali) già assicurano alcune importanti applicazioni per il trattamento di leucemie e dei grandi ustionati.

Per la medicina rigenerativa del futuro sarà determinante lo sviluppo di strategie tese all'ottenimento di grandi quantità di cellule staminali da impiegarsi nella pratica clinica. Difficoltà di tipo tecnico (per il prelievo e per l'espansione in coltura) per le staminali somatiche e di tipo tecnico ed etico per

le ESCs e le EGSCs costituiscono però dei limiti ad un più vasto impiego terapeutico delle cellule staminali.

1. Alexander A. Maximow The lymphocyte as a stem cell, common to different blood elements in embryonic development and during the post-fetal life of mammals. Lecture with a demonstration, held at a special meeting of the Berlin Hematological Society on 1 June 1909 (Tradotto dal tedesco). *Folia Haematologica* 8.1909, 125-134 (L'originale in tedesco).
2. Thomas ED, Loechte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957; 257(11): 491-6.
3. Joseph Altman e Gopal Das. Autoradiographic and Histological Evidence of Postnatal Hippocampal Neurogenesis in Rats. *J. COMP. NEUR.* 1965,1, 24: 319-336.
4. Till JE, McCullough EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-222.
5. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol.* 1963;62:327-336.
6. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963;197:452-454.
7. Kleinsmith LJ, Pierce GB, Jr. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 1964;24:1544-1551.
8. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* 1968;2:1366-1369.
9. Little MT, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer* 2002;2:231-238.
10. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:S745-S753.

### Concetti di base delle cellule staminali

Le cellule staminali si definiscono come precursori cellulari immaturi dotati della capacità di auto-rinnovamento (*self-renewal*) e della grande potenzialità di differenziazione multilineare.

La cellula staminale è una cellula non differenziata, capace di replicarsi indefinitamente.

Attraverso una divisione cellulare asimmetrica definita “mitosi bivalente”, la cellula staminale dà origine a due cellule figlie, di cui una identica a se stessa, scarsamente proliferante, ed in grado di mantenere invariato il *pool* di cellule staminali di quel tessuto, l'altra è capostipite di una popolazione di cellule che a loro volta danno luogo a cellule mature differenziate e sempre più specializzate ovvero ai tessuti distinti (1).

Le cellule staminali assicurano in questo modo la formazione e il rinnovamento tissutale tramite la sostituzione delle cellule che terminano il loro ciclo vitale o che vengono lesionate, danneggiate e che vanno incontro a morte.

Nell'adulto la capacità proliferativa delle cellule indifferenziate è diversa nei tessuti che, per tale motivo, presentano differente capacità di rinnovamento e nell'istologia classica vengono distinti in tessuti labili, stabili e perenni.

Molte ricerche a partire dagli anni '90 hanno rilevato caratteristiche prima inaspettate, come la capacità di alcune cellule staminali adulte di trasformarsi in cellule di tessuti diversi da quelle a cui appartengono (transdifferenziazione).

In sintesi, la cellula staminale è caratterizzata da:

- capacità di auto-rinnovamento
- vitalità a lungo termine
- potenzialità di differenziamento multilineare.

1. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of stemness. Exp Hematol 2004;32:585-598

## Tipi di cellule staminali.

In base alla capacità di generare qualsiasi tipo di tessuto, oppure alcuni o uno soltanto, le cellule staminali si dicono rispettivamente totipotenti o pluripotenti e unipotenti.

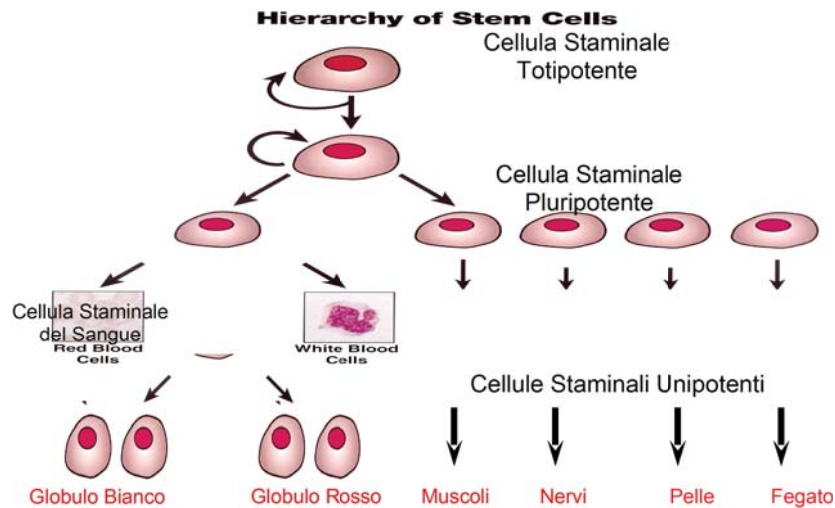


Fig. 00: Schema differenziativo della cellula staminale, dallo stadio di otipotenza fino alla differenziazione fenotipica finale.

**Cellule Staminali Totipotenti:** cellule staminali in grado di differenziare in ogni tessuto embrionale ed extraembrionale. Queste cellule derivano da embrioni allo stadio di 4-8 cellule, dopo 1-3 giorni dalla fecondazione;

**Cellule Staminali Pluripotenti:** cellule embrionali allo stadio di blastocisti, dopo 4-14 giorni dalla fecondazione. Queste cellule sono capaci di differenziare in tessuti di origine embrionale organizzati nei tre diversi foglietti germinali (ectoderma, mesoderma ed endoderma);

**Cellule Staminali Germinali:** sono cellule staminali pluripotenti (cellule riproduttive progenitrici). Nell'embrione post-impianto e poi nel feto sono ancora molte le cellule staminali presenti, anche se difficile è il loro isolamento.

Queste cellule rappresentano lo stadio di differenziamento che precede la formazione delle gonadi e compaiono nell'embrione di topo e umano, alla 1° e 3° settimana di sviluppo, rispettivamente. Se isolate, queste cellule sono in grado, come le cellule staminali embrionali, di replicarsi illimitatamente in vitro mantenendo capacità differenziative pluripotenti.

**Cellule Staminali Multipotenti:** sono cellule che hanno la capacità di moltiplicarsi e di mantenersi in coltura, ma non quella di rinnovarsi in modo illimitato. Differenziano in tessuti diversi ma appartenenti allo stesso foglietto embrionale. Appartengono a tale categoria le cellule staminali adulte.

**Cellule Staminali Unipotenti:** presenti nei tessuti adulti, potenzialmente più limitate nonché organo-specifiche, sono in grado di auto-rinnovarsi e di differenziare nel tipo cellulare del tessuto di appartenenza, assicurandone la riparazione ed il mantenimento.

In base allo stadio evolutivo si distinguono in cellule staminali embrionali, fetali, da cordone ombelicale e adulte. Da alcuni anni possiamo anche parlare di cellule staminali cosiddette riprogrammate.

In base alla provenienza, e del successivo utilizzo, le cellule staminali si definiscono autologhe ed eterologhe. Una cellula staminale autologa è una cellula prelevata da un animale (quale l'uomo) e successivamente impiantata sullo stesso come in un auto-trapianto. Le cellule eterologhe, a differenza, sono rappresentate dalle cellule prelevate da un animale e impiantate su un altro.

## Premesse embriogenetiche

### Da zigote a blastocisti

Lo zigote una volta formatosi va incontro ad una serie di divisioni mitotiche e segmentazioni che portano il numero delle sue cellule da due (mediamente 35 ore dopo la fecondazione) sino ad otto, con intervalli di circa 10 ore tra una divisione mitotica e la successiva. Queste cellule, dette blastomeri, sono scarsamente adese fra di loro, formano quindi una massa poco , e sono più piccole ad ogni segmentazione successiva. A partire dalla terza divisione mitotica, i blastomeri, ancora contenuti all'interno della zona pellucida, iniziano a sviluppare strutture di adesione simili alle giunzioni serrate, aumentando quindi il contatto reciproco e formando una massa cellulare più compatta. Tale processo è denominato compattazione. Fino a questo stadio i blastomeri possono essere considerati cellule staminali totipotenti, dato che sono teoricamente in grado di dare origine a tutti i tipi di cellule presenti nell'organismo adulto e alle cellule della placenta.

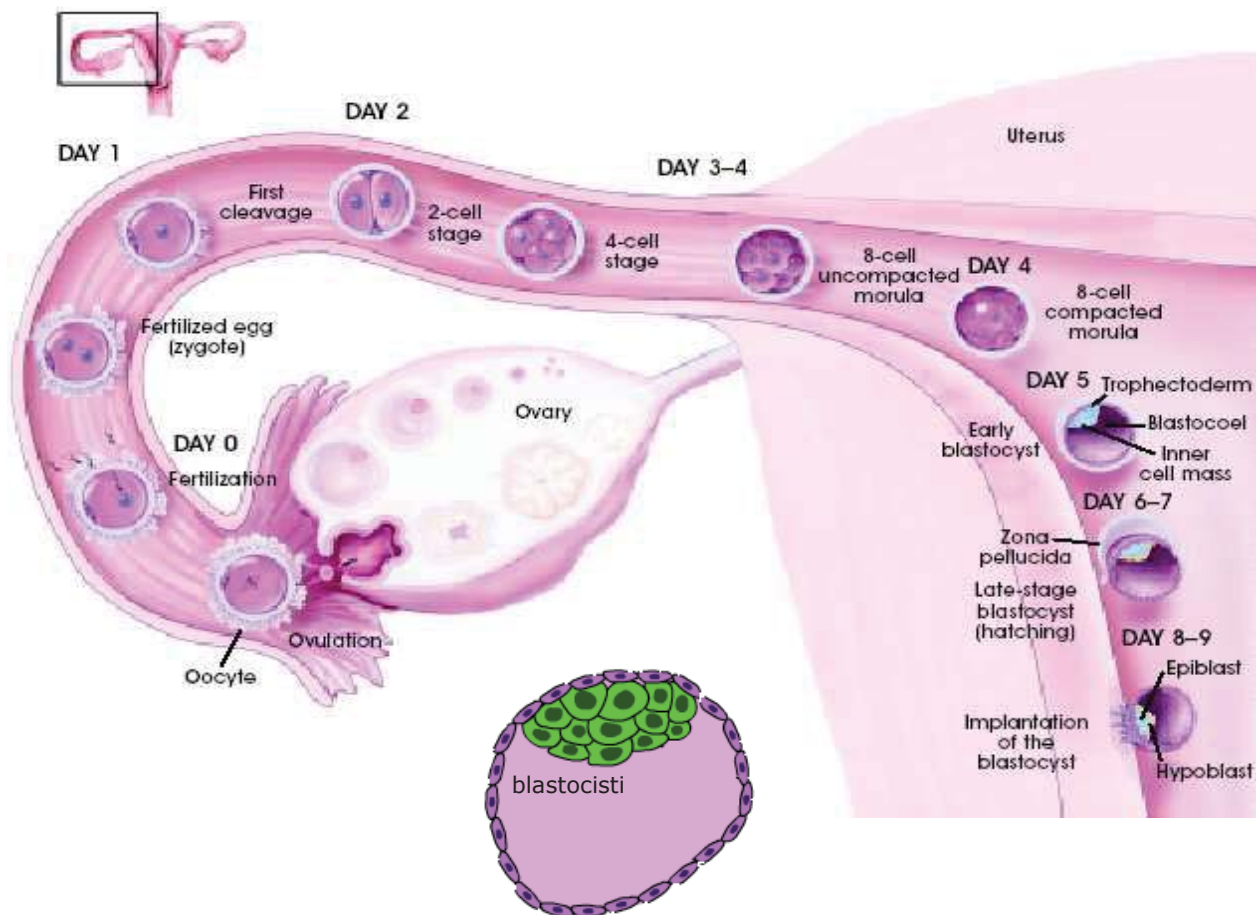


Fig. 1: Evoluzione cellulare nei primi giorni dopo la fecondazione.

Al terzo giorno dalla fecondazione, lo stadio embrionale ad otto cellule va incontro ad un'ulteriore divisione mitotica che lo porta a formare una massa cellulare a 16 cellule, detta morula. Le sue cellule più interne sono denominate massa cellulare interna e possiedono giunzioni intercellulari più compatte, saranno destinate a specializzarsi nei tessuti

dell'embrione, mentre la massa cellulare esterna che le circonda possiede giunzioni più deboli e andrà a costituire prima il trofoblasto e poi la placenta.

*Il quarto giorno* la morula entra nella cavità uterina tra il corno dell'utero e il fondo dell'utero, del liquido penetra attraverso la zona pellucida e negli spazi intercellulari della massa cellulare interna che si allargano sempre di più ed infine si fondono a costituire una cavità interna detta blastocele. Da questo momento in poi l'embrione viene denominato blastocisti.

*Il quinto giorno* il blastocele si amplia sempre di più, tanto che ad un polo della blastocisti è delimitato solamente da un unico strato di cellule epiteliali piatte, derivato dalla massa cellulare esterna, che prende il nome di trofoblasto, l'altro polo è invece formato internamente dagli embrioblasti, derivanti dalla massa cellulare interna, che sono a contatto con il blastocele, ed esternamente da un paio di strati di cellule cuboidali appartenenti allo stesso trofoblasto. Contemporaneamente la blastocisti perde la zona pellucida, che si dissolve.

Il sesto giorno la blastocisti tramite il suo polo embrionale entra in contatto con la parete edematosa dell'endometrio che si trova in fase secretiva. Le integrine poste sulla membrana plasmatica delle cellule cuboidali del trofoblasto si legano ai corrispondenti recettori sull'epitelio cilindrico uterino, permettendo l'aggancio della blastocisti, coadiuvate dalle proteine della matrice laminina e fibronectina, la prima favorisce l'attacco, la seconda aiuta la blastocisti nella migrazione.

*Il settimo giorno* la blastocisti si appiattisce, per **favorire** l'attacco alla parete uterina aumentando la superficie di adesione, dopodiché alcune cellule del trofoblasto si specializzano, assumendo una forma allungata, e iniziano ad insinuarsi tra le cellule epiteliali uterine.

*L'ottavo giorno* sempre più cellule del trofoblasto si specializzano invadendo epitelio e stroma uterino, si distinguono così due popolazioni cellulari trofoblastiche, l'una, formata dalle cellule che hanno invaso la parete uterina, mostra confini cellulari indefiniti o poco definiti ed elementi multinucleati, ed è detta sinciziotrofoblasto, la seconda, da cui queste cellule hanno origine, è il citotrofoblasto, composto da cellule cuboidali, che circonda gli embrioblasti. Le cellule del sinciziotrofoblasto non mostrano alcuna attività mitotica ma derivano tutte da precursori del citotrofoblasto che si specializzano perdendo la membrana plasmatica e fondendosi con il resto degli elementi multinucleati. Oltre al trofoblasto, si differenziano in due strati anche gli embrioblasti. Il primo strato, più esterno, formato da cellule cuboidali, è detto ipoblasto e darà origine alle cellule del sacco vitellino, il più interno invece è detto epiblasto, ed è formato da cellule cilindriche ed allungate nella sua porzione rivolta verso l'ipoblasto e da piccole cellule appiattite o cuboidali nella sua porzione rivolta verso il citotrofoblasto. Queste ultime sono dette amnioblasti e assieme alle cellule dello stesso epiblasto circondano la cavità amniotica che nel frattempo si è formata all'interno di quelli che erano gli embrioblasti. A questo stadio vi sono perciò due cavità, il blastocele o cavità blastocistica, circondato perlopiù dalle cellule appiattite e cuboidali del citotrofoblasto e dall'ipoblasto, e la cavità amniotica, più interna, circondata dalle due tipologie cellulari dell'epiblasto. Epiblasto ed ipoblasto formano una struttura a disco piatto che successivamente si svilupperà nell'embrione.

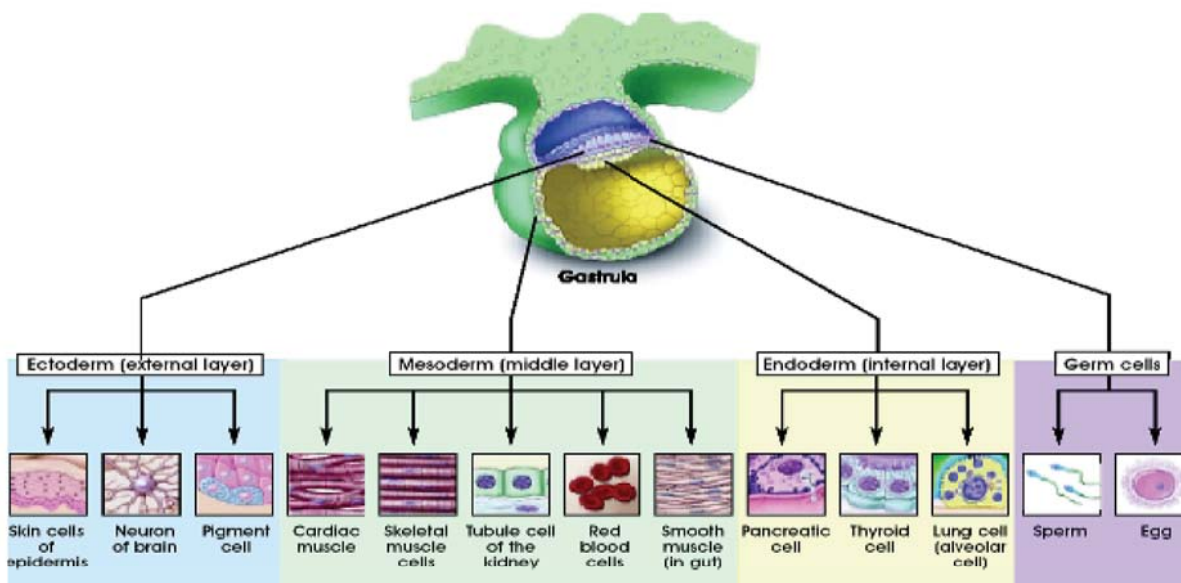


Fig. 2: Successivamente allo stadio della blastocisti le cellule della massa interna cominciano a differenziarsi verso ogni linea cellulare necessaria allo sviluppo di un organismo completo

Al nono e decimo giorno la blastocisti è ormai inclusa quasi totalmente nell'endometrio, ed un coagulo di fibrina chiude la comunicazione con la cavità uterina presso il polo opposto a quello dell'epiblasto. Il sinciziotrofoblasto continua ad ingrandirsi e ad insinuarsi velocemente nello stroma uterino e al suo interno iniziano a comparire delle lacune che si fanno sempre più numerose. Il citotrofoblasto si ispessisce tutt'attorno al blastocele ma rimane comunque formato da più strati cellulari solo verso il polo embrionale. Le cellule dell'epiblasto sono sempre più allungate e la cavità amniotica al loro interno si espande.

Dal foglietto embrionale più esterno detto ectoderma si differenzia tutto l'apparato tegumentario e quello nervoso, quindi pelle, sistema nervoso centrale e periferico. Curiosamente la ghiandola surrenale ha la sua parte midollare composta da cellule post gangliari modificate che producono catecolamine come l'adrelanina, e deriva dall'ectoderma. La cosa curiosa è che la corteccia deriva invece dal mesoderma.

Dal foglietto più interno detto entoderma si genera l'apparato digerente e le ghiandole relative (quindi fegato e pancreas)

Dal foglietto intermedio detto mesoderma origina tutto il resto: ghiandole varie, apparato circolatorio, cuore incluso, muscoli, apparato urinario inclusi i reni, tessuto connettivo.

### Le cellule staminali embrionali

Al termine dello sviluppo embrionale, prima dell'impianto, la blastocisti risulta composta da due principali linee cellulari: le cellule più esterne del trofoectoderma, da cui origineranno gli annessi extraembrionali (placenta, sacco amniotico e cordone ombelicale) e un gruppetto di cellule interne, la massa cellulare interna (ICM, *inner cell mass*), dalle quali avrà origine l'embrione vero e proprio.

La blastocisti rappresenta la fase in cui è possibile una raccolta relativamente facile di cellule embrionali, in quanto esse hanno ancora legami piuttosto lassi tra di loro (1).

Le cellule della ICM sono, per il breve tempo che precede la gastrulazione, pluripotenti e se prelevate in tempo, disgregate e coltivate in presenza di fibroblasti, citochine e LIF (*leukemia inhibitory factor*) (2) possono moltiplicarsi sino a formare delle colonie di hESCs o *embryonic human stem cells* o *cellule staminali embrionali* con caratteristiche di totipotenza, proprietà clonogeniche e facilità a rinnovarsi (*self renewing*), crescere ed espandersi in coltura (1, 3, 4).

In genere per la raccolta e le successive colture di ESC umane vengono utilizzate blastocisti originate in seguito a pratiche di fecondazione assistita, inutilizzate e congelate (embrioni soprannumerari ( "*spare*" ), oppure da cellule germinali primordiali provenienti da embrioni di 5-9 settimane (1, 5).

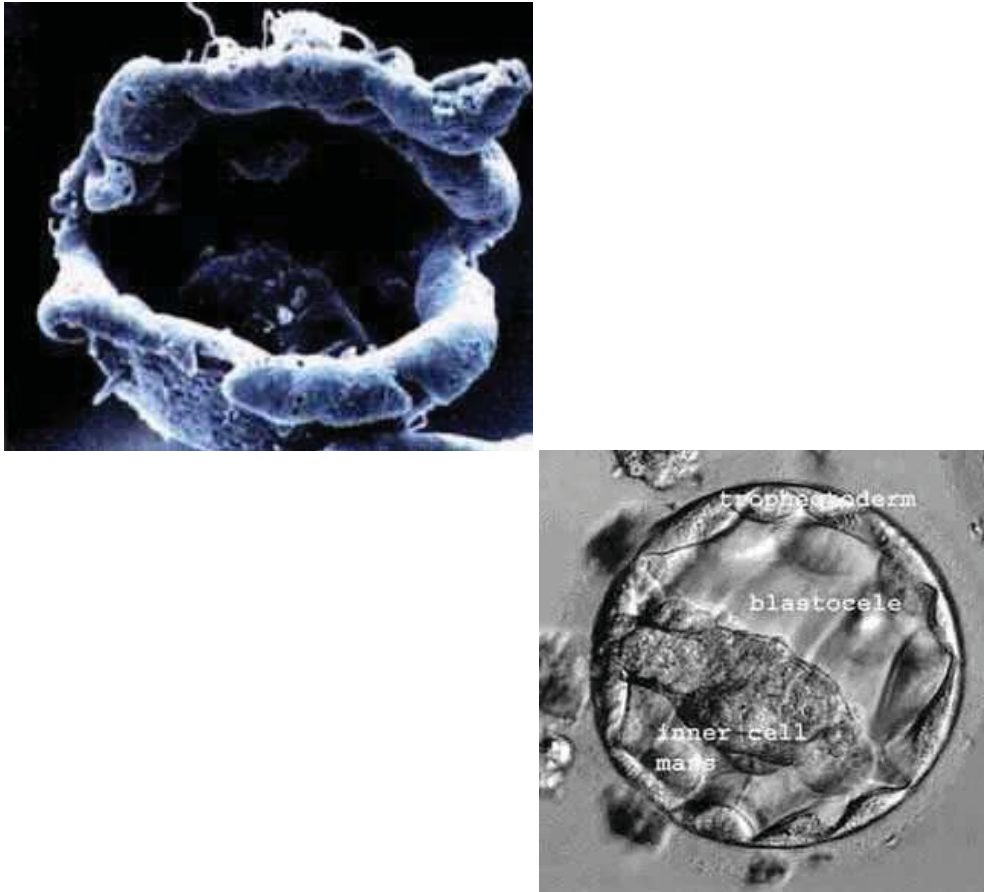


Fig. 3: La blastocisti nel suo interno presenta un ammasso di cellule con caratteristiche di totipotenza, le cellule staminali embrionali.

La metodologia di isolamento delle ESC è rimasta pressoché invariata dai primi anni in cui venivano condotti questi studi e consiste nella rimozione del trofoblasto esterno della blastocisti che lascia scoperta la massa cellulare interna poi piastrata su un feeder layer di cellule mitoticamente inattive.

Dopo alcuni giorni di coltura da poco più di una decina di cellule isolate dalla singola blastocisti se ne possono ottenere migliaia. Queste cellule, se mantenute in condizioni ottimali, continueranno a proliferare rimanendo indifferenziate ed in uno stato diploide, se invece le condizioni di coltura verranno modificate, tenderanno a differenziarsi spontaneamente (3, 4).

Infatti quando le hESCs vengono rimosse dai feeder layers e trasferite in sospensione, iniziano a differenziarsi in aggregati multicellulari tridimensionali, composti da cellule differenziate ed indifferenziate, chiamati corpi embrioidi. Esperimenti di differenziazione in vitro hanno dimostrato che una volta piastrati i corpi embrioidi si compongono di una notevole varietà di tipi cellulari morfologicamente diversi (6): cardiomiociti con contrazione ritmica, cellule neuronali con assoni e dendriti in crescita, cellule mesenchimali ed altri tipi cellulari ancora. Il completo spettro di sviluppo potenziale delle hESCs si rivela quando queste cellule vengono iniettate in vivo in blastocisti ospiti o in topi SCID (7) dove formano teratomi benigni composti da tessuti originati da cellule altamente differenziate e rappresentative dei tre foglietti germinali (ectoderma: epiteli neuronali; mesoderma: osso, cartilagine, muscolo striato, tubuli renali; endoderma: epiteli intestinali).

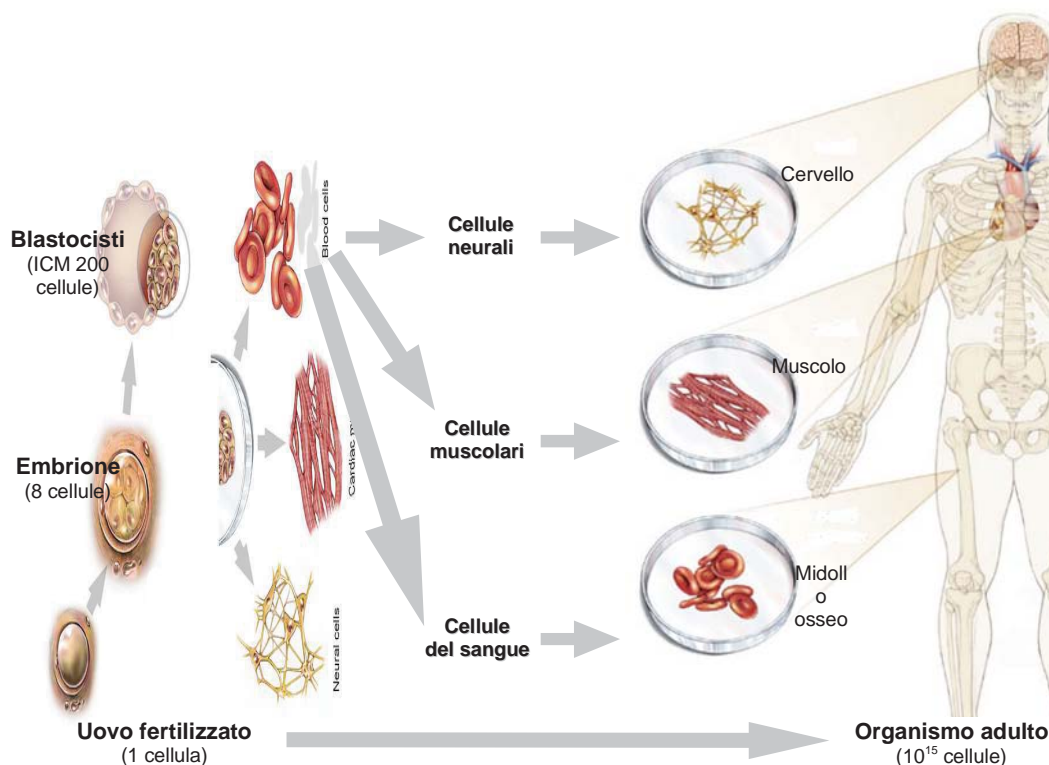


Fig.: 4: Le hESCs si differenziano fino a formare l'organismo adulto

Le ESC presentano un distintivo profilo antigenico caratterizzato da elevati livelli di espressione di antigeni embrionali, quali SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 (8), fosfatasi alcalina oltre che presentare elevati livelli di telomerasi, una ribonucleoproteina responsabile del mantenimento della lunghezza delle sequenze telomeriche durante le divisioni cellulari e quindi dell'elevata capacità proliferativa di queste cellule (1). Infatti mentre le linee cellulari somatiche diploidi che non esprimono questo enzima a livelli abbastanza elevati entrano in senescenza replicativa dopo circa 50/80 population doublings, le ESC possono essere coltivate *in vitro* per lunghi periodi di tempo anche oltre 2 anni superando 300-450 population doublings (9).

La pluripotenza che contraddistingue questa popolazione cellulare è stata dimostrata *in vivo* iniettando le ESC in una blastocisti di ratto, dove hanno contribuito alla formazione di tutti i tessuti dando origine ad un embrione chimerico (2). Il mantenimento della pluripotenzialità richiede l'espressione di alcuni fattori di trascrizione: in particolare OCT-3, OCT-4 (Octamer-binding transcription factor) e Nanog sono considerati i principali responsabili della pluripotenzialità, anche se recenti studi hanno individuato set di numerosi geni (fino a 92) espressi solo in linee cellulari umane embrionali indifferenziate (10).

La principale applicazione potenziale della tecnologia delle cellule staminali hESCs è rivolta allo studio dello sviluppo embrionale ed a quello della scoperta di nuovi farmaci. In particolare, in farmacologia, l'abilità a far crescere popolazioni pure di specifici tipi cellulari offre un ottimo strumento per saggiare l'efficacia di nuove molecole nel trattamento di diverse patologie: si possono infatti provare centinaia e migliaia di nuovi farmaci in un tempo brevissimo e con una spesa minima rispetto ai saggi farmacologici oggi normalmente impiegati.



La caratteristica più interessante delle cellule hESCs, per i possibili sviluppi terapeutici, è la loro capacità di differenziarsi, in specifiche condizioni di coltura, in quasi tutti i tipi cellulari dell'organismo. In sintesi, dalle cellule staminali totipotenti, come menzionato sopra, originano tutti i tessuti fetali (cellule della placenta e le cellule del corpo); ESCs di topo sono state differenziate in vitro in cellule epiteliali, muscolari, nervose, epatiche, pancreatiche ed in osteoblasti ed adipociti (11).

Uno dei problemi di più difficile risoluzione è legato alla straordinaria capacità proliferativa delle ESCs che, in vivo, possono formare tumori o differenziarsi in tipi cellulari non desiderati, mentre in vitro è possibile dirigere la differenziazione delle ESCs verso uno specifico tipo cellulare. Poco noto è che l'utilizzo di hESCs comporta il contemporaneo impiego di terapie immunosoppressive. Per l'utilizzo di cellule staminali embrionali, causa di continui e talora insuperabili problemi etici, sono state recentemente elaborate negli USA apposite linee guida (12, 13).

1. Thomson JA. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282,1145-1147.
2. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336:688-690.
3. Edit Embryonic stem cells, Francis Collins and NIH. *Lancet*, 2009, 374,175.
4. Mummery C, et al. *Stem cell-scientific facts and fiction Elsevier(AP)*, 2011.
5. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13726-31
6. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001;19:193-204.
7. Thomson EM. Chromatin structure and gene expression in the preimplantation mammalian embryo. *Reprod Nutr Dev* 1996;36:619-635.
8. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, Andrews PW. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*. 2002;20(4):329-37.
9. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med* 2001; 22:149 - 164.
10. Zeng X, Miura T, Luo Y, [Bhattacharya B](#), Condie B, Chen J, Ginis I, Lyons I, Mejido J, Puri RK, Rao MS, Freed WJ Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. [Stem Cells](#). 2004;22(3):292-312.
11. Carpenter MK, Rosler E, Rao MS. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2003;5:79-88.
12. NIH National Institute of Health Guidelines on Human Stem Cell Research (NIH, Bethesda, MD, 2009: <http://stemcells.nih.gov/policy72009guidelines.htm>).
13. Lo B, et al. NIH guidelines for stem cell research and gametic donors. *Science* 327,962-963,2010.

### **Cellule staminali fetali, amniotiche, da cordone ombelicale, da placenta.**

Con la progressione della mitosi, le cellule continuano a differenziarsi e, tra la quinta e ottava settimana, avremo le cellule staminali embrionali pluripotenti (1, 2). Ciò coincide con la fine della fase embrionale; da tale fase in poi, si parla di feto (dalla nona settimana fino alla nascita). Le *cellule staminali fetali* continueranno durante tutta la fase fetale ad avere spiccatissima attività mitotica differenziandosi in modo sempre più specifico dalle cellule staminali pluripotenti possono provenire tutti i tessuti del corpo: ectoderma (neuroni, pelle), mesoderma (muscoli, cartilagine, ossa, sangue, grasso), ed endoderma (ghiandole endocrine), ma non ovviamente la placenta. Sono

dunque le cellule che in utero provvedono all'accrescimento dei tessuti, e che dopo la nascita diventeranno staminali adulte unipotenti.

*Le cellule staminali amniotiche* sono cellule staminali che si trovano nel liquido amniotico che circonda il feto durante la gestazione.

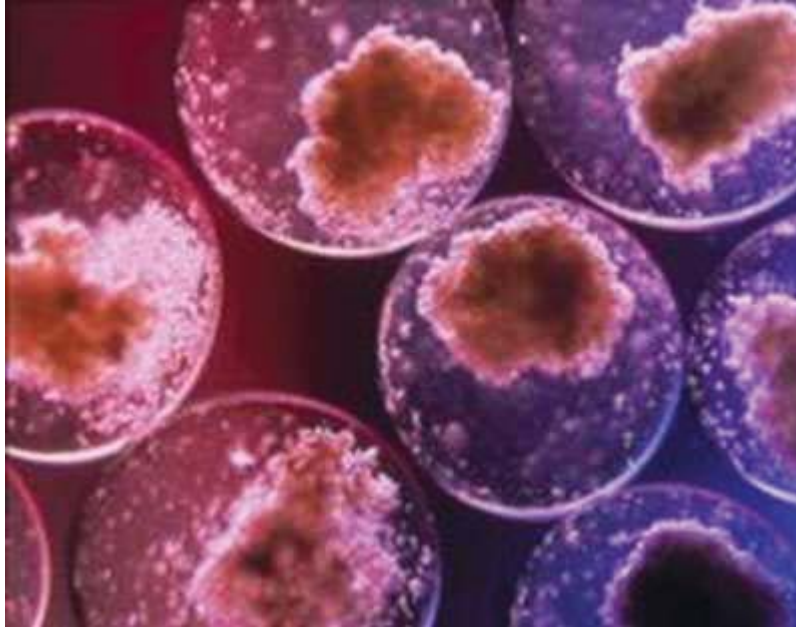


Fig. 5: Cellule prelevate per amniocentesi dal liquido amniotico

Il liquido amniotico viene prelevato a scopo di diagnosi prenatale durante l'esame facoltativo comunemente denominato amniocentesi.

Le cellule staminali amniotiche hanno caratteristiche biologiche molto simili alle cellule staminali embrionali, ma non hanno le controindicazioni di tipo etico legate alla distruzione dell'embrione. La ricerca su queste cellule è ancora in una fase molto precoce e sembra poter avere buone prospettive di sviluppo (3, 4, 5, 6).

La notizia della scoperta che le cellule staminali contenute nel liquido amniotico hanno caratteristiche biologiche molto simili a quelle embrionali è del 2007, quando ricercatori dell'Università di Harvard e dell'Istituto di Medicina dell'Università di Wake Forest, nella Carolina del Nord, pubblicarono l'esito delle proprie ricerche, dimostrando che nel liquido amniotico si possono reperire cellule staminali capaci di differenziarsi, proprio come quelle embrionali, in cellule di tessuti, muscoli, nervi e ossa. e in cellule ematopoietiche, utili per la cura delle patologie del sistema del sangue. Recentemente è stato dimostrato che le cellule staminali amniotiche possono addirittura ridiventare cellule staminali embrionali, con tutte le caratteristiche biologiche delle staminali embrionali ma senza i problemi etici e di stabilità genomica delle embrionali stesse. Negli ultimi anni si sono aggiunti numerosi lavori scientifici che hanno via via arricchito le conoscenze sulle potenzialità delle cellule staminali contenute nel liquido amniotico (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

Alcuni autori sono invece ancora non convinti sulla reale efficacia terapeutica di tali cellule (18).

Il *cordone ombelicale* comincia a formarsi nel primo mese di vita del feto, quando le cellule della morula (stadio dello sviluppo dello zigote costituito da 8 a 16 cellule) che daranno origine

all'embrione si differenziano da quelle che costituiranno la placenta e gli annessi fetali (il sacco amniotico e, appunto, il cordone ombelicale).

Al suo interno ci sono tre vasi sanguigni: una vena e due arterie. La vena porta al bambino l'ossigeno e il nutrimento che provengono dal sangue della mamma, le arterie invece permettono al piccolo di eliminare le scorie. Questi tre canali sono ricoperti da un tessuto gelatinoso denominato gelatina di Wharton che costituisce l'impalcatura del cordone.

Al momento della nascita il cordone può misurare fino a 60-65 cm di lunghezza (19).

Non appena il bambino emette il primo respiro, il cordone ombelicale smette di funzionare per poi essere reciso .



Fig. 6: Sezione trasversale di funicolo ombelicale. In alto a destra e a sinistra: le due arterie ombelicali. In basso: vena ombelicale. Nel mezzo: resti dell'allantoide

Fino ad una ventina di anni fa i medici gettavano il funicolo inconsapevoli del suo valore. Numerosi studi indicano che è possibile ottenere dalla placenta e dal funicolo dei neonati a termine una quantità di cellule staminali emopoietiche, in grado di ricostituire l'emopoiesi dopo chemioterapia ablativa, che presentano, rispetto a quelle presenti nel midollo osseo, vantaggi a vario livello. La prima dimostrazione di questa possibilità risale al 1972 quando Milton e Norman Ende (20) riferirono di aver trattato un ragazzo di 16 anni affetto da leucemia acuta con il trapianto di cellule staminali emopoietiche da cordone ombelicale ottenute da 8 diversi donatori. Ma ci vollero anni perchè altri ne riconoscessero le potenzialità: nel 1989 Broxmeyer e Gluckman curarono un bambino di cinque anni affetto da anemia di Fanconi usando il sangue del cordone ombelicale della sorellina (21).

Il sangue del *cordone ombelicale* è una fonte preziosa di cellule staminali ematopoietiche utilizzabili in alternativa a quelle prelevabili dal midollo osseo per curare importanti malattie del sangue.

A causa di queste caratteristiche, in molti paesi il prelievo, la donazione e la successiva conservazione del sangue da cordone ombelicale sono diventate pratiche comuni. Le cellule staminali possono essere conservate per periodi di tempo molto lunghi (più di vent'anni) entro appositi contenitori criogenici, ove la temperatura viene costantemente mantenuta al di sotto dei  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  tramite immersione in azoto liquido o in atmosfera di vapori di azoto. I contenitori criogenici vengono conservati presso apposite strutture opportunamente attrezzate, chiamate criobanche o, più semplicemente, banche (22, 23).

La donazione del sangue del cordone ombelicale può essere per uso "eterologo" (ovvero "allogenico" o "pubblico"), quando viene messa a disposizione della comunità, oppure per uso autologo (privato) quando le cellule staminali vengono conservate per l'eventuale cura futura del neonato o uno dei suoi familiari.

Le cellule del cordone ombelicale sono interessanti per future applicazioni cliniche per:

- Facilità di ottenimento e disponibilità senza alcun rischio per il neonato e la madre.
- Criteri meno stringenti per la compatibilità HLA tra donatore e ricevente permettendo l'utilizzo del sangue placentare anche per trapianti tra soggetti non imparentati o solo parzialmente compatibili.
- Rischio ridotto di GVHD in rapporto all'incompleto sviluppo del sistema immunitario del neonato e quindi relativa immaturità delle cellule T. Il ridotto rischio sembra essere legato ad una minore espressione degli antigeni HLA di classe II. In effetti, nei casi di trapianto di sangue cordonale, la GVHD è di più lieve entità, anche quando non sussiste una perfetta compatibilità tra donatore e ricevente.
- Basso rischio di trasmissione di malattie infettive come quella da CMV dato che meno dell'1% dei neonati contrae il virus nell'utero materno.
- Le cellule staminali di origine funicolare possono essere conservate in azoto liquido (rendendole immediatamente disponibili) per lunghi periodi senza compromissione delle loro caratteristiche peculiari.

D'altra parte l'impiego attuale del sangue da cordone è riservato al trapianto in pazienti pediatrici. Con tumori solidi, linfomi, disordini autoimmuni, leucemie perché la quantità ottenibile non è tale da essere utilizzata nel trattamento di pazienti adulti anche se il potenziale di crescita nelle colture a lungo termine delle cellule staminali cordonali appare superiore a quello delle cellule di origine midollare e quindi apre la strada allo studio di metodi per aumentarne il numero. Oltre a questo problema esiste la possibilità che le cellule del sangue donato presentino difetti genetici che potrebbero provocare una malattia in chi le riceve. Tali malattie potrebbero non risultare evidenti nel donatore per mesi o addirittura anni, periodo durante il quale il sangue potrebbe già essere stato donato ad altri.

Parallelamente a quanto accaduto per lo studio del sangue midollare anche nel cordone ombelicale è stata dimostrata la presenza di cellule staminali mesenchimali e anche in questo caso tali cellule sembrano più interessanti di quelle isolate dal midollo in quanto sono più facilmente ottenibili e biologicamente più giovani. Questo rende più semplice la loro espansione in coltura e forse le rende ancora meno immunogeniche di quelle del midollo data la loro immaturità (24, 25, 26, 27).

Cellule staminali di vario tipo possono essere ottenute da *placente* (28) dove sembra esserci una riserva di cellule staminali maggiore rispetto al cordone ombelicale.

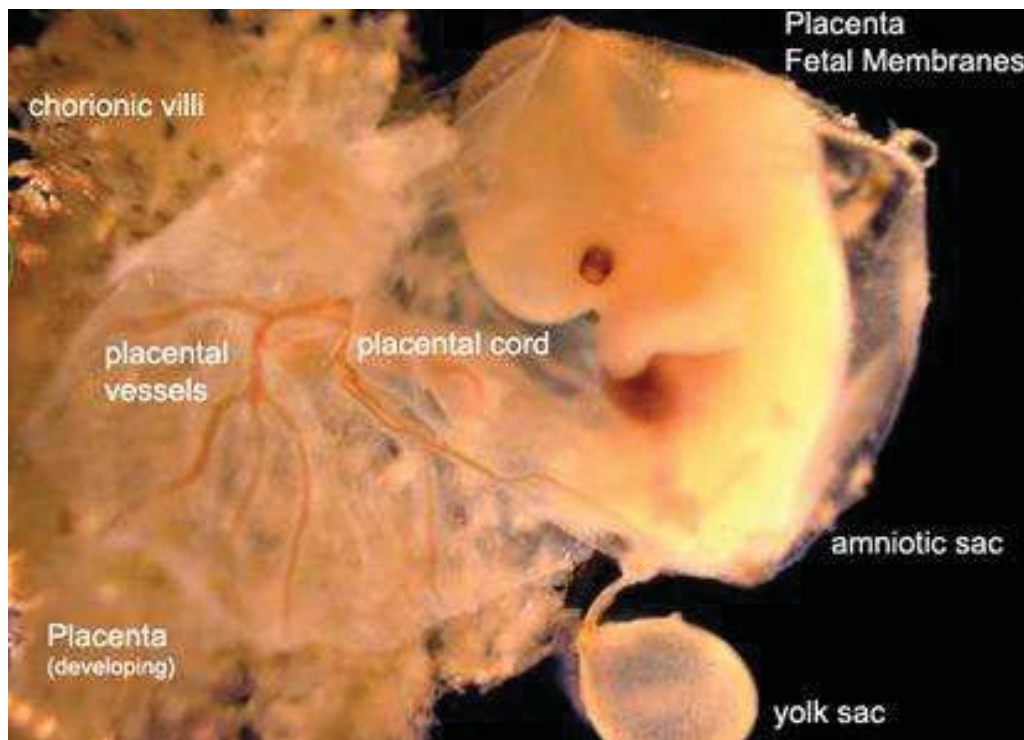


Fig. 7: Nella placenta c'è una riserva di cellule staminali maggiore rispetto al cordone ombelicale

La placenta dopo il parto potrebbe essere conservata attraverso la crioconservazione (il procedimento simile applicato al cordone ombelicale), poiché contiene una riserva di cellule staminali ancora maggiore rispetto al sangue cordonale. Uno dei motivi risiederebbe nel fatto che attraverso la placenta si attuano gli scambi metabolici tra la madre ed il feto e che lo spazio di scambio tra il sangue materno e quello fetale è minimo.

Uno studio condotto all'UCLA (University of California – Los Angeles), ha dimostrato che i primi vasi sanguigni nei quali si sviluppano le cellule staminali emopoietiche sono le arterie placentari. In questa sede avrebbe inizio la loro proliferazione per poi spostarsi in altre sedi dove espandersi e maturare in strutture cellulari differenziate. Esiste però una quota di cellule staminali, in grado di rimanere allo stadio indifferenziato e residente nel cosiddetto labirinto vascolare della placenta, dove sono sostenute dagli scambi gassosi e dai fattori di crescita (29, 30, 31).

Le cellule staminali della placenta possono essere impiegate con risultati positivi nella cura delle anemie aplastiche come in particolari applicazioni terapeutiche (32).

Una delle applicazioni più certe è la differenziazione di cellule staminali placentari in cellule muscolari e in cellule neuronali (33, 34). Nelle procedure di trapianto (35), l'impiego delle cellule staminali placentari ha un vantaggio notevole, per vari motivi:

- le cellule staminali placentari sono immature e pertanto rendono possibile un trapianto donatore-ricevente anche tra soggetti non perfettamente compatibili;
- rispetto alle cellule midollari il tempo entro il quale sono a disposizione, prima dei controlli specifici è di 30-40 giorni contro i 4-5 mesi di una donazione da midollo;
- c'è un rischio di contaminazione virale basso grazie ai controlli pre e post parto;
- possono essere conservate per periodi lunghi, in appositi contenitori con azoto liquido a -190 °C.

1. Edit Embryonic stem cells, Francis Collins and NIH. Lancet, 2009, 374, 175.

2. Mummery C, et al. Stem cell-scientific facts and fiction Elsevier(AP), 2011.
3. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. (data). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology* 25 (1): 100-106.
4. Canazi M, Atala A, De Coppi P. (2009). Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. *Reprod Biomed Online* 18 (Suppl 1): 17-27.
5. Sessarego N, Parodi A, Podesta M, Benvenuto F, Mogni M, Raviolo V, Lituanica M, Kunkl A, Ferlazzo G, Bricarelli FD, Uccelli A, Frassoni F. (2008). "Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application". *Haematologica*. 93(3): 339-346
6. Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO. (2001). "The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering." *J Pediatr Surg*. 36(11):1162-1165.
7. Ditadi A, De Coppi P et al. Human and murine amniotic fluid c-Kit+Lin- cells display hematopoietic activity. *Blood*. (23-04-2009). 113 (17): 3953-3960.
8. Steigman SA, Armant M, Bayer-Zwirello L, Kao GS, Silberstein L, Ritz J, Fauza DO. (2008). "Preclinical regulatory validation of a 3-stage amniotic mesenchymal stem cell manufacturing protocol." *J Pediatr Surg*. 43(6):1164-1169
9. Zhang P, Baxter J, Vinod K, Tulenko TN, Di Muzio PJ. (2009). "Endothelial differentiation of amniotic fluid-derived stem cells; synergism of biochemical and shear force stimuli." *Stem Cells Dev*. 18(9): 1299-1308.
10. Walther G, Gekas J, Bertrand OF. (2009). "Amniotic stem cells for cellular cardiomyoplasty: promises and premises." *Catheter Cardiovasc Interv*. 73(7): 917-924
11. Siegel N, Valli A, Fuchs C, Rosner M, Hengstschlager M. (2009). "Induction of mesenchymal/epithelial marker expression in human amniotic fluid stem cells." *Reprod Biomed Online*. 19(6): 838-846
12. Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Freilinger A, Hengstschlager M. (2008). "Human amniotic fluid stem cells: a new perspective." *Amino Acids*. 35(2): 291-293.
13. Perin L, Sedrakyan S, Da Sacco S, De Filippo R. (2008). "Characterization of human amniotic fluid stem cells and their pluripotential capability." *Methods Cell Biol*. 86: 85-99
14. Perin L, Giuliani S, Jin D, Sedrakyan S, Carraro G, Habibian R, Warburton D, Atala A, De Filippo RE. (2007). "Renal differentiation of amniotic fluid stem cells." *Cell Prolif*. 40(6): 936-948
15. Antonucci I, Iezzi I, Morizio E, Mastrangelo F, Pantalone A, Mattioli-Belmonte M, Gigante A, Salini V, Calabrese G, Tete S, Palka G, Stuppia L. (2009). "Isolation of osteogenic progenitors from human amniotic fluid using a single step culture protocol." *BMC Biotechnol*. 9: 9
16. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bettelheim D, Lubec G, Pollack A, Bernaschek G, Hengstschlager M. (2004). "Neurogenic cells in human amniotic fluid." *Am J Obstet Gynecol*. 191(1): 309-314.
17. Schmidt D, Achermann J, Odermatt B, Genoni M, Zund G, Hoerstrup SP. (2008). "Cryopreserved amniotic fluid-derived cells: a lifelong autologous fetal stem cell source for heart valve tissue engineering." *J Heart Valve Dis*. 17(4): 446-455.
18. Paolo Preziosi. Cellule staminali: il lungo e tortuoso percorso verso l'applicazione terapeutica. Il punto di vista del farmacologo. Quaderni della SIF. Anno VIII, sett. 2012, vol. 31- 41.
19. Benirschke K, Kaufmann P. Anatomy and pathology of the umbilical cord. In: Springer, ed. Pathology of the human placenta. New York; 2006.
20. Ende M, Ende N. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va Med Mon* (1918). 1972;99:276-280.
21. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic 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.
22. Minerva@bmj.com Stem cell banking of cordon blood. *BMJ* 344,52,2012
23. Edozien LC. NHS maternity units should not encourage commercial banking of umbilical cord blood. *BMJ* 2006; 333: 801-4. (14 October.)
24. Mercier IC. Current best evidence: a review of the literature on umbilical cord clamping. *MIDIRS Midwifery Digest* (June 2002), 12:2, pp 249-257.

25. Mercer JS, Skovgaard RL. Neonatal transitional physiology: a new paradigm. *J perinat Neonat Nurs.*, Mar 2002;15 (4): 56-75
26. Sanberg PR et al. Stem cell transplants at childbirth. *Stem Cell Rev.* 2010 Mar;6(1):27-30.
27. Tolosa JN et al. Mankind's first natural stem cell transplant. *J Cell Mol Med.* Mar;14(3):488-95. Epub 2010 Feb 5.
28. Parolini O. La placenta :un fonte preziosa di cellule staminali per la medicina rigenerativa. *bio FILES n.10 Lungotevere dei Vallati 10,00186 Roma.*
29. Lu G, Zhu S, Ke Y, Jiang X, Zhang S. Transplantation-potential-related biological properties of decidua basalis mesenchymal stem cells from maternal human term placenta. *Cell Tissue Res.* 2013 Feb 9. [Epub ahead of print]
30. Giakoumopoulos M, Golos TG. Embryonic stem cell-derived trophoblast differentiation: a comparative review of the biology, function, and signaling mechanisms. *J Endocrinol.* 2013 Feb 25;216(3):R33-45. doi: 10.1530/JOE-12-0433. Print 2013.
31. Nazarov I, Lee JW, Soupene E, Etemad S, Knapik D, Green W, Bashkurova E, Fang X, Matthay MA, Kuypers FA, Serikov VB. Multipotent stromal stem cells from human placenta demonstrate high therapeutic potential. *Stem Cells Transl Med.* 2012 May;1(5):359-72. doi: 10.5966/sctm.2011-0021. Epub 2012 May 8.
32. Dancis J, Jansen V, Brown GF, Gorstein F, Balis ME. Treatment of hypoplastic anemia in mice with placental transplants. *Blood.* 1977 Oct;50(4):663-70.
33. Lu GH, Yong WS, Xu ZM, Ke YQ, Jiang XD, Zhang SZ. Human placental decidua basalis-derived mesenchymal stem cells differentiate into dopamine neuron-like cells with no response to long-term culture in vitro. *Neuroreport.* 2012 May 30;23(8):513-8.
34. Park TS, Gavina M, Chen CW, Sun B, Teng PN, Huard J, Deasy BM, Zimmerlin L, Péault B. Placental perivascular cells for human muscle regeneration. *Stem Cells Dev.* 2011 Mar;20(3):451-63.
35. Jang MJ, Kim HS, Lee HG, Kim GJ, Jeon HG, Shin HS, Chang SK, Hur GH, Chong SY, Oh D, Chung HM. Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Have an Immunomodulatory Effect That Can Control Acute Graft-Versus-Host Disease in Mice. *Acta Haematol.* 2012 Dec 21;129(4):197-206.

## Cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte (Adult Stem Cells, ASCs) a differenza delle staminali embrionali, sono poche, solitamente raggruppate e localizzate in "nicchie" e difficili da isolare in gran numero da un organo (1).

Vengono isolate da tessuti ed organi specializzati e sono tradizionalmente classificate come cellule staminali multipotenti: sono cioè in grado di differenziare in un numero limitato di tipi cellulari adulti. Esse, infatti, danno principalmente origine a nuove cellule proprie del tessuto dove risiedono, mantenendo, così, il normale ricambio cellulare e l'omeostasi dell'organo. In caso di danno possono anche contribuire alla rigenerazione tissutale con cellule di nuova formazione. Ciascun tessuto pertanto sembra possedere una popolazione staminale residente che contribuisce al mantenimento del tessuto (2).

Questo tipo cellulare è l'unico ad essere fino ad ora usato a scopo terapeutico, soprattutto nella cura definitiva di numerose malattie ematopoietiche.

Nel corso degli anni sono stati individuati diversi tipi di cellule staminali adulte nei numerosi tessuti. Oggi si considera che queste cellule si possono trovare nel midollo osseo, sangue periferico, cervello, fegato, milza, cute, muscolo scheletrico, tratto gastrointestinale, pancreas, occhio, polpa dentale, tessuto adiposo, placenta, cordone ombelicale e sangue cordonale (3) e anche nel liquido amniotico (4).

Le cellule staminali adulte si dividono in cellule staminali derivanti da tessuti di origine mesodermica, ectodermica ed endodermica.

Alla prima categoria appartengono le cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSC) che hanno la capacità di ricostruire l'intero sistema ematopoietico in quanto da esse derivano tutti gli elementi corpuscolari del sangue: eritrociti, piastrine, granulociti, monociti e linfociti (B; T; NK). Le HSC sono state riconosciute come cellule staminali più di 50 anni fa (5) e sono utilizzate ormai da anni nel trattamento di numerosi disordini ematologici. Possono venire isolate dal midollo osseo, dal sangue periferico o dal sangue del cordone ombelicale.

Di origine mesodermica sono anche le cellule staminali del muscolo scheletrico, dette cellule satellite. Scoperte da Katz e Mauro nel 1961 (6), sono cellule miogeniche, multinucleate e quiescenti localizzate sulla superficie delle fibre muscolari differenziate in modo terminale, tra il sarcolemma e la membrana basale. Tali cellule normalmente non si dividono ma fungono da popolazione cellulare di riserva che in seguito a danno muscolare, è in grado di proliferare e ricapitolare il programma di differenziazione muscolare fino a differenziarsi in miofibre (7, 8).

Cellule epiteliali di origine ectodermica ed endodermica sono state identificate nel sistema nervoso, nell'epidermide, nei follicoli dei capelli, nella cornea, nell'epitelio respiratorio e in quello del canale digerente, nel pancreas e nel fegato. Queste cellule rivestono sia superfici interne che esterne e svolgono varie funzioni come la secrezione, l'assorbimento e il mantenimento dell'integrità delle superfici.

L'epidermide ad esempio, contiene, a livello della regione basale, cellule staminali (Epithelial Stem Cells, EpSC) che differenziano in cheratinociti mentre si muovono verso gli strati più esterni della pelle (9); anche le cellule presenti nell'epitelio dell'intestino si rinnovano continuamente grazie alla proliferazione ed al differenziamento di cellule staminali (Intestinal Stem Cells, ISCs) individuate nelle cripte di Lieberkuhn.

Anche a livello del tessuto nervoso ritenuto fino a poco tempo fa incapace di rigenerarsi, sono state identificate cellule staminali (Neural Stem Cells, NSCs). Le NSCs nei mammiferi sono state isolate dalla zona subventricolare dell'encefalo (10) e nel giro dentato dell'ippocampo (11).

Esse sono positive per la nestina ed in vitro, oltre che formare neurosfere, sono in grado di differenziarsi sia in neuroni che in cellule della glia (astrociti e oligodendrociti).

Nel fegato le cellule staminali residenti sono le cellule ovali (o Liver Progenitor Cells, LPC) che si trovano localizzate nell'epitelio dei canali di Hering. Tali cellule sono bipotenti in quanto possono differenziarsi in epatociti e colangiociti, cellule epiteliali del dotto biliare. Esse risultano positive per OC-2 (Oval Cell 2), OV-6 (rat oval cell marker 6) e per marker caratteristici degli epatoblasti come l'alfa-fetoproteina, la  $\gamma$ -glutamilttranspeptidasi (12).

Di recente introduzione per le cellule staminali adulte è il *concetto di plasticità* o transdifferenziazione che indica la capacità delle cellule staminali adulte di differenziare in tipi cellulari diversi non solo da quelli del tessuto nel quale risiedono ma anche di diversa derivazione embrionale.

E' stato infatti dimostrato che, se messe nelle giuste condizioni, le staminali adulte possono oltrepassare i limiti differenziativi del tessuto in cui hanno sede, e differenziare in tipi cellulari appartenenti ad altri organi. Ad esempio le cellule staminali neuronali (NSC) possono intraprendere vari iter differenziativi: se trapiantate in topi irradiati possono ricostituire l'intero sistema ematopoietico (13), possono generare cellule muscolari scheletriche in vivo, dopo trapianto nel muscolo scheletrico, o in vitro, se messe in co-coltura con mioblasti (14).

Inoltre, se iniettate nella blastocisti murina o in embrioni di pollo, possono contribuire alla formazione di più tessuti derivanti da diversi foglietti germinativi (15).

Evidenze di plasticità sono state ottenute anche per le cellule staminali muscolari, che sono in grado di dare colonie di cellule ematopoietiche (16, 17), e per le cellule staminali della cute. Queste



ultime, se iniettate nella blastocisti di topo, sono in grado di differenziare in cellule di origine mesenchimale, ectodermica e delle creste neurali (18).

La popolazione di cellule staminali adulte sulle quali si sono prodotti più studi per approfondire il fenomeno della plasticità, sono le cellule staminali che derivano dal *midollo osseo* (Bone Marrow-Derived Stem Cells o BMDSC o BMSCs). Le BMSCs sono un gruppo di cellule staminali eterogeneo composto da cellule staminali ematopoietiche e cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells o MSCs).

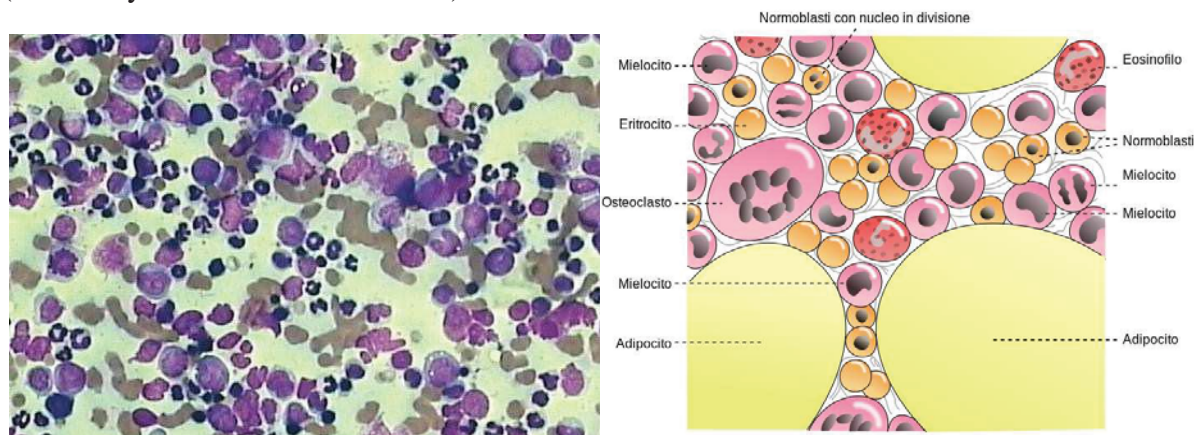


Fig. 8: Citologia al microscopio ottico del midollo osseo e sua rappresentazione schematica

Il midollo osseo, però, rappresenta anche una fonte di cellule staminali endoteliali (Endothelial Progenitor Cells o EPCs) e di una nuova popolazione di cellule staminali chiamate MAPCs (Multipotent Adult Progenitor Cells), che sembra sia in grado di differenziare in cellule provenienti da mesoderma, ectoderma ed endoderma (19).

Sono numerosi gli studi che hanno confermato la multipotenzialità di queste cellule. In presenza di adeguati stimoli, esse differenziano in adipociti (con vacuoli citoplasmatici contenenti lipidi), osteoblasti (con deposizione di cristalli di idrossiapatite), condrociti (con sintesi di matrice cartilaginea), e cellule muscolari (ricche in miotubuli) (20, 21, 22, 23).

Le BMSCs sono in grado di differenziare in molti tipi cellulari diversi: possono dare origine a cellule muscolari scheletriche (24), a precursori degli osteoblasti (25) a cellule endoteliali (26), e secondo alcuni autori, anche a cardiomiociti (27).

Ma le potenzialità differenziative delle BMSCs vanno oltre le linee cellulari di derivazione mesodermica: queste cellule staminali possono infatti dare origine a cellule neuronali (28), a cellule epiteliali (29) e a cellule epatiche (30, 31).

Oggi è generalmente accettato che le MSCs sono cellule relativamente rare nel midollo osseo (1/105 delle cellule nucleate), dotate di elevata capacità proliferativa senza trasformazione neoplastica, conservando le proprietà staminali (32,33).

Sono in grado di esprimere geni di origine embrionale, di sintetizzare molecole di contatto cellula-cellula e componenti della matrice extra-cellulare come il collagene e la fibronectina, di secernere citochine quali interleuchina (IL)-7, IL-8, IL-11, stem cell factor (SCF) e stromal-derived factor-1 (SDF-1), attraverso cui viene regolata la mobilizzazione dal midollo delle cellule staminali emopoietiche. Per questa ragione le MSCs svolgono il ruolo essenziale di compartimento omeostatico delle cellule stromali midollari, rinnovando continuamente il microambiente necessario per l'emopoiesi. Infatti, tali cellule sono in grado di supportare in vitro le colture emopoietiche a lungo termine ed è stato dimostrato che la co-infusione di MSCs e cellule staminali emopoietiche

consente un più rapido recupero ematologico dopo trattamento chemioterapico ad alte dosi rispetto alla sola infusione di cellule staminali emopoietiche.

Inoltre, data la loro derivazione dal mesoderma intra-embriionario, le MSCs sono in grado di differenziare in numerosi altri tessuti oltre a quelli delle linee osteogenica, adipogenica, condrogenica e muscolare, come cellule di origine endodermica (epatociti, pneumociti) ed ectodermica (cellule nervose, cellule gliali) (34).

E' descritta in letteratura la capacità delle MSCs midollari di differenziare in senso neurale sotto l'effetto di stimoli appropriati (35, 36, 37).

Tale pluripotenzialità è tuttavia progressivamente persa a seguito del processo di senescenza, che si documenta generalmente dopo almeno 40 raddoppiamenti di popolazione.

Altra fonte importantissima di cellule staminali mesenchimali, come vedremo meglio nel prossimo capitolo è rappresentata dalla componente stroma-vascolare *del tessuto adiposo*.

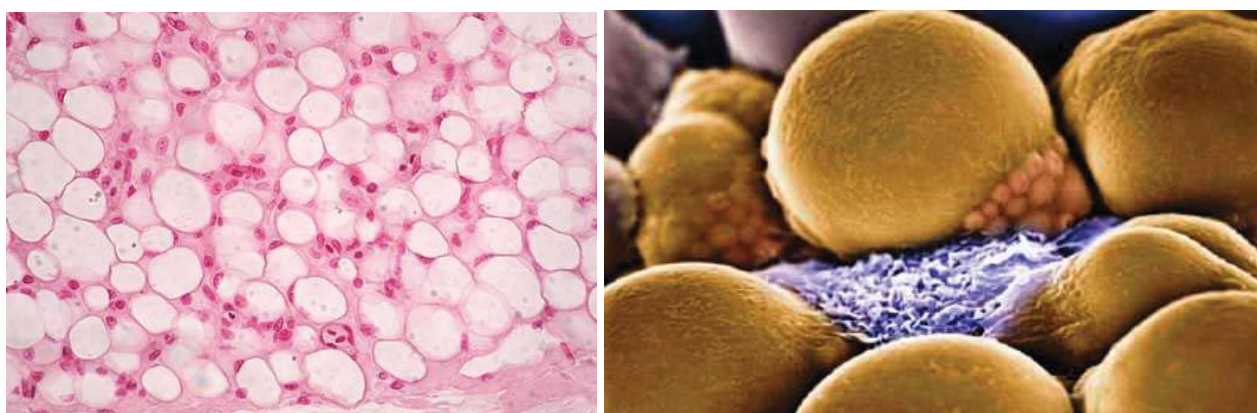


Fig. 9: Cellule provenienti dalla frazione vascolo stromale del tessuto adiposo.

Il tessuto adiposo rappresenta una ricca e facilmente accessibile risorsa di cellule staminali adulte, che costituiscono una popolazione cellulare pluripotente che può differenziarsi in cellule di vari tessuti, derivati dalla linea mesodermica (cellule del tessuto osseo, adiposo, cartilagineo, cardiaco e muscolare) e non mesodermica (cellule neuron-like, cellule endoteliali, epatociti, cellule pancreatiche).

Dai dati di bibliografia, le MSCs isolate da midollo osseo e tessuto adiposo non mostrano differenze nella morfologia simil-fibroblastica, immunofenotipo, capacità di isolamento, frequenza di unità formanti colonie e capacità differenziative. Dalla frazione vasculostromale del tessuto adiposo è infatti possibile estrarre cellule staminali, che presentano caratteristiche fenotipiche e plastiche simili alle cellule staminali mesenchimali estratte da midollo osseo (38).

Questa frazione vasculo-stromale del tessuto adiposo è composta da cellule endoteliali  $34+/CD31+$ , da macrofagi, residenti o infiltrati,  $CD14+/CD31+$ , e da precursori degli adipociti  $CD34+/CD31-$  (39).

Generalmente, le MSCs da tessuto adiposo hanno un tempo di raddoppiamento di popolazione di 2-4 giorni, dipendente dall'età del donatore, dalla localizzazione (grasso omentale o grasso sottocutaneo), dal tipo di procedura chirurgica, dalle condizioni di coltura, dalla densità di semina e dalla composizione del terreno di coltura. La proliferazione delle MSCs da tessuto adiposo può essere stimolata da molti supplementi esogeni, come il fibroblast growth factor 2 (FGF-2) (40) tramite il suo specifico recettore, da sphingosylphosphorylcholine tramite l'attivazione di c-jun N-terminal kinase (JNK) (41), platelet-derived growth factor tramite l'attivazione di JNK (42), e

oncostatin M tramite l'attivazione di microtubule-associated protein kinase (MEK)/extracellular signalregulated kinase (ERK) e JAK3/STAT1 pathway (43).

Le MSCs da tessuto adiposo secernono alcuni fattori di crescita come il vascular endothelial growth factor (VEGF), l'hepatocyte growth factor (HGF), l'FGF 2, ed insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (44, 45, 46).

Inoltre, i livelli di VEGF ed HGF secreti dalle MSCs possono essere aumentati tramite l'esposizione delle cellule all'ipossia, a fattori di crescita, a fattori di differenziazione (47) o a tumor necrosis factor (48).

Il *potenziale differenziativo* e l'*effetto immunoregolatorio* delle MSCs suggeriscono un possibile impiego di queste cellule nell'ambito del trapianto di midollo osseo e nelle malattie infiammatorie e degenerative, dove il compartimento rigenerativo del tessuto non è in grado di riparare la lesione (49, 50).

Negli ultimi anni è diventato chiaro che le MSCs posseggono spiccate *proprietà immunoregatorie*. Le cellule staminali mesenchimali sono capaci di sopprimere reazioni immuni sia in vitro che in vivo in modo indipendente dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) (51, 52, 53).

E' stato dimostrato un *effetto immunosoppressivo* delle MSCs attraverso un meccanismo che coinvolge l'inibizione paracrina della proliferazione delle cellule T e B.

Data la loro capacità d'inibire risposte immuni specifiche verso antigeni minori di istocompatibilità come HY (53, 54), di prevenire l'insorgenza di GvHD se co-trapiantate assieme alle cellule staminali emopoietiche (55), e di spegnere completamente la GvHD di grado IV refrattaria alla terapia immunosoppressiva (56), le MSCs si candidano ad essere una strategia efficace per la prevenzione della GvHD in trapianti MHC-non correlati e per il trattamento di pazienti con forme resistenti di GvHD, altrimenti gravate da una mortalità altissima per complicanze infettive, soprattutto in caso di coinvolgimento intestinale.

Sono attualmente in corso dei trials clinici per stabilire la sicurezza di tale procedura, ma è facile prevederne a breve un utilizzo più ampio in quelle strutture trapiantologiche dotate di laboratori per la manipolazione cellulare per uso clinico.

Le MSCs sono, inoltre, delle buone candidate per la terapia cellulare antitumorale. Queste cellule ingegnerizzate possono produrre molecole ad attività antineoplastica, rappresentando un possibile efficace strumento per una terapia antitumorale mirata a bassa incidenza di effetti collaterali.

Tra gli *effetti rigenerativi* dobbiamo delle MSCs dobbiamo ricordare quelli sul tessuto osseo.

In un modello murino di osteogenesi imperfecta, una malattia congenita dei tessuti mesenchimali, caratterizzata da difetto di ossificazione, sono state infuse MSCs midollari, ottenendo la formazione di tessuto osseo e cartilagineo funzionalmente normale a partire dalle cellule trapiantate (57).

Il passo successivo è stato nell'uomo: infuse in bambini con osteogenesi imperfecta, queste cellule non solo hanno attecchito senza dare effetti indesiderati, ma hanno anche determinato a tre mesi di distanza un aumento della componente osteoplastica, la formazione di nuovo osso lamellare ed un miglioramento complessivo del contenuto minerale totale. Tutto ciò si è accompagnato ad una riduzione della frequenza delle fratture patologiche e ad un accrescimento corporeo misurabile (58). Altri studi nell'animale hanno dimostrato che l'iniezione in situ o l'impianto diretto rappresentano la via più efficace di somministrazione delle MSCs per indurre rigenerazione e riparazione locale di tessuti ossei, cartilaginei o tendinei (59, 60).

Le MSCs sono state usate in vivo per riparare difetti della cartilagine articolare in modelli animali (61, 62).

Da vari studi è stata dimostrata l'applicabilità, l'innocuità e la potenziale efficacia locale delle MSCs per la riparazione cartilaginea (63, 64).

Le MSCs, inoltre, possono differenziare in cellule muscolari striate scheletriche, striate cardiache e lisce (65).

La maggior parte degli studi si sono focalizzati sul potenziale di differenziazione cardiomiocellulare delle MSCs per le potenzialità applicative rigenerative dopo infarto miocardico (66, 67).

A seguito dell'osservazione che MSCs umane e murine impiantate nel miocardio di topo potevano differenziare in cardiomiociti ed indurre angiogenesi (68), alcuni gruppi hanno utilizzato MSCs autologhe per trattare infarti miocardici in modelli animali, dimostrando attecchimento, differenziazione e miglioramento della funzione cardiaca, suggerendo così che questo approccio potesse essere utile per rigenerare cardiomiociti e ridurre le complicanze dell'infarto nell'uomo (69).

Numerosi studi hanno dimostrato la potenziale utilità della somministrazione di MSCs in malattie del sistema nervoso. E' stato osservato come l'impianto diretto delle MSCs nel muscolo striato di ratti anziani con deficit motori e cognitivi porti ad un miglioramento dell'attività motoria (70), mentre in modelli animali di morbo di Parkinson, di danno neurale ipoischemico e danno retinico è stato dimostrato un recupero funzionale dopo trapianto in vivo di cellule staminali nella sede della lesione (71).

Inoltre, la possibilità di modificare geneticamente le MSCs prima dell'inoculazione apre nuove prospettive per il loro uso come vettori cellulari di terapia genica in caso di deficit neurologici, danni da ischemia e gliomi cerebrali (72, 73).

Attraverso procedure di *terapia genica*, le MSCs possono essere utilizzate come veicoli per l'espressione di geni codificanti per proteine deficitarie nell'individuo per cause genetiche o acquisite, o per molecole con attività terapeutica (74).

1. Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001; 414: 98-104.
2. Fortier L. Classifications, Controversies, and Clinical Applications Surgery. *Stem Cells*. 2005; 34: 415-423.
3. Markov V, Kusumi K, Tadesse MG, William DA, Hall DM, Lounev V, Carlton A, Leonard J, Cohen RI, Rappaport EF, Saitta B. Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles. *Stem Cells Dev*. 2007; 16(1): 53-73
4. De Coppi P, Callegari A, Chiavegato A, Gasparotto L, Piccoli M, Taiani J, Pozzobon M, Boldrin L, Okabe M, Cozzi E, Atala A, Gamba P, Sartore S. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. *J Urol*. 2007; 177(1): 369-76.
5. Till JE, Cullloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961; 14: 213-22.
6. Scharner J, Zammit PS. The muscle satellite cell at 50: the formative years. *Skelet Muscle*. 2011 Aug 17;1(1):28.
7. Hansen-Smith FM, Carlson BM. Cellular responses to free grafting of the extensor digitorum longus muscle of the rat. *J. Neurol. Sci*. 1979; 41(2): 149-173.
8. Jones PH. In vitro comparison of embryonic myoblasts and myogenic cells isolated from regenerating adult rat skeletal muscle. *Exp. Cell Res*. 1982; 139(2): 401-404.
9. Jensen UB, Lowell S, Watt F.M. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* 1999; 126(11): 2409-2418.
10. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255(5052): 1707-10.
11. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 1997; 8(6): 389-404.

12. Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J.* 1996; 10: 1249–56.
13. 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(5401): 534-7.
14. Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G, Vescovi AL. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2000;3(10):986-91.
15. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendhal U, Frisén J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science.* 2000; 288: 1660-1663.
16. Jackson KA, Tiejuan M, Goodell M. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *PNAS.* 1999; 96(25): 14482-14486.
17. Asakura A, Seale P.i, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 2002; 159: 123-134.
18. Liang L, Bickenbach JR Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells.* 2002; 20: 21-31.
19. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol.* 2002; 30(8): 896-904.
20. Jiang Y., Jahagirdar BN., Reinhardt RL., et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow . *Nature* 2002; 418: 41-49.
21. Prockop DJ. Marrow stromal cell as stem cells for nonhemopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
22. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-650.
23. Colter DC, Class R, Di Girolamo CM, and Prockop DJ. Rapid Expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS* 2000; 97: 3213-3218.
24. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998; 279(5356): 1528-30.
25. Olmest-Davis EA, Gugala Z, Camargo F, Gannon FH, Jackson K, Kienstra KA, Shine HD, Lindsey R., Irschi KK, Goodell MA, Brenner MK, Davis AR. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *PNAS.* 2003.; 100(26): 15877-15882.
26. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ. Res.* 2003; 93: 1023-1025
27. 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(6829): 701-705.
28. Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *PNAS.* 2003; 100(3): 1364-1369.
29. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001; 105: 369-377.
30. Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature.* 2000; 406(6793): 257. MR et al., 2000.
31. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest.* 2002; 109(10): 1291-302.
32. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004; 32: 414-425.
33. Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 2002; 20: 205-214.
34. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18:307-316.
35. Tavian M, Pèault B. The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero. *Experimental Hematology* 33(2005); 1062-1069.
36. Woodbury D, Shwartz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61: 364-370.
37. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290:1775-1779.

38. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* (2001);189:54-63.
39. Sengenès C, Lomède K, Zakaroff-Girard A, et al. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult Mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* (2005);205:114-122.
40. Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2006);343:644-65256.
41. Jeon ES, Song HY, Kim MR, et al.: Sphingosylphosphorylcholine induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via activation of JNK. *J Lipid Res* (2006); 47:653-664.
42. Kang YJ, Jeon ES, Song HY, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* (2005);95:1135-1145.
43. Song HY, Jeon ES, Jung JS, Kim JH. Oncostatin M induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* (2005);37:2357-2365.
44. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* (2004);109:1292-1298.
45. Cao Y, Sun Z, Liao L, et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* (2005);332:370-379.
46. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2005);25:2542-2547.
47. Zeng Q, Li X, Beck G, et al. Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation and increases vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in fat-derived stromal cells in vitro. *Bone* (2007);40:374-381.
48. Wang M, Crisostomo P, Herring C, et al. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF and IGF-1 in response to TNF by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2006);291:880-884.
49. Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem (Suppl.)* 1998; 30:297-303.
50. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295: 1009-1014.
51. Krampera M, Cosmi L, Angeli L, et al. Role of the IFN- $\gamma$  in the immunomodulatory activity of human mesenchymal stem cell. *Stem Cells* 2005; 24: 386-398.
52. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mytogenic responses independently of the MHC. *Scand J Immunol* 2003; 57: 11-20.
53. Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve and memory antigen-specific cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722-3729.
54. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105: 2821-2827.
55. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 389- 398.
56. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party aplodidential mesenchymal stem cells. *The Lancet* 2004; 363: 1439-1441.
57. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta . *Nat Med* 1999; 5: 309-313
58. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997; 6:125-134.
59. Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, et al. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *J Orthop Res* 1999; 17: 900-908.
60. Brittberg M, Lindahl A, Nielsson A, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-895.
61. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal-cell based repair of large, full thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 579-592.
62. Beuningen HM, Van Glasbeek HL, Kraan PM, et al. Differential effects of local application BMP-2 or TGF-(beta) on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6: 306-317.
63. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 247-52.

64. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 199-206.
65. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.
66. Orlic D, Kajstura J, Cimenti et al. Bone marrow cells regenerated infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.
67. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-46.
68. Thomas C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-100.
69. Mathur A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004; 364: 183-192.
70. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature Med* 2006; 12: 459-465.
71. Locatelli F, Corti S, Donadoni C, et al. Neuronal differentiation of murine bone marrow Thy-1- and Sca-1-positive cells. *J Hematother Stem Cells Res* 2003; 12: 727-34.
72. Corti, Locatelli F, Strazzer S, et al. Neuronal generation from somatic stem cells: current knowledge and perspectives of the treatment of acquired and degenerative central nervous system disorders. *Curr Gene Ther* 2003; 3: 247-272.
73. Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of the gliomas. *Cancer Res* 2005; 65: 3307-3318.
74. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001; 29: 244-255.

### Cellule staminali riprogrammate o pluripotenti indotte (iPS)

Le cellule staminali pluripotenti indotte, abbreviate comunemente in iPS o iPSCs (dall'inglese Induced Pluripotent Stem Cells) sono un tipo di cellule staminali pluripotenti artificialmente derivate da una cellula non-pluripotente, in genere una cellula somatica adulta, mediante l'espressione "forzata" di specifici geni (1, 2).

Sono valse al giapponese Shinya Yamanaka e al britannico John Gurdon il riconoscimento del Nobel per la medicina.

La scoperta della loro ricerca è che le cellule mature possono essere riprogrammate per diventare pluripotenti ovvero non più differenziate per un particolare tipo di tessuto, rivoluzionando in tal modo la comprensione dello sviluppo e della specializzazione delle cellule.

Le cellule staminali pluripotenti indotte sono per molti aspetti simili alle cellule staminali pluripotenti naturali, come le staminali embrionali. Tali caratteristiche comuni comprendono l'espressione di geni e proteine staminali, il pattern di metilazione della cromatina, il tempo di raddoppiamento, la formazione del corpo embrioide, la creazione di teratoma, la possibilità di formare chimere, la potenza e la differenziabilità, sebbene la loro relazione con le cellule staminali pluripotenti naturali non sia ancora completamente definita (1, 2).

L'induzione di pluripotenza viene ottenuta attraverso la sovraespressione in cellule adulte o embrionali tardive (3) di alcuni geni mediante fattori di trascrizione.

Le cellule iPS vengono tipicamente derivate per trasfezione (più propriamente tramite trasduzione) di particolari geni associati alle staminali, all'interno di cellule non pluripotenti, come i fibroblasti adulti. La trasduzione è normalmente ottenuta attraverso vettori virali, come i retrovirus. I geni trasdotti includono regolatori trascrizionali Oct-3/4 (Pou5f1) e Sox2, anche se ci sono indizi che altri geni migliorino l'efficienza dell'induzione. Dopo 3/4 settimane, piccoli gruppi di cellule trasdotte cominciano a diventare morfologicamente e biochimicamente simili alle staminali pluripotenti, e sono tipicamente isolate tramite selezione morfologica, tempi di divisione, o attraverso un gene reporter e selezione tramite antibiotico.

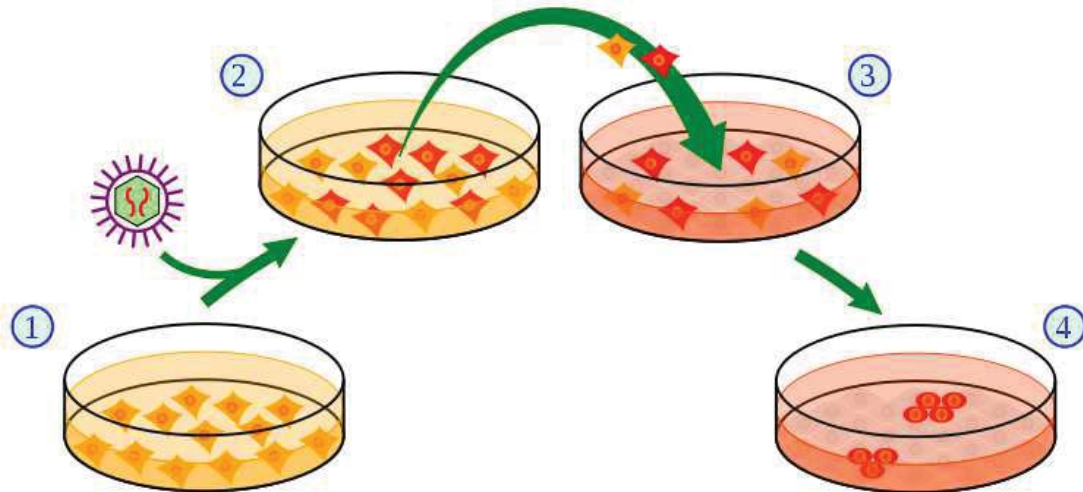


Fig. 10: Uno schema per generare le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). (1) Isolare e coltivare le cellule del donatore. (2) Transfettare le cellule staminali associate ai geni all'interno delle cellule attraverso vettori virali. Le cellule rosse indicano le cellule che esprimono i geni esogeni. (3) Raccogliere e coltivare le cellule secondo le colture cellulari ES. (4) Un piccolo sottoinsieme di cellule transfettate diventa iPSC e genera ES-come colonie

Sono state così ottenute: da fibroblasti epatociti funzionalmente maturi (4, 5), cardiomiociti (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12), neuroni (13, 14, 15, 16), cheratinociti (17, 18, 19), condrociti (ed una sostanza di recente isolamento, la cartogenina, facilita tale formazione (20), cellule ossee (21, 22), da adipociti miociti (23), da cellule venose coronariche cellule arteriose (24); dalle cellule ematiche, cellule staminali pluripotenti (25, 26, 27).

In particolare, tali cellule ematiche possono essere riprogrammate per l'introduzione dei fattori di trascrizione OCT3/4 (28).

Lo studio della formazione di tutte le strutture oculari sembra sia possibile con IPS, derivanti da persone con specifici mutamenti genotipici associati a malattie quali degenerazione maculare, retinite pigmentosa e glaucoma (29).

Tuttavia le cellule staminali anche se riprogrammate possono ricreare le patologie del soggetto da cui sono state prelevate al punto che l'ottenimento di IPS da pazienti con specifiche patologie consente di studiare meccanismi molecolari di queste malattie (schizofrenia, atrofia muscolare spinale) (30).

Cellule staminali pluripotenti da fibroblasti cutanei di un bambino con atrofia muscolare progressiva espanso in coltura, mantennero genotipo e generarono motoneuroni con deficienze come quelle presentate dal bambino (30).

iPS generate da pazienti con la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) possono essere differenziate in motoneuroni (31).

Caratteristiche differenziate tra hESCs e IPS e migliori metodi per ottenerle sono riportati da Zwaka TP (2).

Malgrado l'auspicato rilevante interesse terapeutico delle IPS, e le possibilità di loro impiego all'infuori di fattori etici, ci sono molti dubbi circa la perfetta corrispondenza tra queste cellule e quelle staminali embrionali (2, 32, 33), tra cui anche la capacità di relazionarsi in proseguo con strutture dell'organismo cui vengano destinate (31).



Occorre inoltre approfondire gli aspetti di antigenicità nei confronti dell'organismo ricevente (2) e l'influenza, analogamente alle hESCs, sulla possibile formazione di teratomi (34, 35, 36).

A seconda del metodo usato, la riprogrammazione di cellule adulte per ottenere iPSCs può comportare rischi significativi che ne potrebbero limitare l'uso nell'uomo. Ad esempio, se per alterare geneticamente la cellula vengono utilizzati virus potrebbe potenzialmente essere aumentata l'espressione di geni oncogeni. Nel febbraio del 2008 un gruppo di scienziati ha annunciato la scoperta di una tecnica che potrebbe rimuovere i geni oncogeni in seguito all'induzione della pluripotenza, aumentando quindi il potenziale uso terapeutico delle iPSCs (37). Nell'aprile del 2009 è stato dimostrato che la generazione di cellule iPSC è possibile senza alcuna alterazione genetica della cellula adulta: un ripetuto trattamento delle cellule con certe proteine introdotte nella cellula tramite ancure di poli-arginina è, infatti, sufficiente ad indurre la pluripotenza (38). Ci si riferisce alle iPSCs ottenute mediante questa tecnica come piPSCs (dall'inglese protein-induced pluripotent stem cells).

Le iPSCs sono state indicate come un importante passo in avanti nella ricerca sulle cellule staminali, in quanto permettono ai ricercatori di ottenere cellule staminali pluripotenti, importanti in ricerca e potenzialmente in terapia, senza ricorrere ai controversi embrioni. Inoltre la possibilità di ottenere cellule staminali a partire dalle cellule somatiche del paziente le rende potenzialmente non immunogeniche.

Comunque, i ricercatori in questo campo sono generalmente d'accordo sul continuare le ricerche sulle hESC fino a quando le iPSC diverranno una realtà sufficientemente diffusa nei laboratori di ricerca negli anni a venire.

1. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 2012, 465, 704-712.
2. Zwaka TP. Stem cells: troublesome memories. *Nature*, 2010, 467, 280-281.
3. Bao S, et al. Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature*, 2009, 461, 1292-1295.
4. Huang P, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature*, 2011, 475, 386-390.
5. Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblast to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature*, 2011, 475, 390-393.
6. Qian L, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblast into induced cardiomyocytes. *Nature*, 2012, 485, 593-598.
7. Song K, et al. Heart repairing by reprogramming non myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*, 2012, 485, 599-604.
8. Ieda M, et al. Direct reprogramming of fibroblast into functional cardiomyocytes by defined factors. *Stem Cell*, 2010, 142, 375-386.
9. Burridge PW, et al. Production of the novel cardiomyocytes human pluripotent stem cell: differentiation and direct programming cell. *Stem Cell*, 2012, 10, 16-28.
10. Efe JA. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat. Cell. Biol.*, 2011, 13, 215-222.
11. Braam SR, et al. Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells in regenerative medicine and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30, 536-545.
12. Mummery C, et al. Challenges in using stem cells for cardiac repair. *Sci Transl Med*, 2010, 2, 27ps17.
13. Pang ZP, et al. Induction of human neural cells by defined transcription factors. *Nature*, 2011, 476, 220-223.
14. Woo AS, et al. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, 2012, 476, 228-231.
15. Caiazzo M, et al. Direct generation of human functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, 2012, 476, 224-227.
16. Sendtner M. Bespoke cells for the human brain. *Nature*, 2011, 476, 158-158.
17. Blanpain C. Stem cells: skin regeneration and repair. *Nature*, 2010, 464, 686-687.
18. Guenou H. Human embryonic stem cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet*. 2009, 374, 745-53.

19. Schluter H;Haur P.Bioengineered human skin from embryonic stem cells. *Lancet*, 2009, 374,1725-1726.
20. Johnson K et al. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science*, 2012, 336,717-721.
21. Tiaden AN,et al.Human Serine Protease HTRA1 Positively Regulates Osteogenesis of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Mineralization of Differentiating Bone-forming Cells Through the Modulation of extracellular Matrix Protein.Stem Cells. 2012 Aug;3 doi:10.1002/stem.1190.
22. Nicolaidou V,et al.Monocytes induce STAT3 activation in human mesenchymal stem cells to promote osteoblast formation. *Plos One*, 2012, 7(7):e39871.
23. Sun N,et al.feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult adipose stem cells. *PNAS USA*,2009, 106,15720-15725.
24. Red-horse K,et al.Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature*, 2010, 464,559-553.
25. Seki T,et al.Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Stem Cell*, 2010, 7,11-14.
26. Staerk J,et al.Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell* ,2010, 7,20-24.
27. Loh YH.Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Stem Cell*, 2010, 7,15-10.
28. Haase A.Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Stem Cell*,2009, 5,434-441.
29. Zhan K,Ding S.Stem cells and eye development *NEJM*,2011, 365,370-371.
30. Ebert AD et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*,2009, 457,277-280.
31. Dimos JT et al.Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*,2008, 321,1218-1221.
32. Apostolou E, Hochedlinger K. Stem cells: iPS cells under attack. *Nature*, 2011, 474,165-166.
33. Dolgin E. Flaw in induced-stem-cell model. *Nature*, 2011, 470,13.
34. Chandran S.What are the prospects of the stem cell therapy for neurology? *BMJ* 337,1325-1327,2008.
35. Schluter H;Haur P.Bioengineered human skin from embryonic stem cells.*Lancet* 374,1725-1726,2009.
36. Wadman M.Stem cells ready for prime time *Nature*(crescita di tumori;studio di N.S Roy *Nature Med* 12,1259-1268,2006,2009 Jan 29;457(7229):516.
37. Kaplan K. *Cancer threat removed from stem cells, scientists say*, 6 marzo 2009.
38. Zhou H, Wu S, Young Joo J, Zhu S, Wook Han D, Lin T (2009). *Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins*. *Cell Stem Cell* 4 (5): 381–384. DOI:10.1016/j.stem.2009.04.005

## Conclusioni

La plasticità delle cellule staminali, soprattutto mesenchimali, derivanti da tessuti adulti, potrebbe rivelarsi utilissima per la ricostruzione di tessuti specifici, per la loro capacità rigenerativa e per il fatto che, essendo cellule autologhe, non evocerebbero risposta immunitaria in caso di trapianto: queste caratteristiche le hanno rese preferibili alle cellule staminali embrionali. La sfida più grande è quella di poter ricercare un adeguato scaffold per creare delle strutture tridimensionali modellate su forme e dimensioni adeguate e contenenti cellule staminali capaci di angiogenesi e neurogenesi (innervazione) e tali da poter essere trapiantabili dal laboratorio agli esseri umani, in modo da poter ricreare organi o arti mancanti partendo da una popolazione autologa opportunamente espansa e differenziata.

Inoltre data la loro origine autologa non sollevano questioni di natura etica.

Sulla base delle attuali conoscenze sulle MSCs, è possibile immaginare che, in un periodo relativamente breve di tempo, ci saranno impieghi per le cellule staminali come

- Pelle di qualità eccellente, coltivata da quella del paziente: cellule, per coprire aree ustionate, o per sostituire antiestetiche cicatrici e sequele di resezione del tumore.

- "Custom-built", vale a dire la creazione di ossa e cartilagine di ricambio per vittime di incidenti e dei pazienti che sono stati sottoposti grandi resezioni o che soffrono di malattie degenerative, o nella produzione di nuovi arti, in caso di agenesia, in modo che potremo sostituire protesi allogeniche con i tessuti propri del paziente.
- Riparazione dei nervi dopo un trauma o asportazione del tumore.
- Inserimento di collagene in aree di riassorbimento come avviene in aree lasse e rugose, portando a ringiovanimento del tessuto (viso, collo, ecc.).

L'uomo sta rendendo più vicino a ognuno di noi quello che sembra essere un potere divino.  
Da piccole cellule otterremo grandi risultati.