

## **CELLULE STAMINALI: POTENZIALITÀ TERAPEUTICA IN SICUREZZA.**

**Brescia, 23 Ottobre 2009**

In data 23 Ottobre si è svolta, organizzata dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, una giornata di studio e aggiornamento su un argomento che sta suscitando molto interesse sia in ambito umano che veterinario: le cellule staminali. Dalla seconda metà del secolo scorso, l'interesse per queste cellule è cresciuto in modo esponenziale e con esso gli studi dedicati a questi elementi cellulari. La giornata è stata inaugurata dai due moderatori dell'evento, la Dott.ssa Supino ed il Prof. Barlati, i quali hanno provveduto ad introdurre in modo esaustivo il tema della giornata; sottolineando come le cellule staminali siano presenti in molti tessuti quali, sangue, midollo osseo, tessuto adiposo, placenta e cordone ombelicale ed in base alla loro capacità di replicazione vengano classificate in pluripotenti, multipotenti o totipotenti. Il successo di questi elementi cellulari è dovuto principalmente alla facilità con cui esse replicano e differenziano in diversi tipi cellulari *in vitro*; questo ne favorisce l'impiego nel trattamento di diverse patologie sia in medicina umana che veterinaria. Successivamente la Dott.ssa Ferrari ha indicato quali possono essere i limiti ed i rischi connessi all'impiego delle cellule staminali in medicina applicativa sia in campo umano che veterinario. Infatti è noto che tra le cellule staminali possono essere individuate due popolazioni ben distinte: le cellule staminali embrionali e quelle adulte. Le prime sono pluripotenti, sono cioè in grado di dare origine a tutti i tessuti formanti un organismo ma il loro impiego è sconsigliato sia per la presenza di limiti etici sia dal fatto che sono in grado di dare origine a teratomi. Tra le cellule staminali adulte le più promettenti sono le cellule staminali mesenchimali (CSM), cellule multipotenti non sottoposte a principi etici ed in grado di differenziare in tessuti che originano dal mesoderma.

In medicina umana la cellula è considerata un farmaco e per questo motivo il suo impiego in medicina applicativa deve sottostare alle normative GMP che stabiliscono come deve essere organizzato e quali controlli devono essere effettuati in un laboratorio che produce cellule staminali. Tali linee guida non sono attualmente applicate in medicina veterinaria dove manca una normativa di riferimento, pertanto l'impiego delle CSM è lasciato al "buon senso" dell'operatore; da questa presentazione è quindi emerso che l'utilizzo di questi elementi cellulari potrebbe essere causa di infezioni virali, batteriche, fungine (ecc.) oppure indurre la formazione di tumori nei soggetti riceventi come in seguito illustrato.

Il Prof. Pessina e la Dott.ssa Zucchi hanno esposto le attuali conoscenze sull'attività neoplastica di queste cellule. Negli ultimi decenni la comunità scientifica ha eseguito vari studi in questo settore ma i dati ottenuti sono risultati discordanti; infatti alcune pubblicazioni mostrano come tali cellule siano caratterizzate da un ruolo anti-neoplastico, altre evidenziano una loro attività tumorigenica;

attualmente è noto che le cellule caratterizzate da maggiore instabilità genetica e potenziale oncogeno sono le staminali embrionali. Dal punto di vista applicativo, le CSM sono, tra le cellule staminali adulte, le più interessanti; questo grazie alla loro plasticità, alle caratteristiche immunomodulatorie e alla possibilità di isolamento da diversi tessuti. Al fine di poter impiegare queste cellule *in vivo* è necessaria la loro espansione *in vitro*, questo procedimento prevede l'impiego di siero fetale bovino (SFB), il quale può determinare la contaminazione delle stesse da parte di micoplasmi e virus; per ovviare a questa problematica si potrebbe ricorrere all'impiego di lisato piastrinico.

La via di somministrazione deve essere opportunamente definita in relazione all'attività immunomodulatoria delle cellule, inoltre a seguito della multipotenzialità di queste deve essere presa in considerazione la possibilità che esse siano in grado di dare origine a tessuti ectopici. In letteratura sono presenti dati discordanti riguardanti la loro sicurezza dal punto di vista neoplastico: alcune pubblicazioni mostrano come tali cellule siano caratterizzate da un ruolo tumorigenico, altre evidenziano un'attività anti-neoplastica. La comunità scientifica sta prestando, in quest'ultimo periodo, particolare attenzione alla "teoria staminale" del cancro che ipotizza l'esistenza di un'esigua popolazione di cellule staminali tumorali che alimenta e mantiene la massa tumorale. L'identificazione, di queste rare cellule che sembrano essere centrali per l'insorgenza ed il mantenimento dei tumori, si è rivelata un'impresa alquanto difficile per la mancanza di marcatori specifici per isolarle. Nel laboratorio dove lavora la dott.ssa Zucchi è stato messo a punto un modello sperimentale di Breast Cancer Stem Cells (BCSCs) di ratto basato sull'utilizzo delle cellule LA7, isolate da un tumore mammario indotto nel ratto da sostanze chimiche. In base agli studi condotti è possibile concludere che una singola cellula LA7 ha le capacità di self-renewing e multilineage-differentiation, in colture 3D forma strutture tridimensionali di tipo brached-like che ricapitolano morfologicamente e funzionalmente l'architettura tubulo-alveolare della ghiandola mammaria e genera tumori eterogenei in topi NOD-SCID. Le LA7 hanno pertanto caratteristiche di Cancer Stem Cells e possono essere utilizzate per studiare la dinamica della formazione del tumore a livello di singola cellula. Da tumori generati da LA7 sono stati isolati 2 tipi cellulari morfologicamente distinti con diverso potenziale tumorigenico: cellule con caratteristiche di CSCs (LA7-STEM-like) e contraddistinte dall'espressione di p21 e p63 e cellule epiteliali allungate (LA7-E) che generano tumori molto meno eterogenei. Le prime (LA7-STEM-like) sono CSCs, mentre le seconde (cellule LA7-E) hanno proprietà funzionali simili alle CSCs ma generano tumori con dinamica diversa e concorrono in modo diverso alla progressione del tumore; hanno pertanto le caratteristiche di progenitori lineage-committed con potenziale tumorigenico.

Poiché le LA7 possono transitare dalla condizione che favorisce il mantenimento di pure CSCs alla condizione differenziativa che permette la generazione altri tipi cellulari, questo sistema modello offre l'opportunità di studiare fattori che possono influenzare self-renewing e differentiation.

I pareri discordanti ed i fattori di rischio correlati all'impiego di queste cellule suggeriscono come sia indispensabile procedere con cautela nel loro utilizzo e quanto siano importanti studi in ambito veterinario, che possano permettere di chiarire il loro grado di sicurezza e lo sviluppo di nuove terapie antitumorali

Successivamente Il Prof. Del Bue, il Dott. Almici ed il Prof. Crovace hanno presentato un chiaro stato delle arti in campo umano e veterinario per quanto riguarda l'impiego delle cellule staminali in medicina rigenerativa ponendo particolare attenzione sulla possibilità di impiegare il modello veterinario per gli studi pre-clinici di patologie umane.

In Medicina Veterinaria le Cellule Staminali sono generalmente impiegate nella cura di patologie cutanee, osteo-condrali, tendinee o, più semplicemente, per riparare lesioni indotte sperimentalmente. Si tratta principalmente di Cellule Staminali adulte isolate da midollo osseo e tessuto adiposo; nella pratica clinica si è soliti preferire le cellule staminali ottenute da quest'ultimo tipo cellulare a causa della semplicità di esecuzione del prelievo, per la maggior disponibilità di tessuto e per la velocità di espansione. Attualmente la comunità scientifica è molto interessata alla plasticità ed alla capacità proliferativa di queste cellule che sembrano essere correlate alla capacità di produrre *in vitro* cellule umane; studi recenti hanno evidenziato la possibilità di impiegare queste cellule per la rigenerazione corneale o per migliorare la funzione respiratoria.

Prima di essere impiantate *in vivo*, esse, vengono addizionate con il Plated Rich Plasma (PRP), questo preparato è dotato di numerose proprietà, contiene infatti fattori di crescita e citochine, è caratterizzato da proprietà angiogeniche e chemiotattiche, favorisce la mitosi ed infine rappresenta una sorta di supporto biologico tridimensionale (scaffold) sul quale possono organizzarsi le cellule staminali. Ad oggi sono numerosi gli animali (cani, gatti, cavalli) trattati con successo sia impiegando solamente il PRP che addizionandolo con CSM isolate da tessuto adiposo. Al fine di valutare l'effettivo contributo fornito dalle CSM inoculate al processo di riparazione della lesione sono stati condotti alcuni studi, atti a verificare la localizzazione delle CSM *in vivo*, per ottenere questo si è ricorsi alla loro marcatura con particelle paramagnetiche di ferro (SPIO-endorem), oppure all'ingegneria-genetica mediante l'ausilio di plasmidi contenenti il gene GFP. La doppia marcatura ha permesso di raccogliere informazioni anche a lungo termine con metodi di diagnostica poco o non invasivi.

Alla luce dei risultati fino ad ora ottenuti, l'uso di PRP singolo od in associazione con CSM sembra trovare ottime applicazioni sia in campo umano che veterinario. Queste caratteristiche hanno

portato a considerare le staminali un farmaco, pertanto le applicazioni nell'uomo delle cellule staminali ai fini dell'ingegneria tissutale o della medicina rigenerativa prevedono che i prodotti per terapia cellulare siano manipolati all'interno di strutture dedicate (Cell Factory) accreditate in accordo con le norme GMP, usate per la produzione industriale dei farmaci.

Nella parte finale della giornata è stato affrontato un problema che ha acquisito notevole rilevanza negli ultimi anni; il Prof. Krampera ed il Dott. Alessandri hanno messo in luce le spiccate proprietà immunoregatorie delle staminali mesenchimali, evidenziabili in diverse specie animali, anche se con meccanismi in parte differenti e solo parzialmente chiariti.

Le CSM possiedono spiccate proprietà immunoregatorie, presenti in diverse specie animali, anche se con meccanismi in parte differenti e solo parzialmente chiariti. Esse sopprimono reazioni immuni sia *in vitro* che *in vivo* in modo indipendente dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Inibiscono la proliferazione dei linfociti T in risposta a stimoli policlonali non specifici, ma nel modello murino anche le risposte antigene-specifiche, mediate da linfociti T *naive* e *memory*, in modo dose-dipendente e strettamente associato al contatto cellulare. L'effetto inibitorio delle CSM interessa praticamente tutte le popolazioni cellulari coinvolte nella risposta immunitaria, da linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, a linfociti B, cellule NK e cellule dendritiche di origine monocitaria. L'interazione con le CSM determina anergia da arresto precoce della proliferazione linfocitaria e delle cellule dendritiche. *In vivo*, le CSM prolungano la sopravvivenza di trapianti cutanei incompatibili dal punto di vista dell'MHC nel babuino; riducono nell'uomo l'incidenza di graft-versus-host disease (GvHD) quando trapiantate assieme alle cellule staminali emopoietiche; curano le manifestazioni cliniche della GvHD di grado IV refrattaria alla terapia immunosoppressiva; migliorano nel topo le manifestazioni tipiche dell'encefalomielite autoimmune sperimentale. Diversi meccanismi concorrono all'effetto immunoregatorio delle CSM, basati sia sul rilascio di fattori solubili che su meccanismi contatto-dipendenti. Per tutte queste ragioni sono in corso diverse sperimentazioni cliniche che prevedono l'utilizzo di CSM autologhe o allogeniche per la prevenzione della GvHD in trapianti MHC-non correlati ed il trattamento della GvHD acuta avanzata, che è normalmente gravata da una elevata mortalità per complicanze infettive, soprattutto in caso di coinvolgimento intestinale. Tali protocolli prevedono la raccolta e l'espansione di CSM dallo stesso donatore di cellule staminali emopoietiche utilizzate per il trapianto o da donatore non correlato. In conclusione i moderatori dell'evento, hanno evidenziato l'importanza di avere una normativa di riferimento per l'impiego delle staminali in medicina rigenerativa, in modo tale da uniformare il "modus operandi" dei singoli laboratori ed ottenere un prodotto sicuro per il paziente. Si rende quindi necessario uno sforzo collaborativo, tra veterinari e medici per ottenere dati e soluzioni che contribuiscano in maniera efficace alla salvaguardia della salute animale ed umana.

