

Medicina rigenerativa (Istologia)

→ Ingegneria tissutale

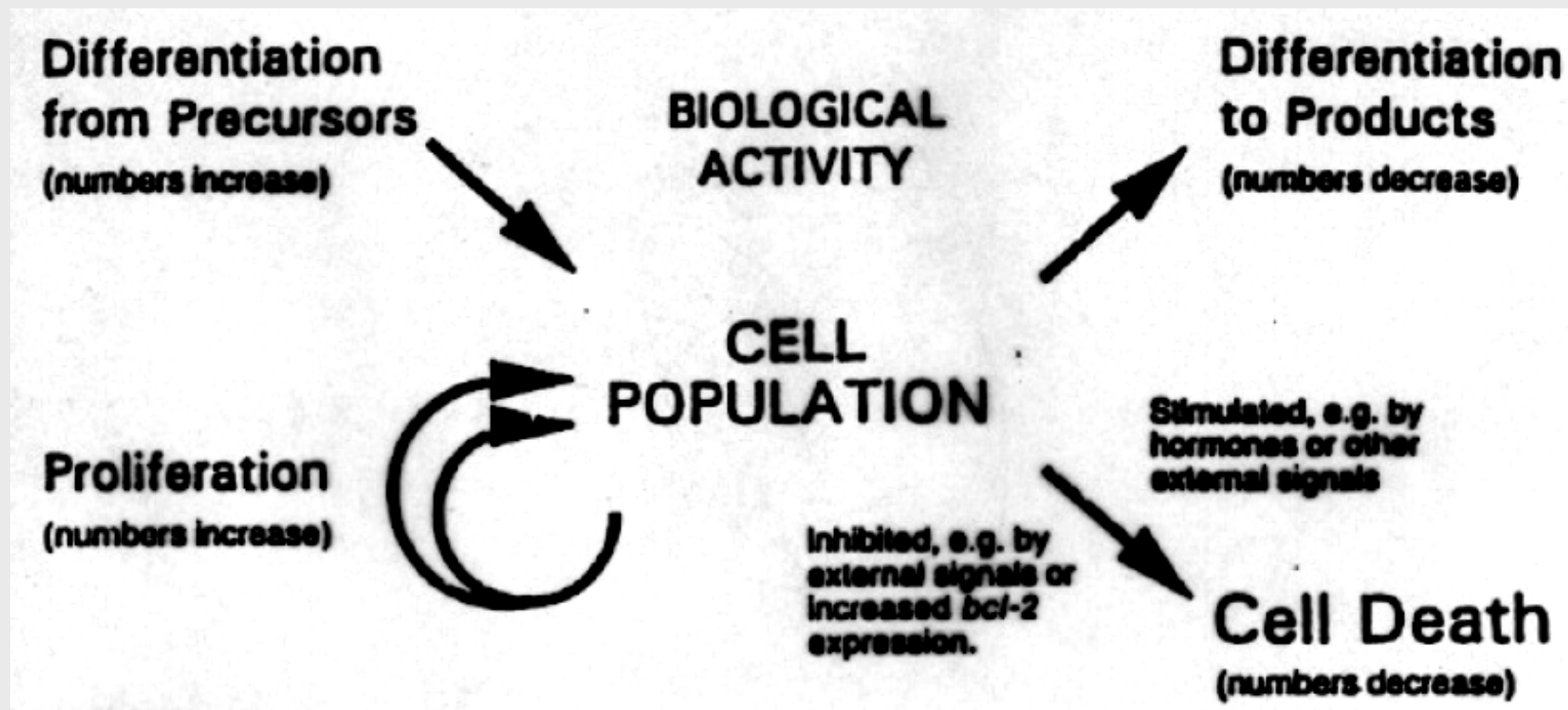
Ingegneria tissutale

- Materia multidisciplinare
- Tre componenti:
- **Cellule**
- Nicchia: microambiente biomimetico adeguato
 - meccanico-fisico: **scaffold**
 - chimico: **fattori solubili** per mantenimento cellule

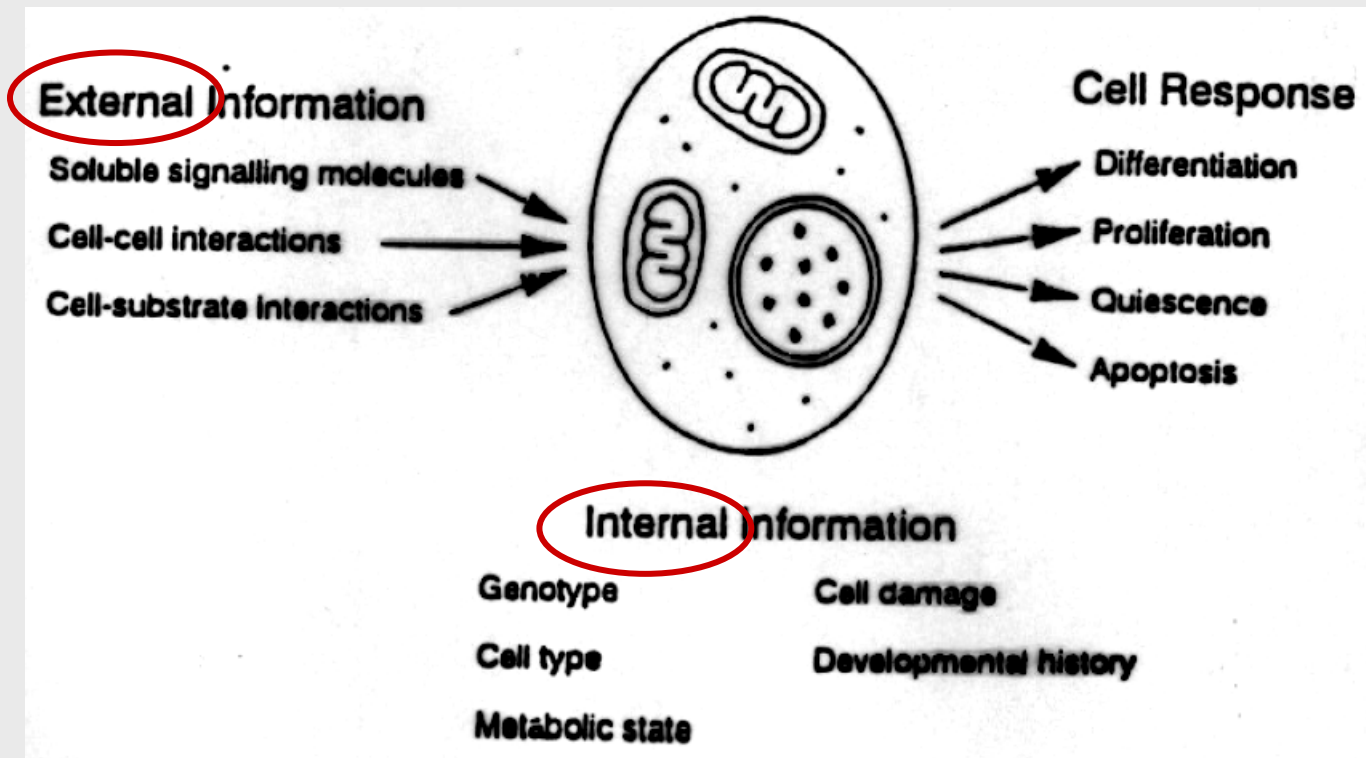
Ingegneria tissutale

- Materia multidisciplinare
- Tre componenti:
- **Cellule**
- Nicchia: microambiente biomimetico adeguato
 - meccanico-fisico: **scaffold**
 - chimico: **fattori solubili** per mantenimento cellule

Omeostasi dell'organismo



Le risposte della cellula a stimoli esterni dipendono anche dalla sua storia



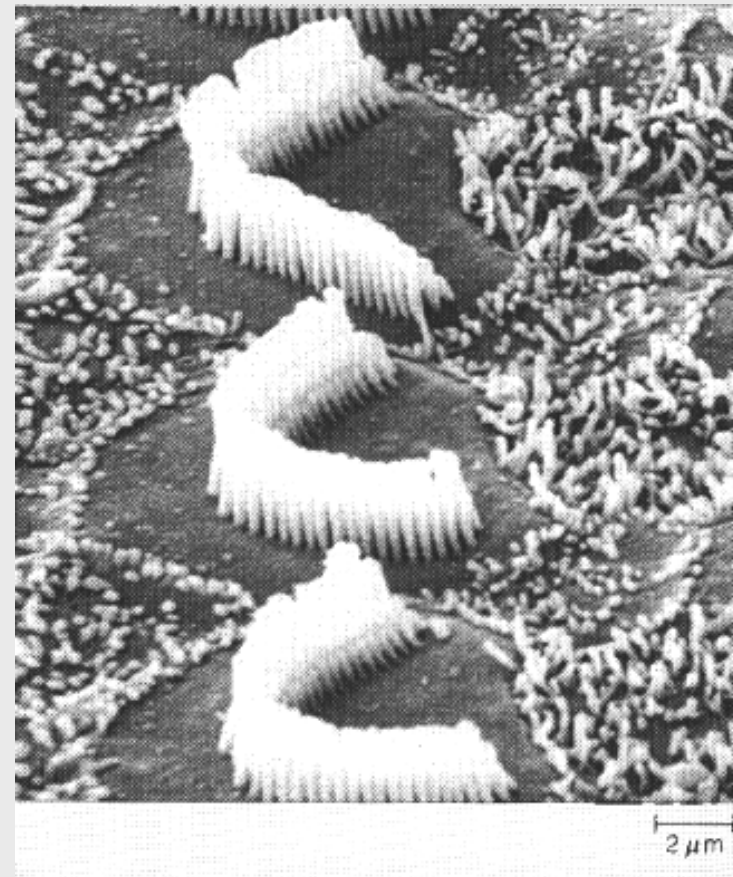
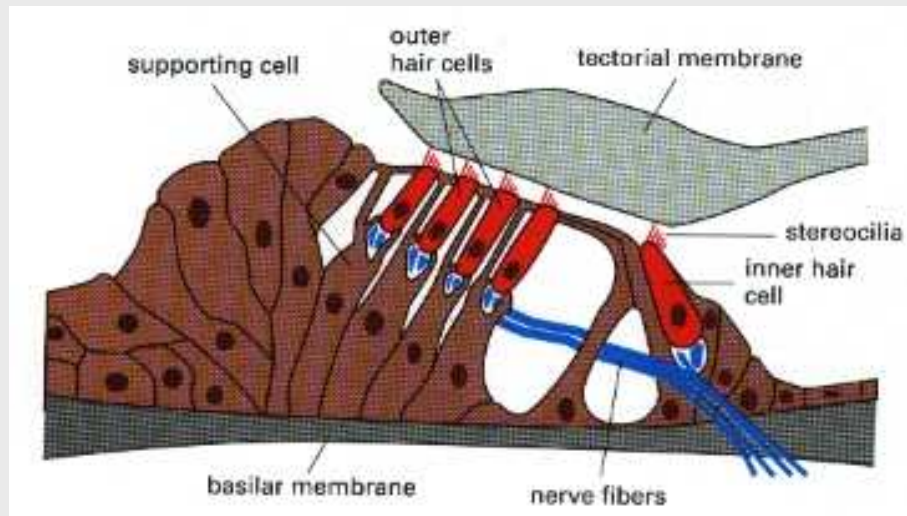
-
- La rigenerazione tissutale (o suo tentativo) è un evento normale nella vita dell'organismo.
 - Ex:
 - dopo ferita, la pelle si rigenera
 - dopo frattura, l'osso si riforma
 - a ogni ciclo, si riforma endometrio funzionale
 - Ma diverso potenziale a seconda dei tessuti

Cellule/tessuti hanno diverso potenziale proliferativo (cellula staminale)

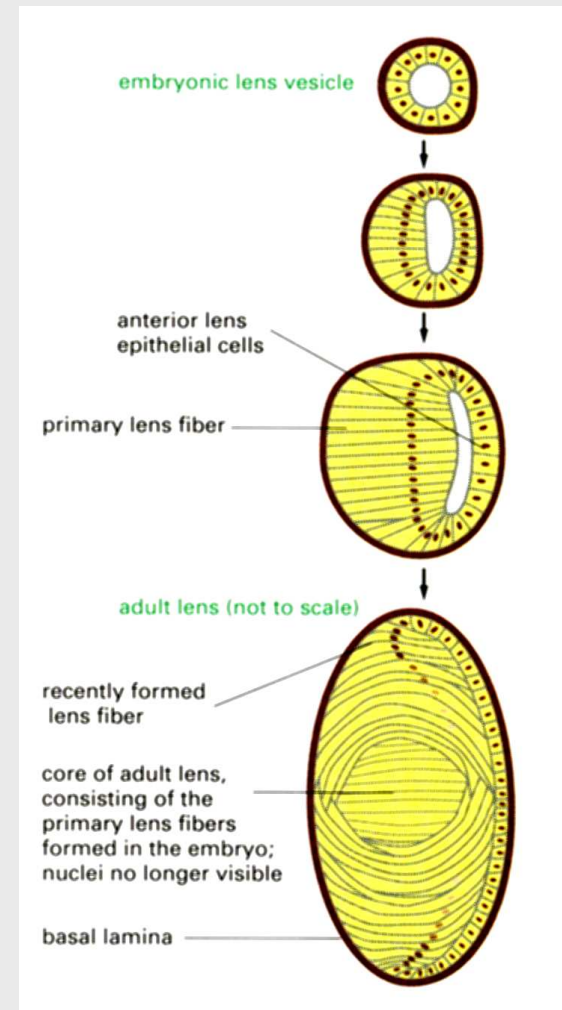
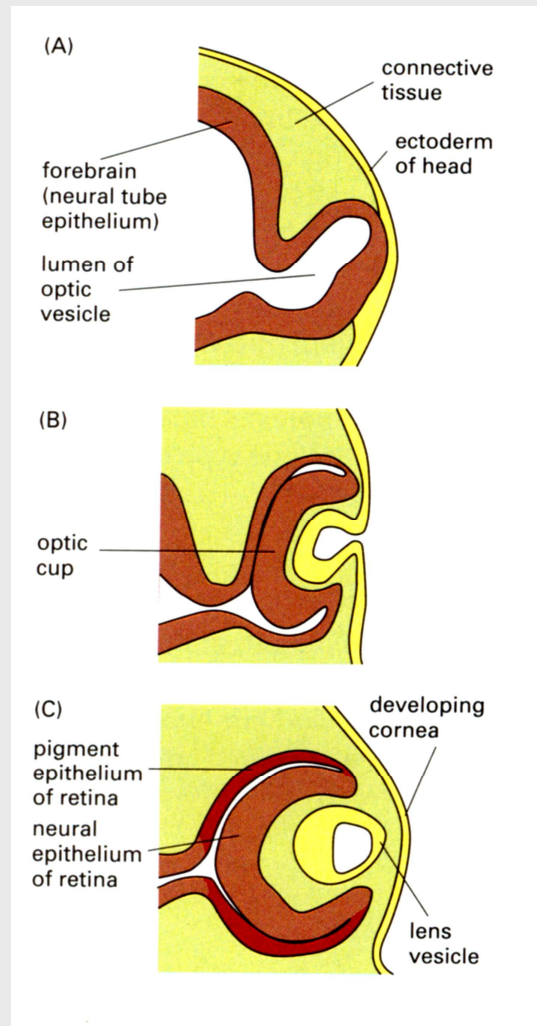
- Riparazione delle ferite (fratture, ferite cutanee)
- Omeostasi dei tessuti **labili**: sangue, epiteli
- Ripopolazione ancorche' minima nei tessuti **"perenni"** nel SNC: neurogenesi molto limitata (ippocampo umano)
- rigenerazione dei tessuti **"stabili"**: muscolo scheletrico: riattivazione cellule satelliti; fegato dopo epatectomia

MA CI SONO ECCEZIONI!!!

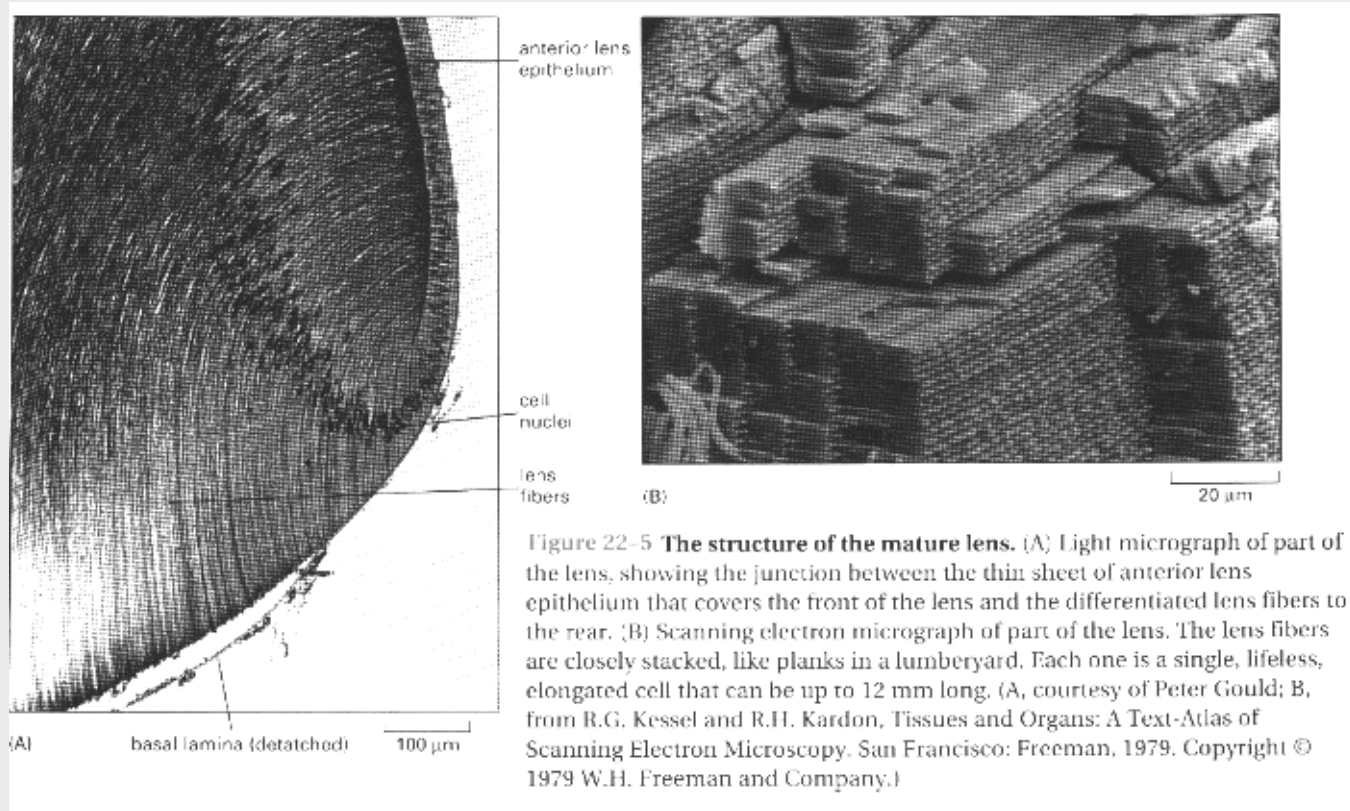
Le cellule capellute (**benchè
epiteliali**) dell'orecchio non sono
soggette a ricambio



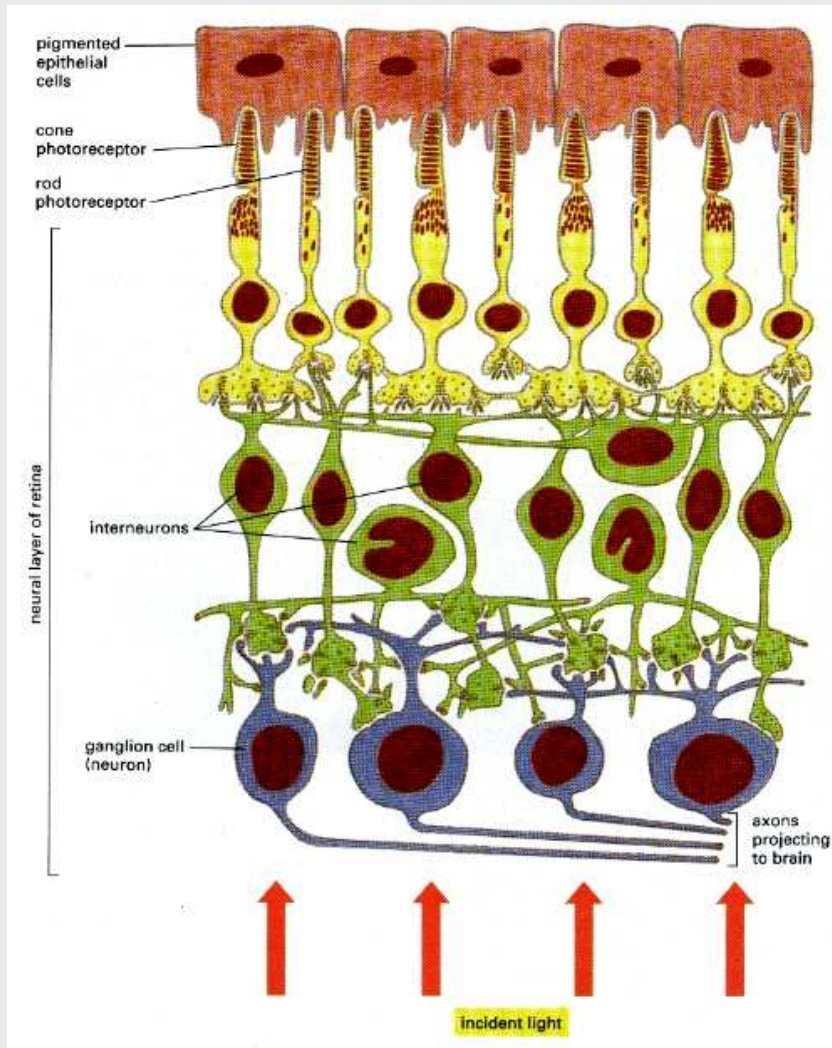
Formazione del cristallino



Il cristallino: le fibre sono strutture perenni



Struttura della retina



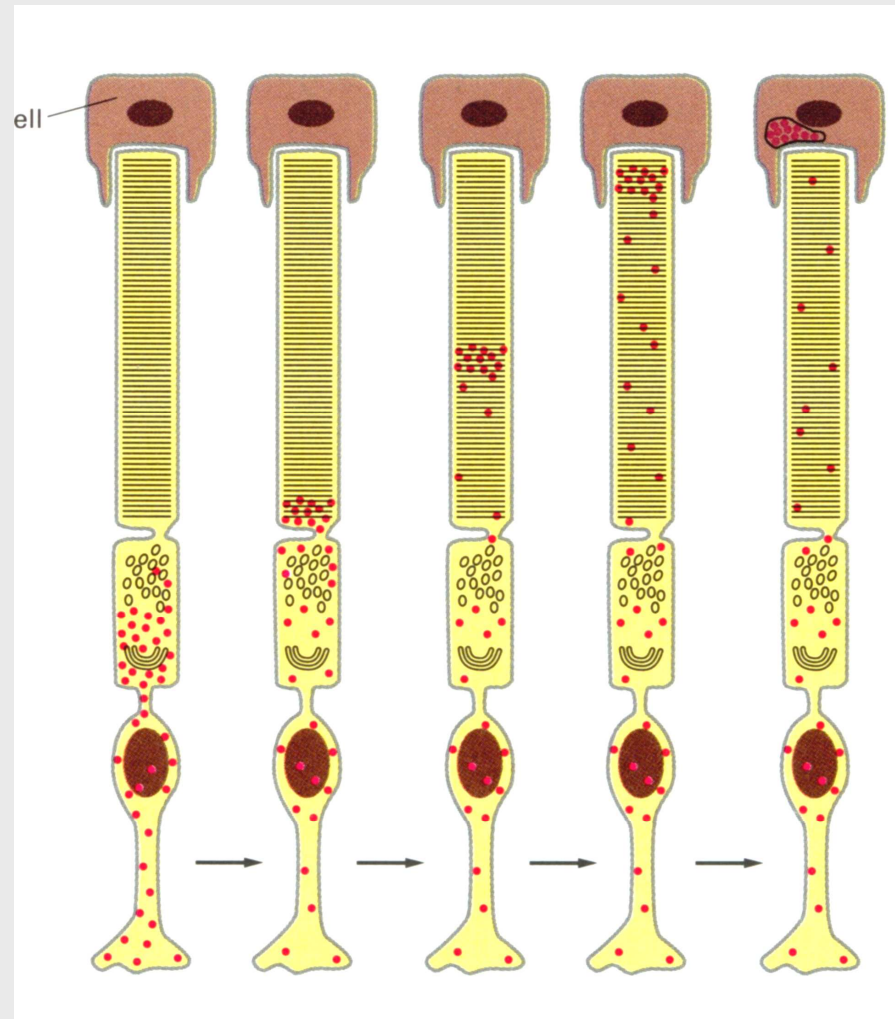
Cellule epiteliali pigmentate

Coni e bastoncelli

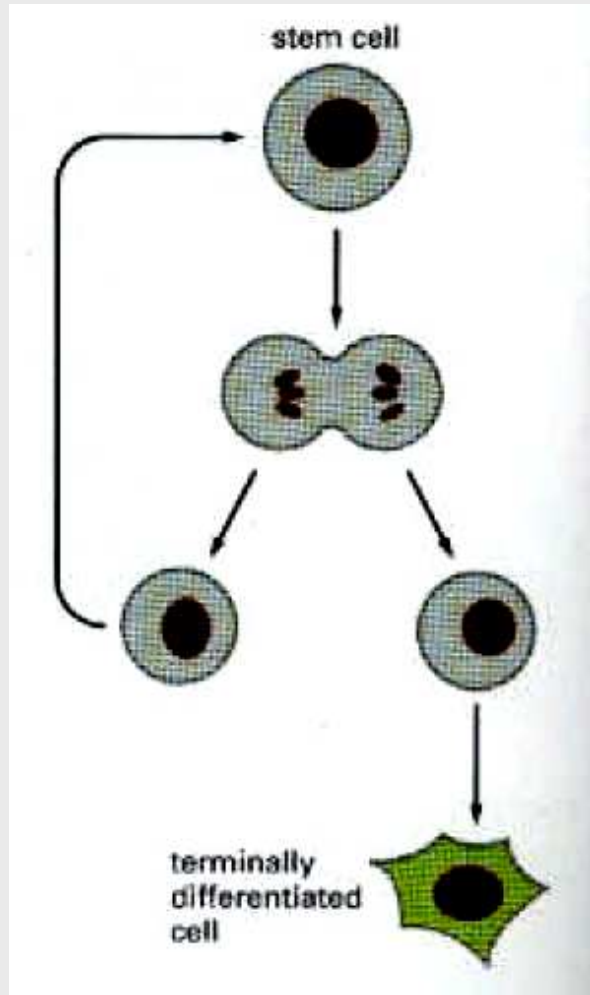
Interneuroni

Cellule gangliari (neuroni)

Metabolismo nei bastoncelli della retina (cellule post-mitotiche)



La cellula staminale

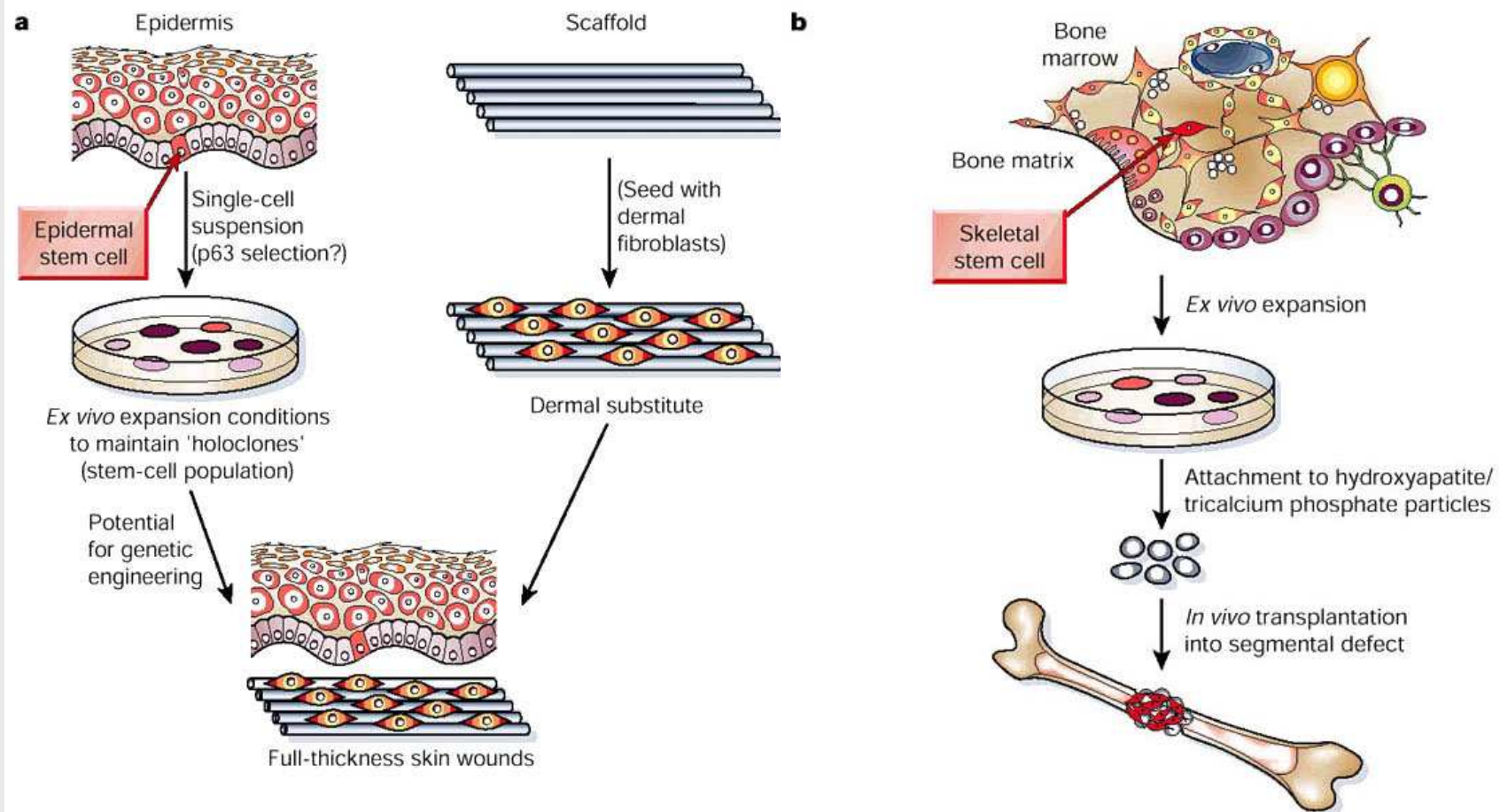


Una cellula in grado
di autorinnovarsi e
di differenziarsi



Viene mantenuta la
riserva

Terapia con cellule staminali umane tessuto-specifiche



Cellule staminali

- Malattie fino ad oggi incurabili, per le quali si può prospettare un terapia con cellule staminali:
- Sclerosi laterale amiotrofica (ALS), morbo di Parkinson, morbo di Alzheimer
- Infarto miocardico
- Cirrosi epatica
- Diabete
-

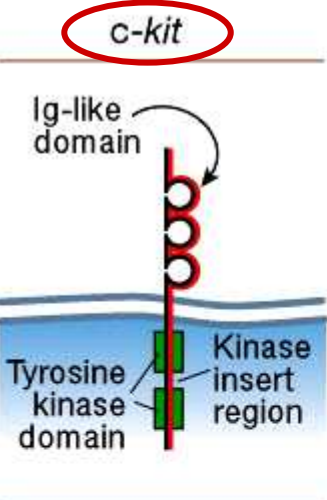
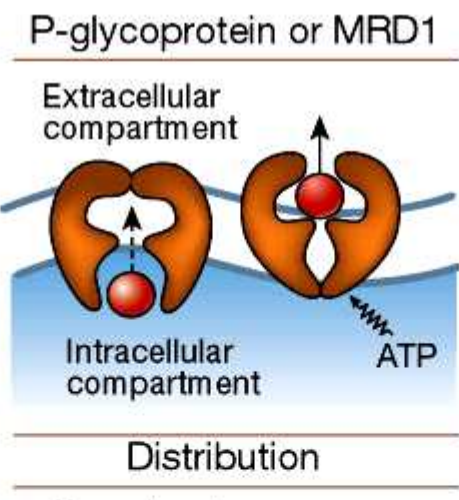
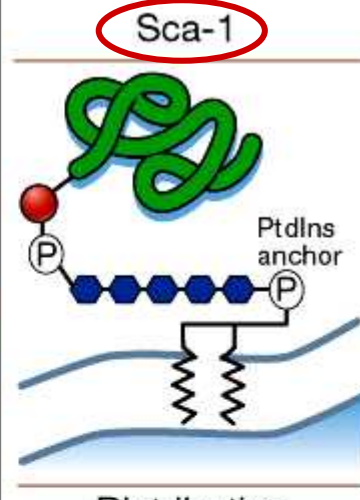
Cellule staminali

- In base all'origine vengono classificate in
- Embrionali (ESC)
- Adulte (ASC)

Cellula staminale adulta

- Non presenta segni molecolari e morfologici di differenziazione (problema dei marcatori e della definizione)
- Ha potenzialita' differenziative illimitate (forse)
- Si divide senza limiti (almeno rispetto alla vita dell'animale)
- Provvede all'automantenimento
- Quando si divide ogni cellula figlia ha la scelta tra automantenimento e differenziazione.
- La divisione puo' essere simmetrica o asimmetrica.
- Le due cellule figlie di solito fanno divisioni simmetriche, ma in termini di popolazione la divisione e' asimmetrica

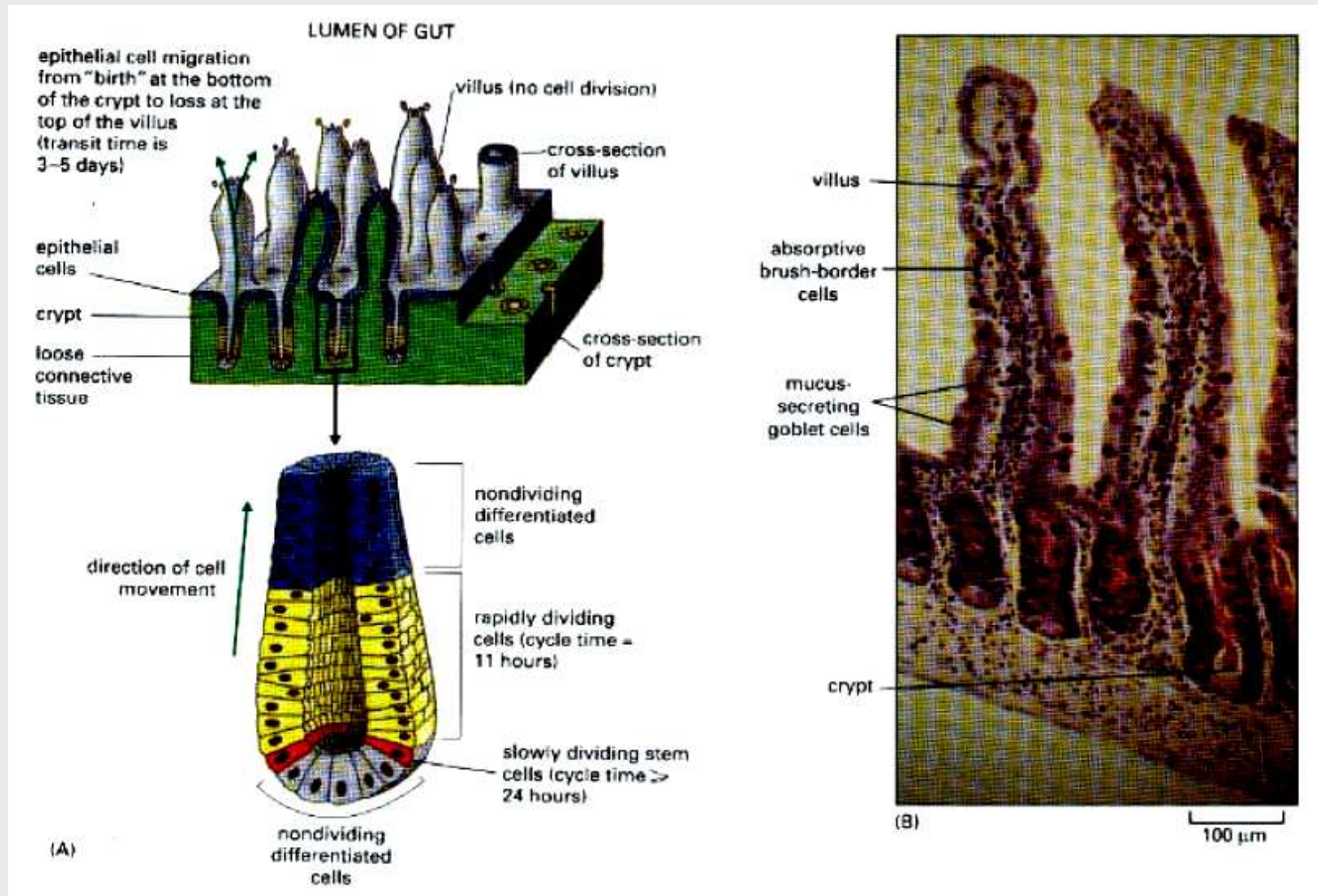
Marcatori di cellule staminali

c-kit 	P-glycoprotein or MRD1 	Sca-1 
Distribution • Melanocytes • Mast cells • Germ cells • Stem cells Functions	Distribution • Hepatocytes–cholangiocytes • Brush border cells • Renal tubular cells • Endothelial cells (brain) • Cancer cells • Stem cells Functions	Distribution • Vessel wall • Kidney cortical tubules • Thymus, spleen • T lymphocytes • Stem cells Functions
• Proliferation • Migration • Differentiation • Secretion	• Transmembrane efflux pump • Inhibition of apoptosis	• Cell adhesion • Cell signalling • T-cell activation

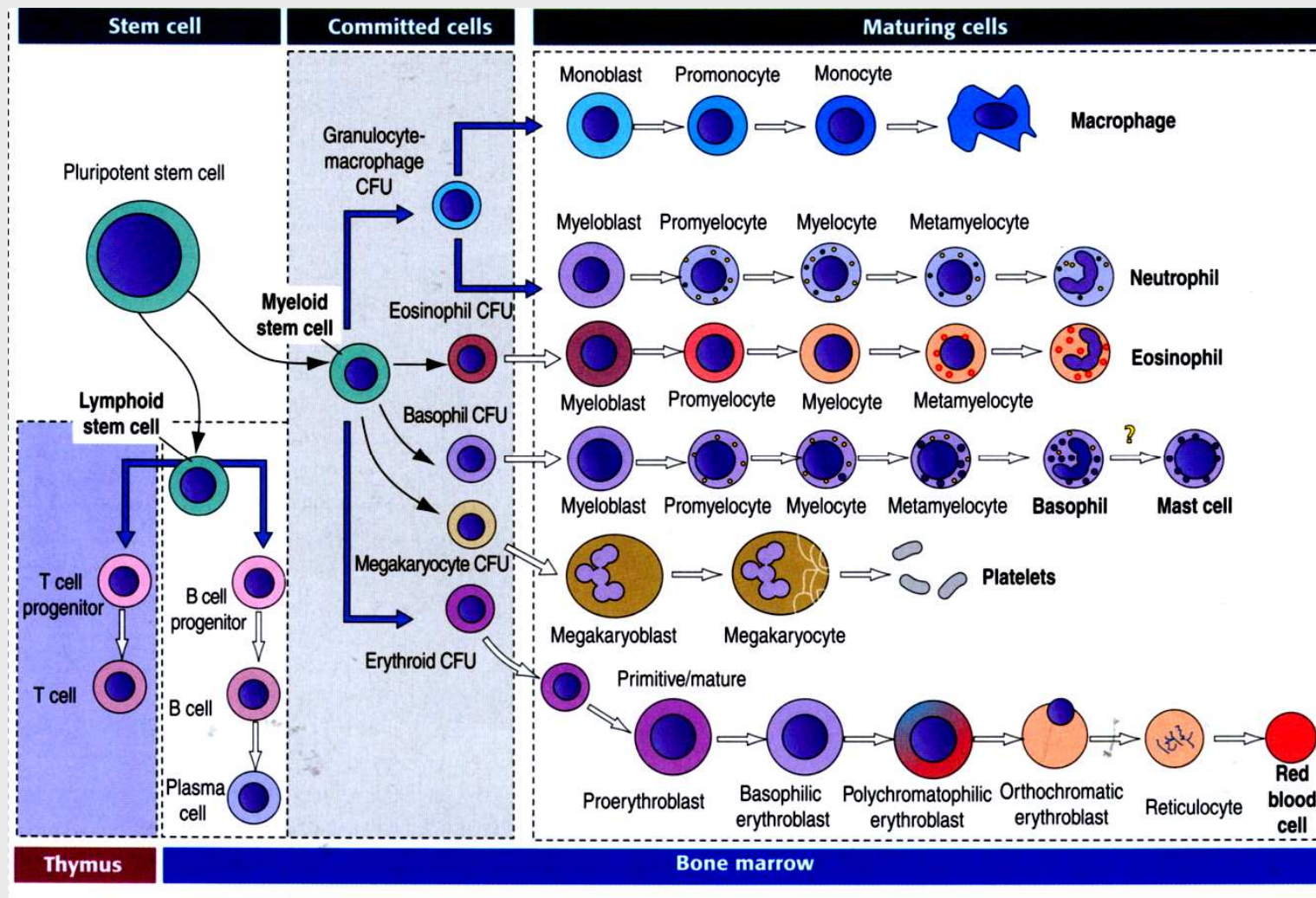
Cellule staminali dell'adulto

- Presenti soprattutto nei tessuti a ricambio fisiologico: **epiteli e sangue**
- Trovate anche in altri tessuti a ricambio limitato: **muscolo scheletrico** (cellule satelliti)
- Recentemente evidenziate, anche se molto limitatamente, in tessuti una volta considerati “perenni”: **nervoso e miocardio**

Cellule staminali dell'apparato GI

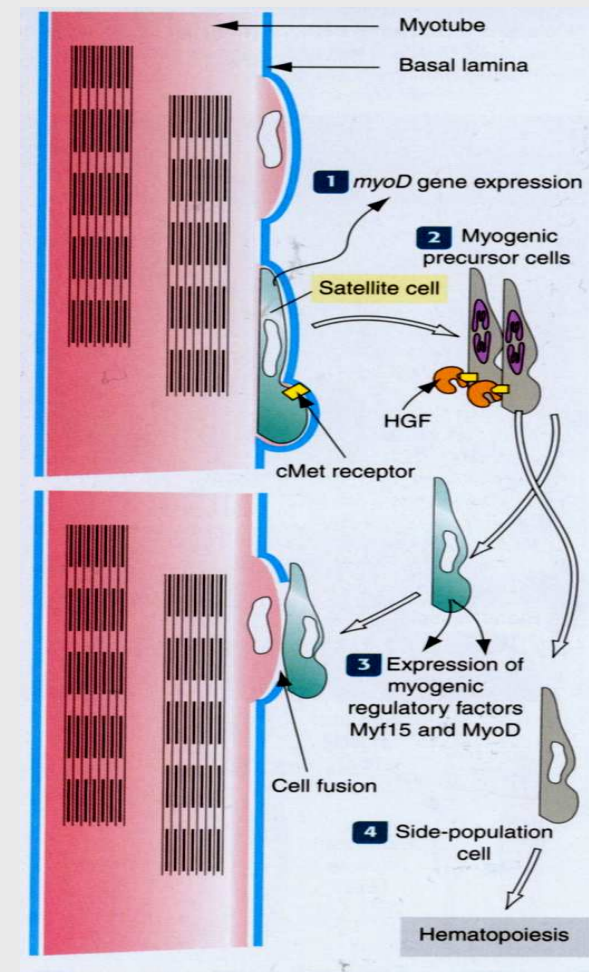
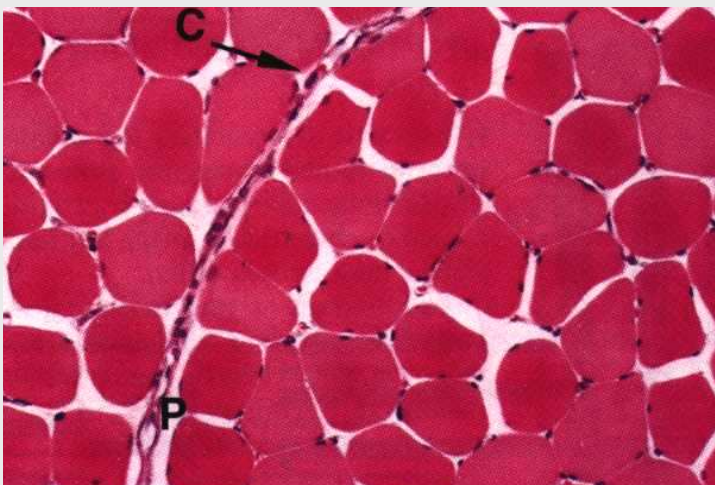
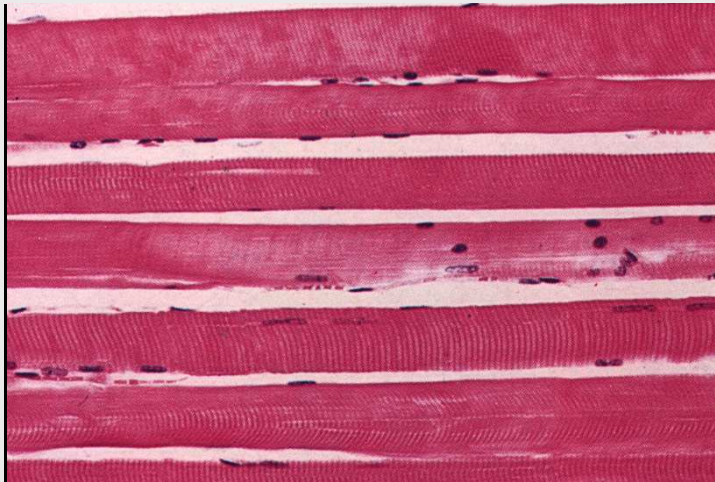


La cellula emopoietica staminale



CFU = Colony Forming Unit

La cellula staminale del muscolo scheletrico (cellula satellite)

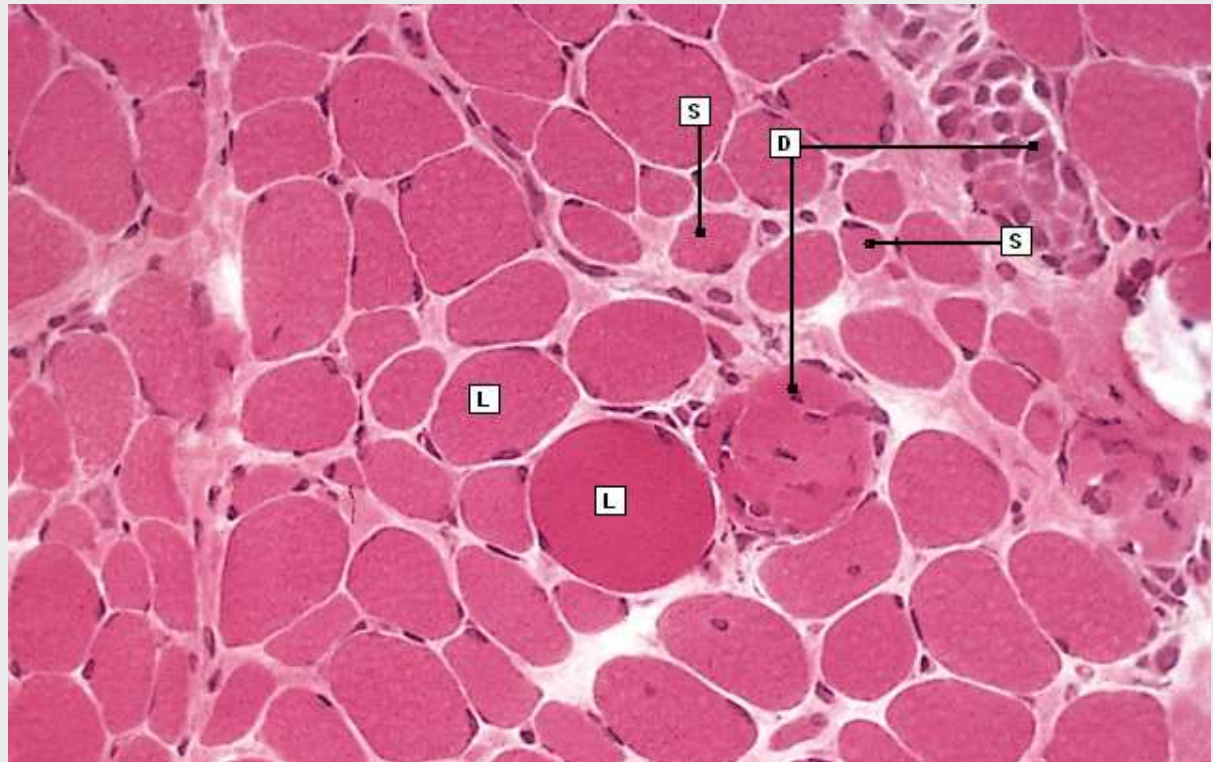
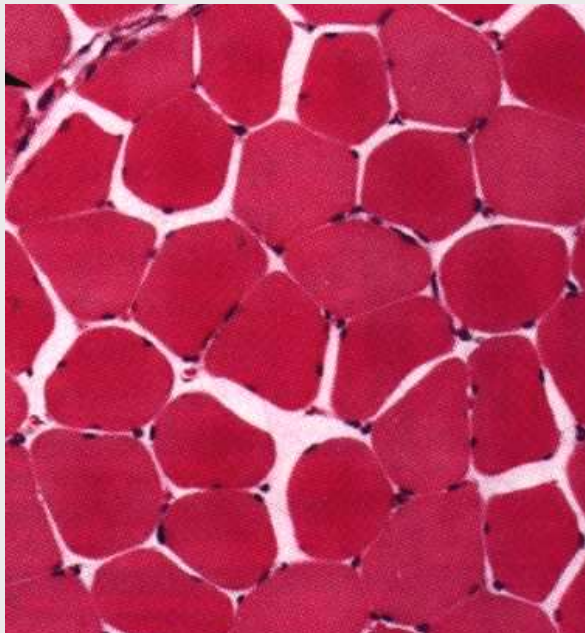


Distrofia muscolare di Duchenne: difetto del gene della distrofina

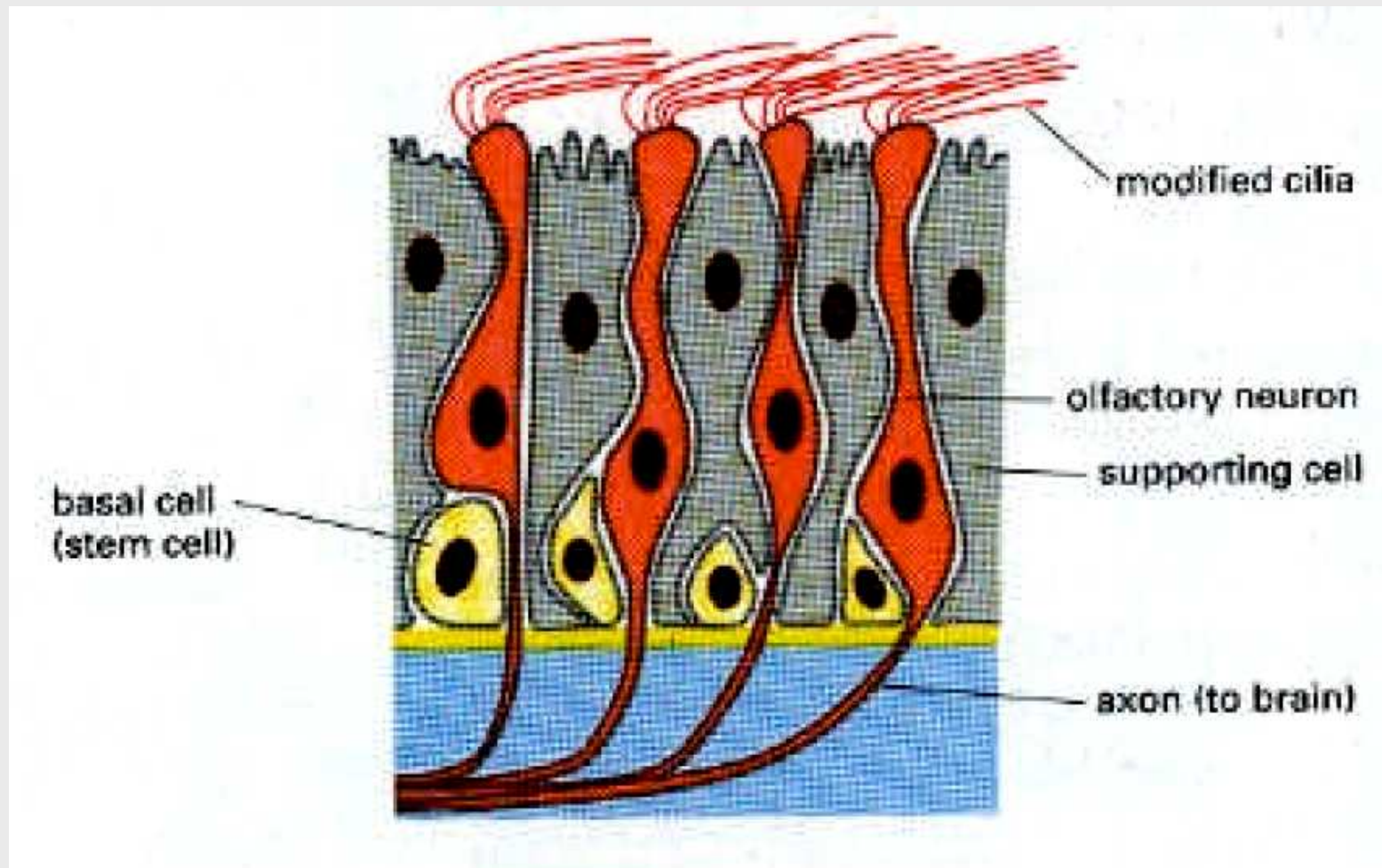
Le fibre malate degenerano e, per compensare, vengono reclutate nuove cellule satelliti
finchè la riserva non è consumata



tessuto
sano



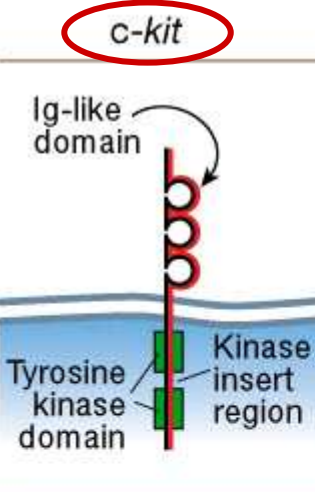
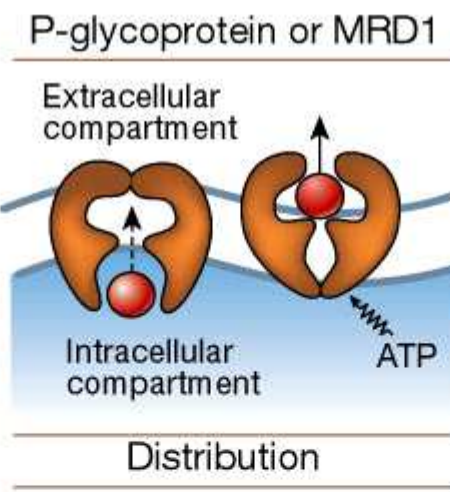
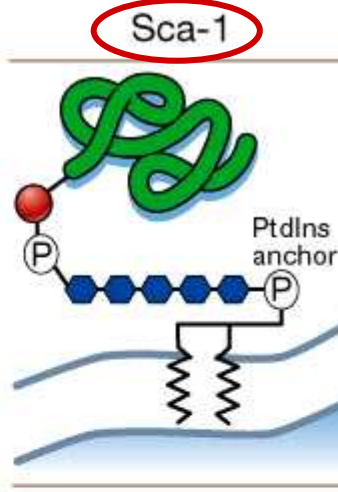
Il neurone olfattivo (ZSV) è una cellula con potenziale staminale



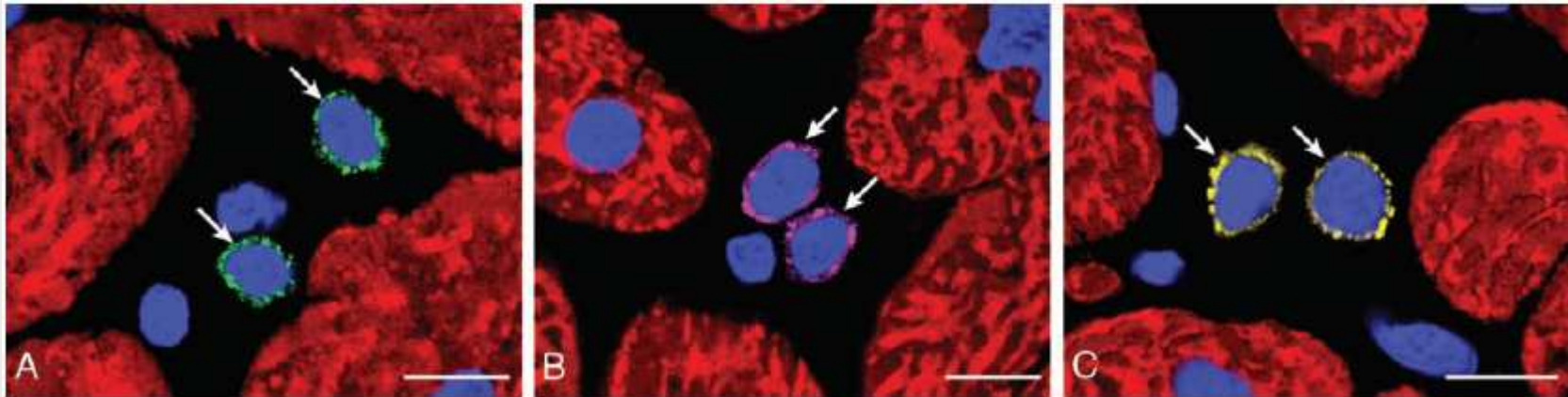
Cellule staminali nel cervello adulto

- Si trovano in due zone:
- Zona sottoventricolare dei ventricoli laterali (dove originano i neuroni olfattivi)
- Zona sottogranulare del giro dentato (integrata con ippocampo)
- Aumentano di numero in caso di danno di organo (exp: neuroni neocorticali che proiettano al talamo). Origine?

Marcatori di cellule staminali

c-kit  Ig-like domain Tyrosine kinase domain Kinase insert region	P-glycoprotein or MRD1  Extracellular compartment Intracellular compartment ATP	Sca-1  PtdIns anchor
Distribution • Melanocytes • Mast cells • Germ cells • Stem cells	Distribution • Hepatocytes–cholangiocytes • Brush border cells • Renal tubular cells • Endothelial cells (brain) • Cancer cells • Stem cells	Distribution • Vessel wall • Kidney cortical tubules • Thymus, spleen • T lymphocytes • Stem cells
Functions • Proliferation • Migration • Differentiation • Secretion	Functions • Transmembrane efflux pump • Inhibition of apoptosis	Functions • Cell adhesion • Cell signalling • T-cell activation

Cellule staminali nel miocardio adulto



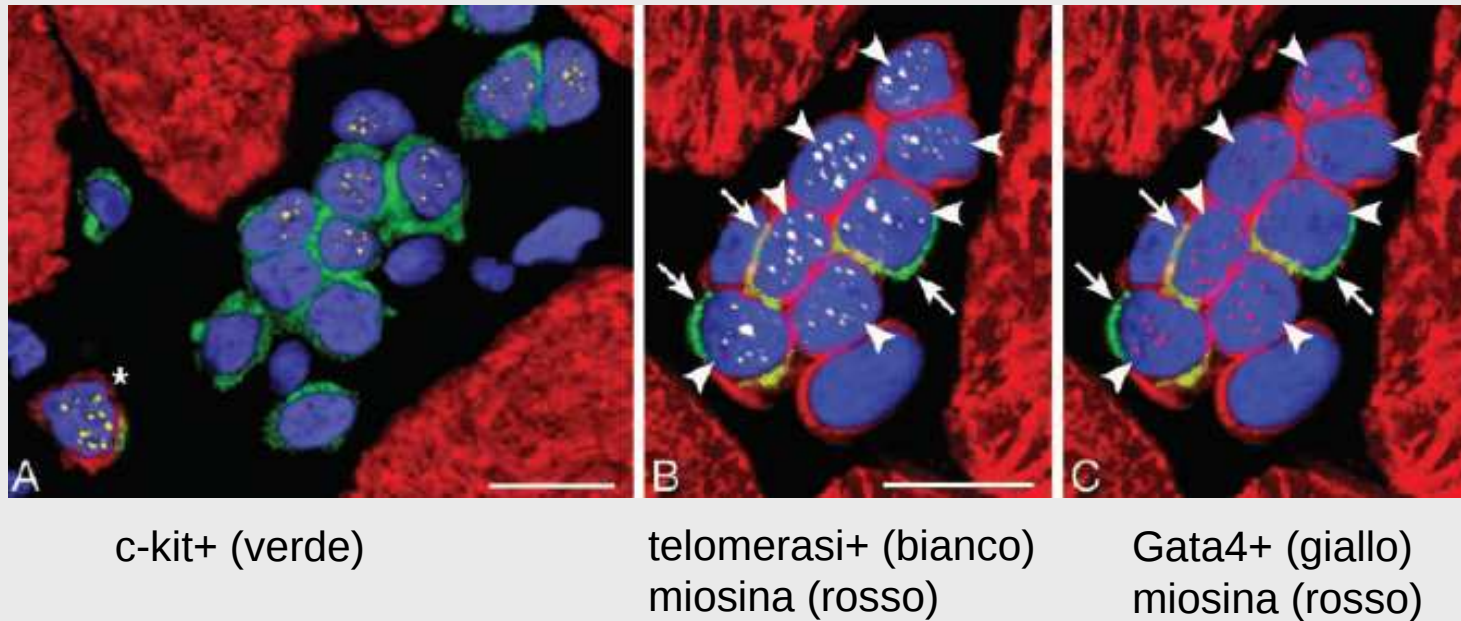
c-kit+

MDR+

Sca1+

Urbanek et al., Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 2003

Cellule staminali nel miocardio adulto che ha subito danno



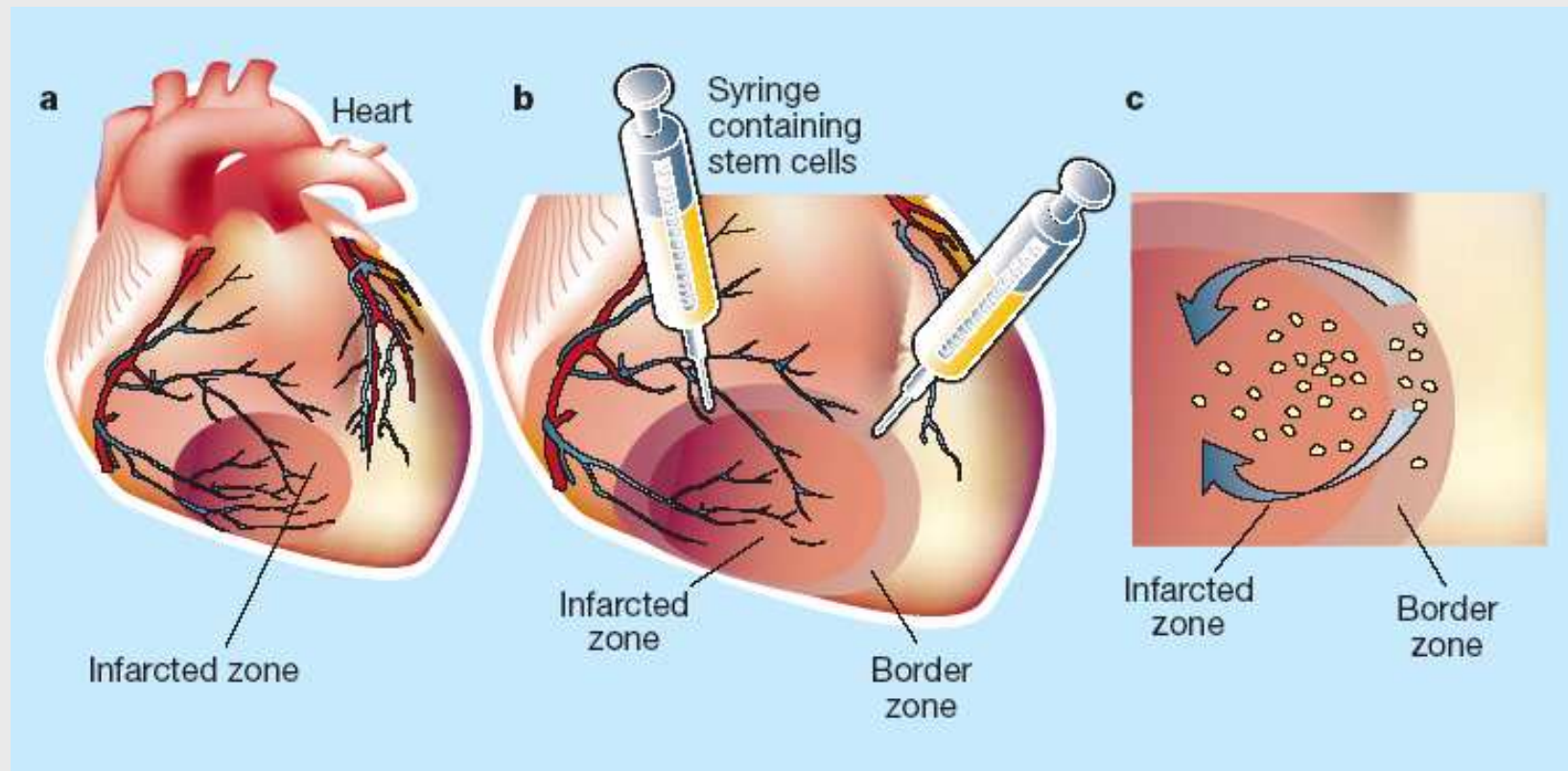
In seguito a danno d'organo proliferano (telomerasi+) e poi si differenziano, acquisendo l'espressione di marcatori miocardio-specifici (GATA4, MEF-2c, alpha-cardiac MHC, laminina)

Urbanek et al., Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 2003

Cellule staminali dell'adulto

- Tessuti diversi ne contengono livelli diversi
- Queste cellule staminali hanno generalmente una potenzialità limitata al tipo cellulare maturo che compone il tessuto/organo
- → il microambiente (nicchia) dà indicazioni sul destino della cellula staminale
- → possibilità di trapiantare cellule non differenziate, che subiranno l'influenza dell'ambiente

Cellule mesenchimali staminali (MSC) riparano il cuore infartuato



Pochi laboratori sono riusciti a confermare il dato!!! Sussman, Nature 5 aprile 2001

Le cellule del midollo osseo hanno maggiori potenzialità

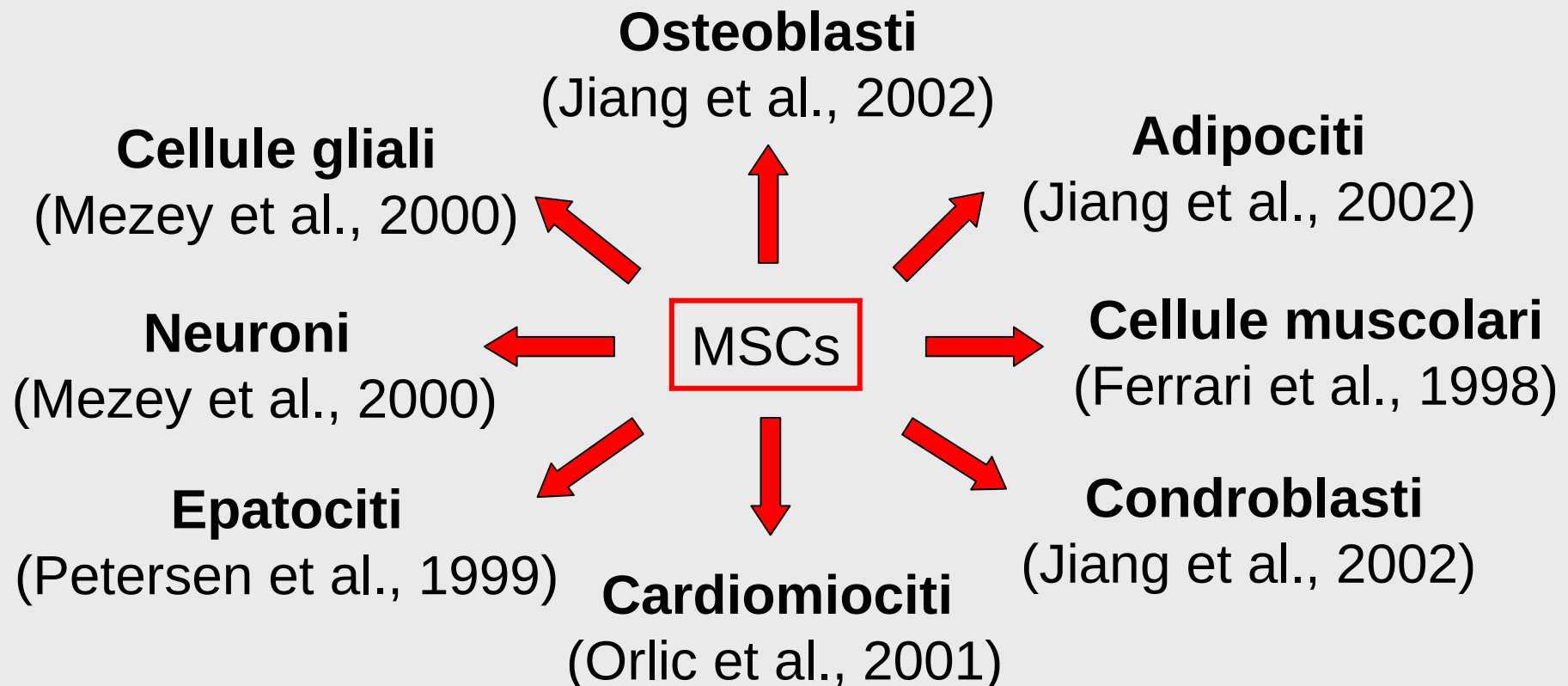
- Cellule staminali emopoietiche
- Cellule staminali/progenitori endoteliali
- Cellule staminali mesenchimali
- Cellule progenitrici multipotenti adulte (MAPC)

Bone Marrow = as complex as a forest ecosystem

Nature, 20 may 2005

Le cellule staminali mesenchimali (MSC)

Sono state identificate all'interno del midollo osseo nel 1970 da Friedenstein come unità formanti colonie dei fibroblasti (**CFU-Fs**).



Definizioni delle cellule staminali ES, EG, EC o da adulto

- **Totipotente**: zigote e primi blastomeri (da' origine anche al trofoblasto)
- **Pluripotente**: non toti-potenti perche'non producono tess. extraembrionari)
 - ES Embryonic stem (dall'epiblasto della blastocisti)
 - EG (embryonic germ cell, dalle cellule germinali primordiali)
 - EC (embryonal carcinoma o terarocarcinoma cells)
- **Multipotente** danno origine a molte ma non a tutte le linee maturative (esempi: HSC o MSC) di solito lo sono le **cell. Stam. adulte**
- **Unipotente** danno origine a tutte le tappe (soprattutto prolif. illimitata) di una linea maturativa
- **Progenitore** (telomerasi inattiva, ma non nei topi): numero di divisioni limitate ma potenzialita' differenziative illimitate per un certa linea maturativa
- **Precursore** (per molti sinonimo di progenitore): numero di divisioni limitate e potenzialita' differenziative molteplici ma non illimitate

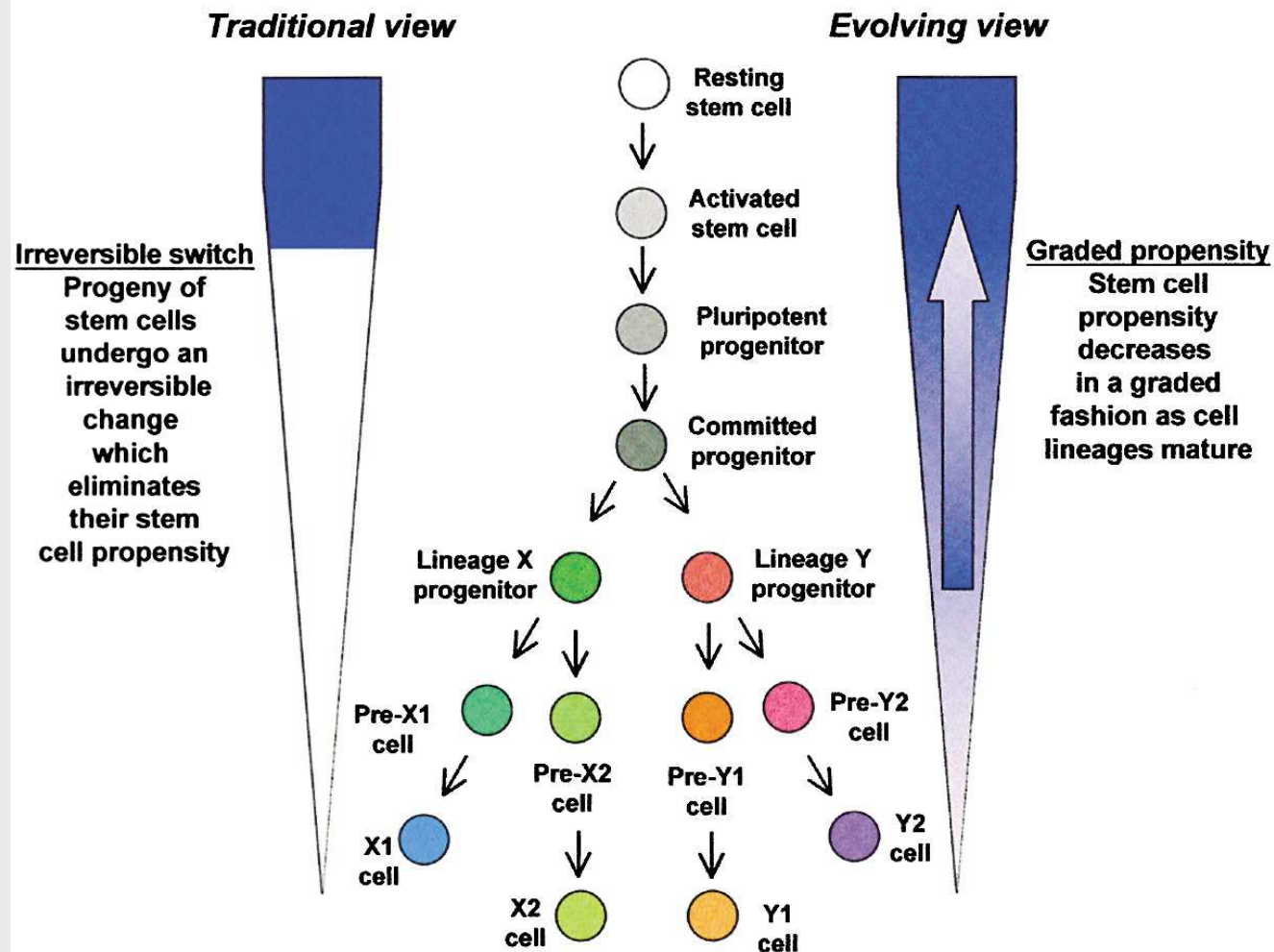
Definizioni delle cellule staminali ES, EG, EC o da adulto

- **tutte sbagliate** perche'
- 1) prevedono una evoluzione verticale o gerarchica
- 2) in divenire perche' le conoscenze sono in sviluppo
- 3) le definizioni sono "operazionali"
- **forse tutte giuste?** vedi "limiti" della plasticita'

Curiosita' o utilita'?

Entita' o funzione?

STEM CELL POTENTIALS



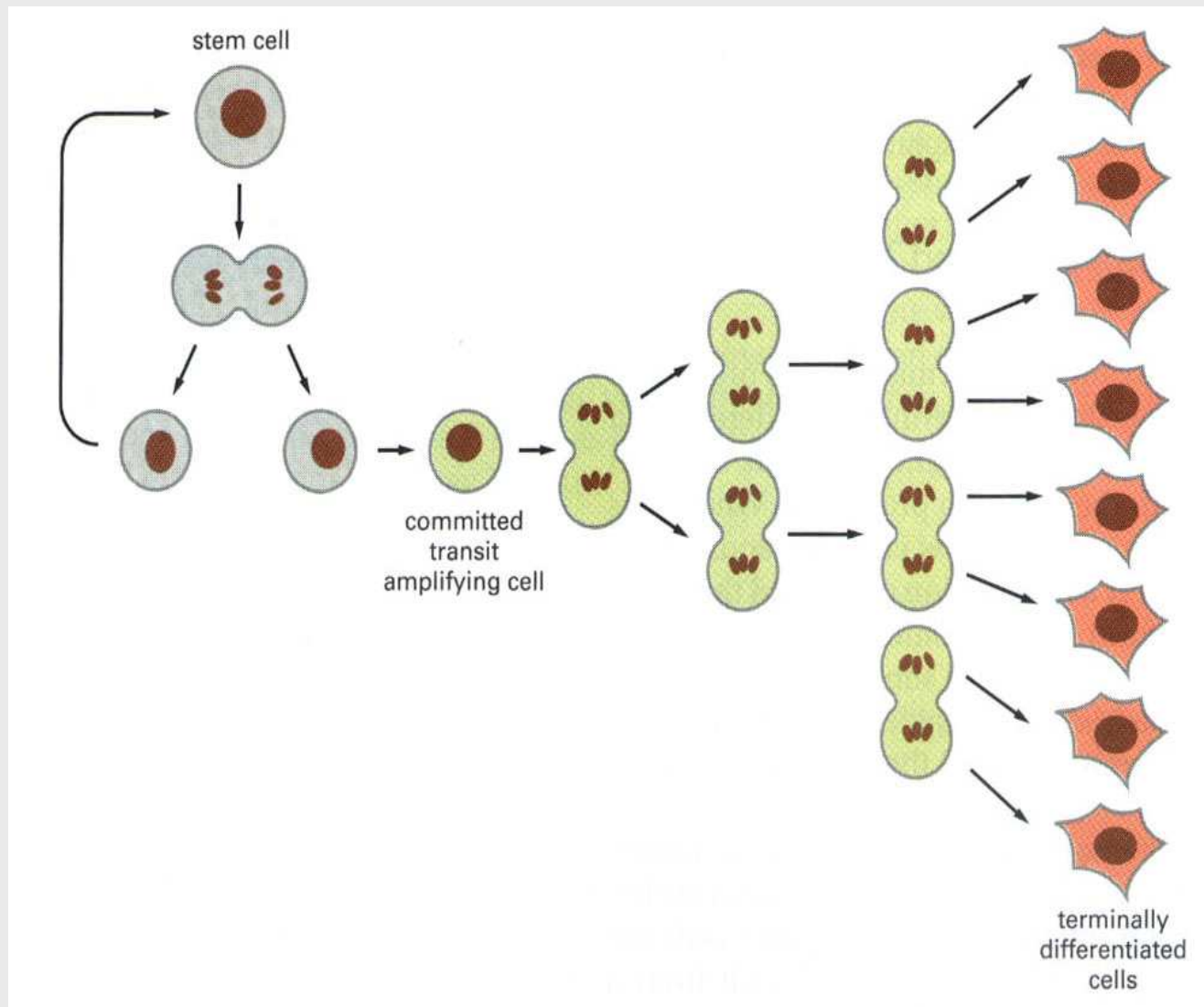
Differenziamento fisiologico

- Espressione di pochi dei 30-40,000 geni umani
- Assunzione di un fenotipo specifico (200 tipi di cellule)
- Nessuna alterazione o delezione del DNA (nella maggioranza delle cellule)
- Meccanismi **epigenetici ereditabili** (metilazione del DNA, imprinting)
- Memoria molecolare ereditabile attraverso meccanismi epigenetici
- Stabilità del fenotipo
- **NOVITA': Possibilità di riprogrammazione**

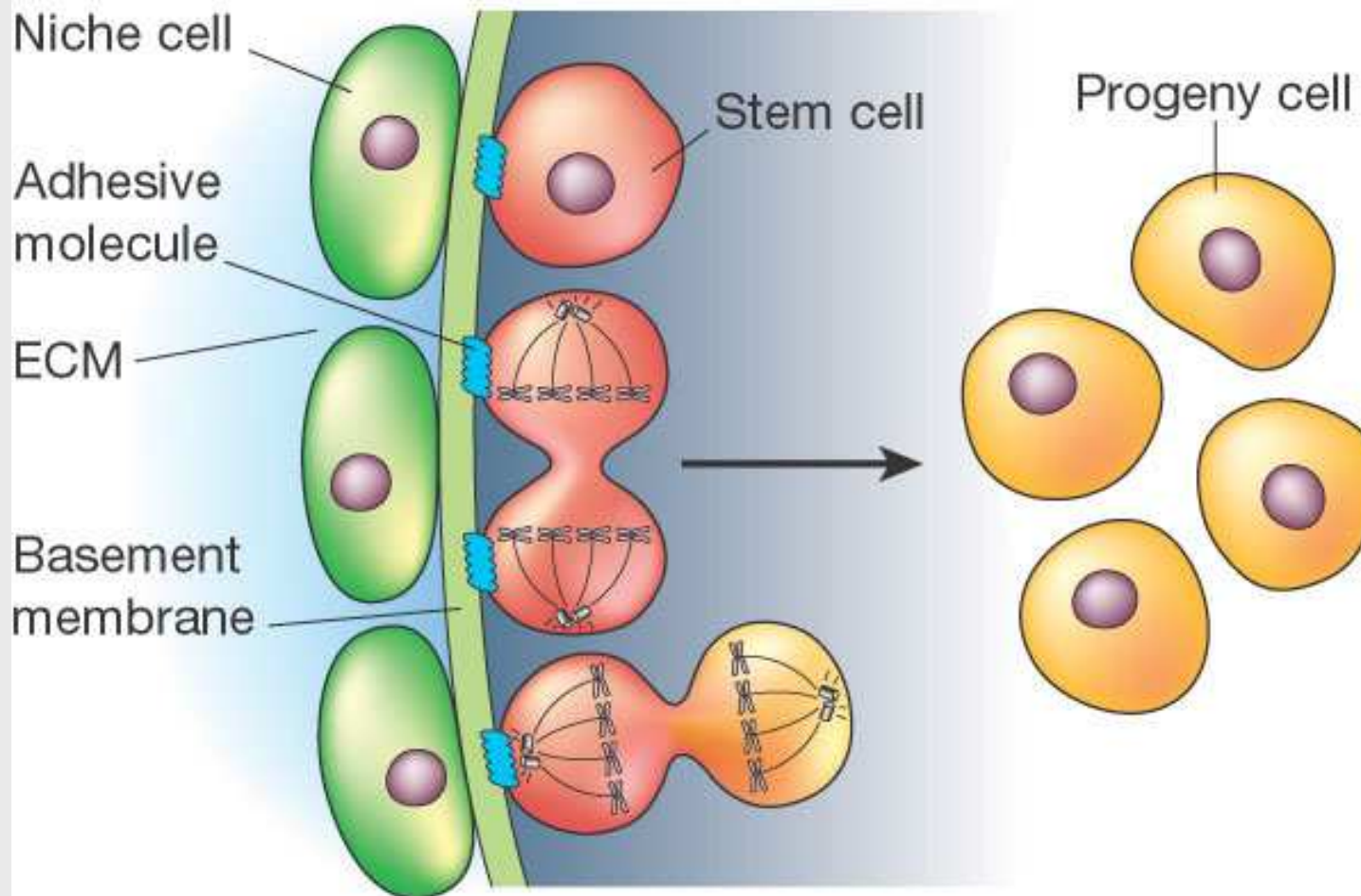
Regolazione della differenziazione

- Memoria molecolare ereditabile attraverso meccanismi epigenetici
- Manipolazione: riprogrammazione del nucleo
 - La “nicchia” ambientale
- Cambio della nicchia, delle proteine di adesione,
- Uso di fattori solubili

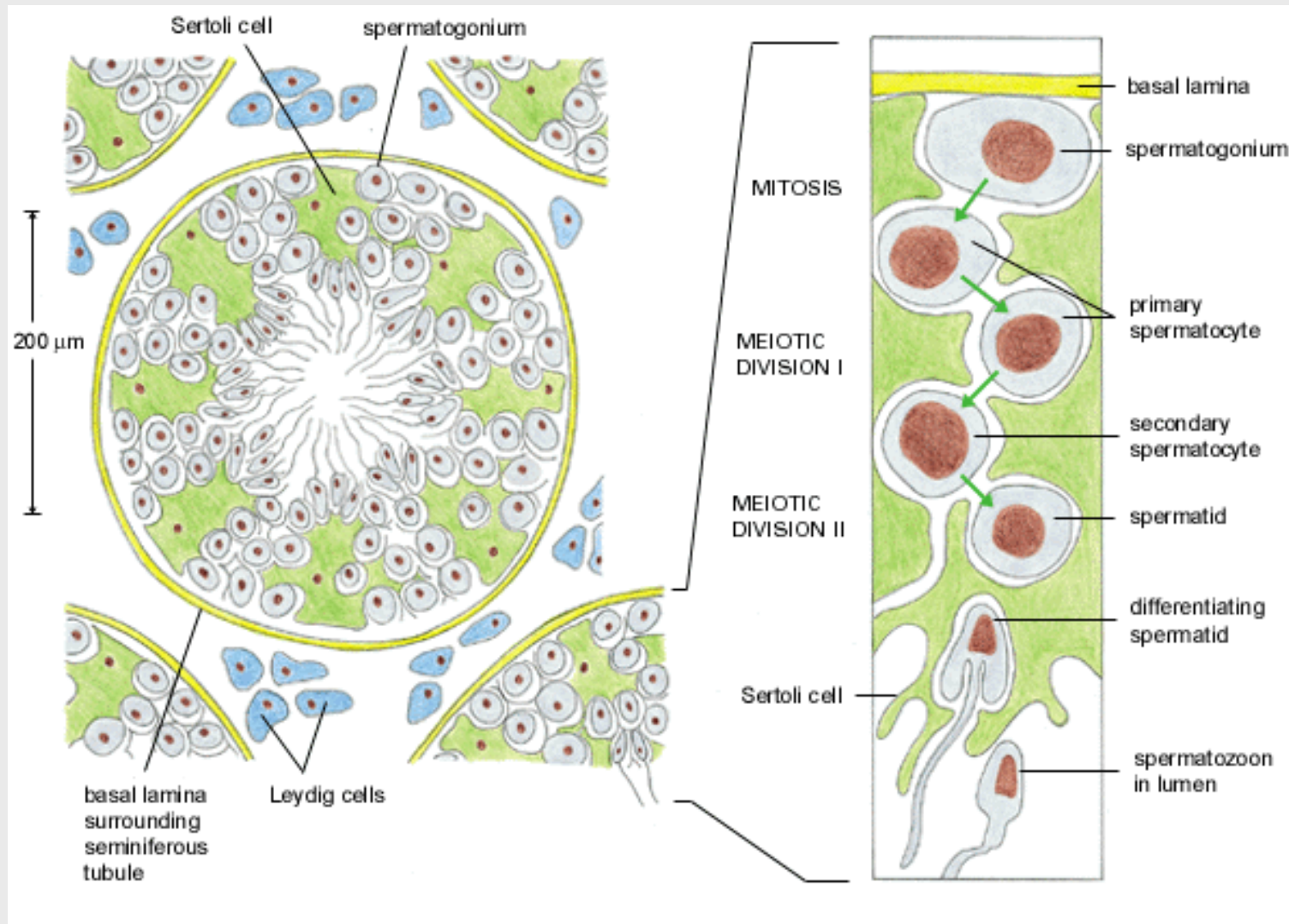
Amplificazione e differenziazione delle cellule staminali adulte



Differenziazione: la nicchia ambientale



Differenziazione : la nicchia ambientale del testicolo



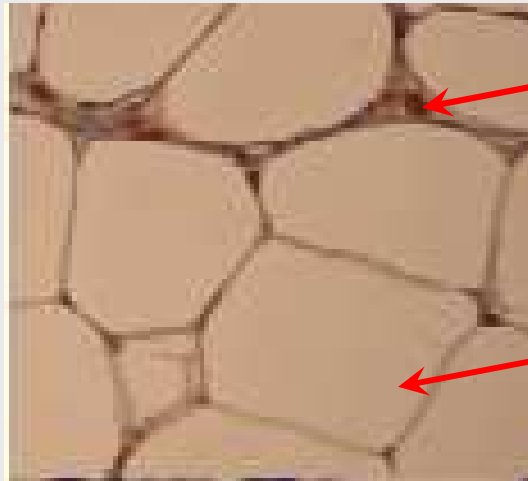
Tessuti con potenziale staminale

- Midollo osseo
- Cordone ombelicale
- Sangue
- Tessuto adiposo → epitelio, osso, tess nervoso, emopoietico, endotelio
- Placenta
- Polpa dentaria

Strategia

- Prima le cellule vengono espanse in vitro
- Poi vengono “educate” con opportuni stimoli/segnali ad intraprendere la direzione differenziativa voluta
- Ricapitolare i cambiamenti del microambiente, che caratterizzano il lungo transito da cellula embrionale a tessuto adulto.

Il tessuto adiposo



Tessuto connettivo

Adipociti

Nella frazione stromale/vascolare sono presenti diversi tipi cellulari:

- Cellule muscolari lisce
- Fibroblasti
- Macrofagi
- Cellule staminali mesenchimali multipotenti (**ADSC**)
- Cellule endoteliali
- Linfociti
- Pre-adipociti

Le MSC da midollo, da tessuto adiposo e da cordone ombelicale sono **simili** per:

- Morfologia fibroblastoide
- Immunofenotipo (CD 29, CD90, CD 105)

Le MSC estratte da tessuto adiposo sono **superiori** per:

- Clonogenicità
- Percentuale all'interno del tessuto

(Kern et al., 2006; Izadpanah et., 2007)

Le ADSC sono una buona fonte di cellule staminali per la medicina rigenerativa?

- Le semplici procedure cliniche di asportazione del tessuto
- La semplice procedura di estrazione delle cellule
- L'abbondanza di cellule staminali mesenchimali

Fanno di questo tessuto un'ottima sorgente di cellule staminali mesenchimali da utilizzare nella medicina rigenerativa

Il limite delle cellule staminali
è la difficoltà di mantenimento in coltura



senescenza dopo breve tempo in coltura

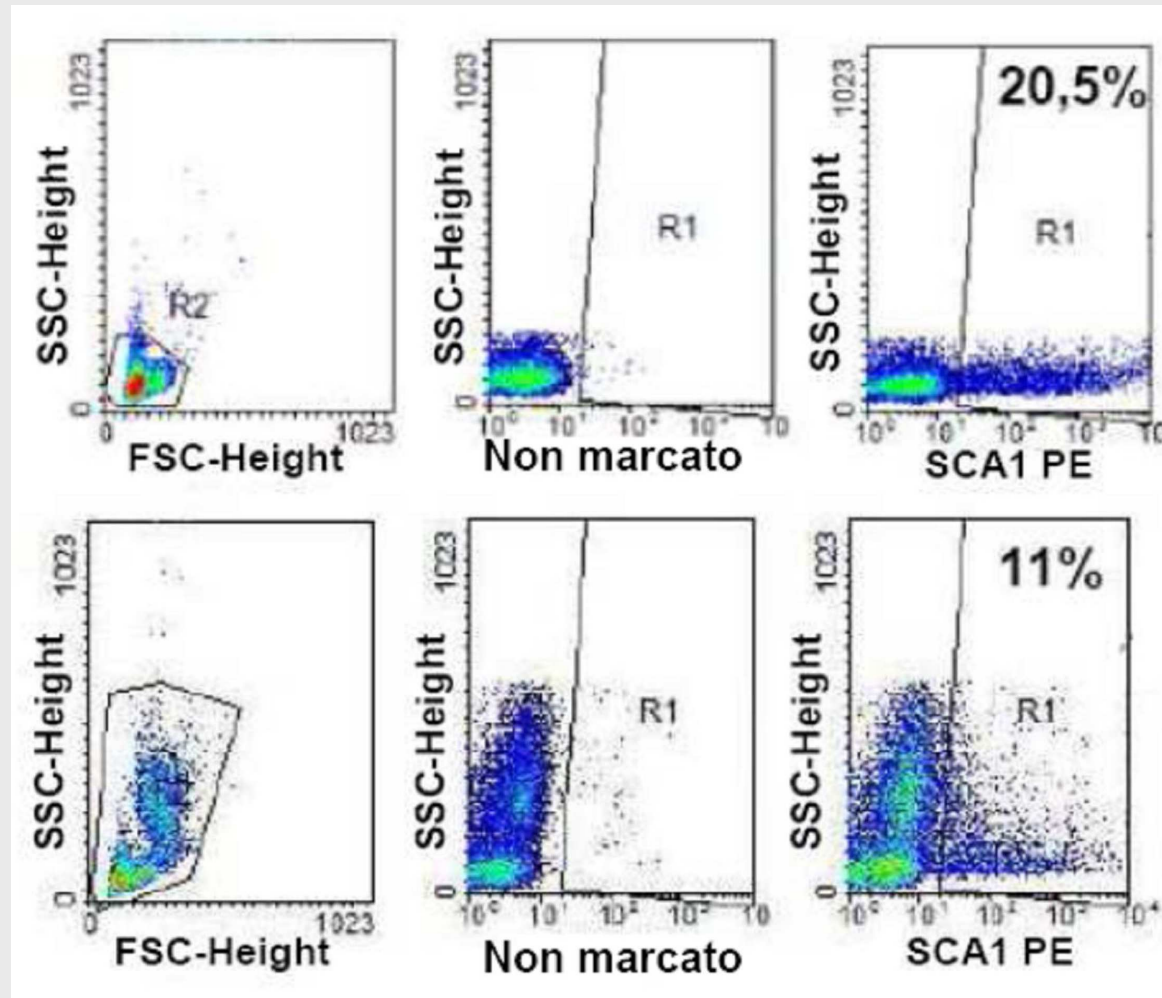
*Una soluzione potrebbe essere la stabilizzazione
di una popolazione di cellule staminali che
permetta la ripetibilità degli esperimenti e un
numero elevato di cellule*

Estrazione e selezione delle cellule della frazione stromale di tessuto adiposo

- Estrazione del tessuto adiposo sottocutaneo inguinale murino
- Lavaggio in PBS e frammentazione del tessuto con un bisturi
- Digestione dei frammenti con collagenasi a 37°C per 1 ora
- Filtrazione con un filtro da 30 µm
- Centrifugazione
- Selezione immunomagnetica per l'antigene Sca-1

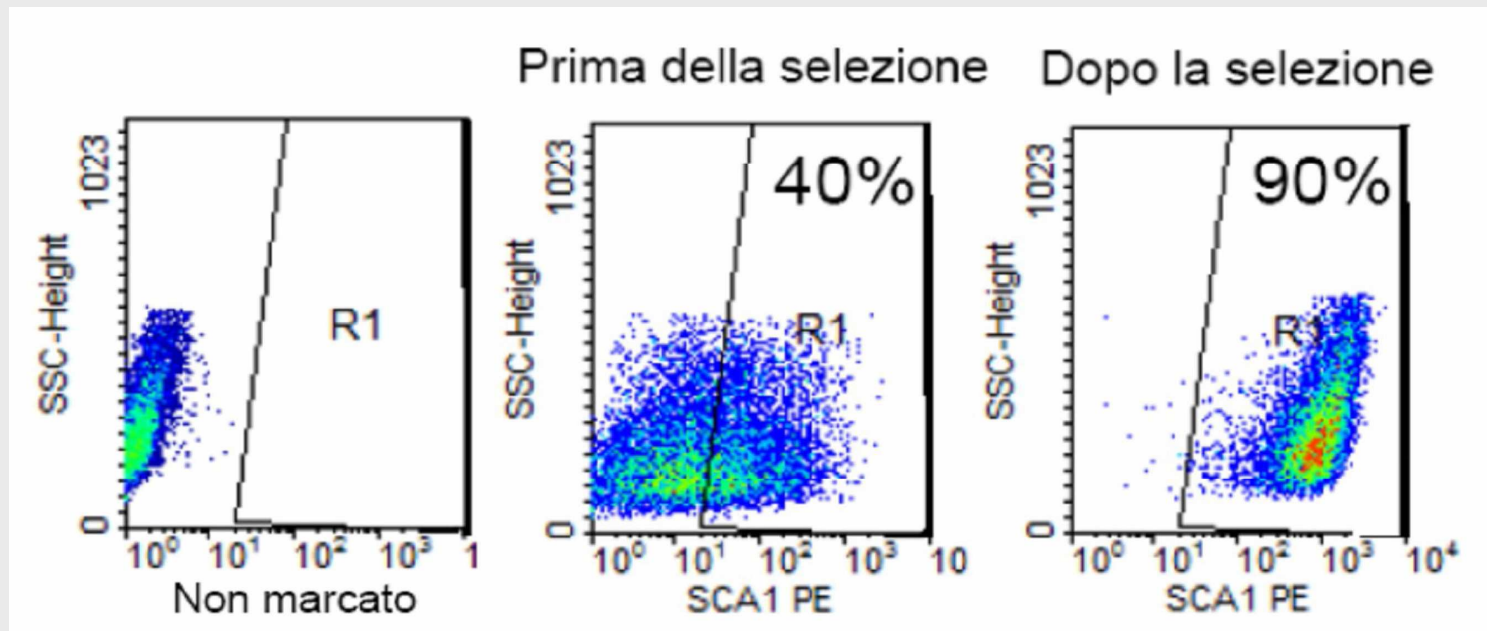
Il tessuto adiposo contiene cellule Sca-1^{POS}

Tessuto
adiposo

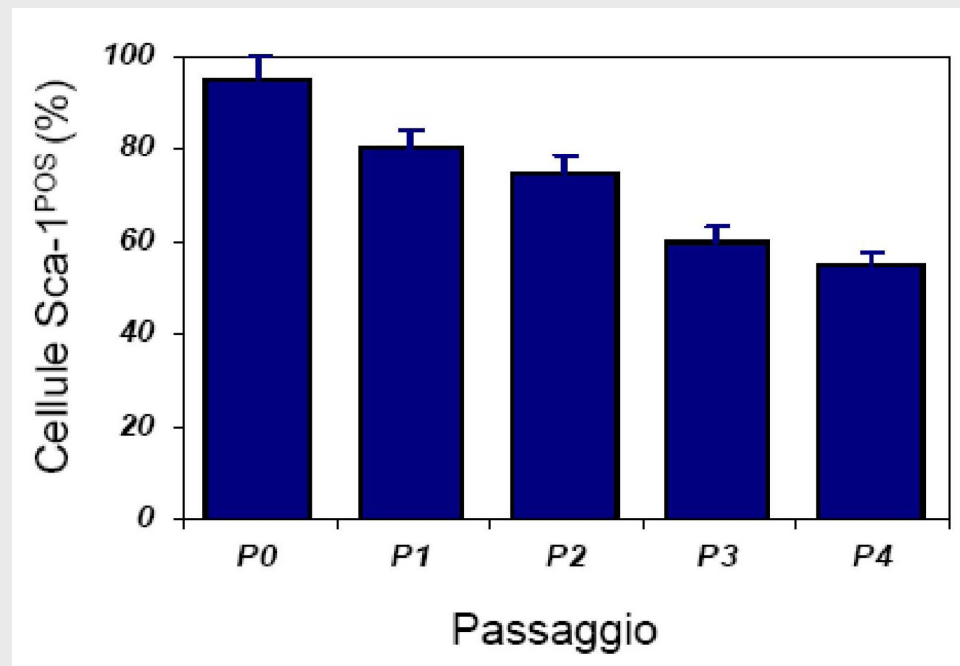


Midollo
osseo

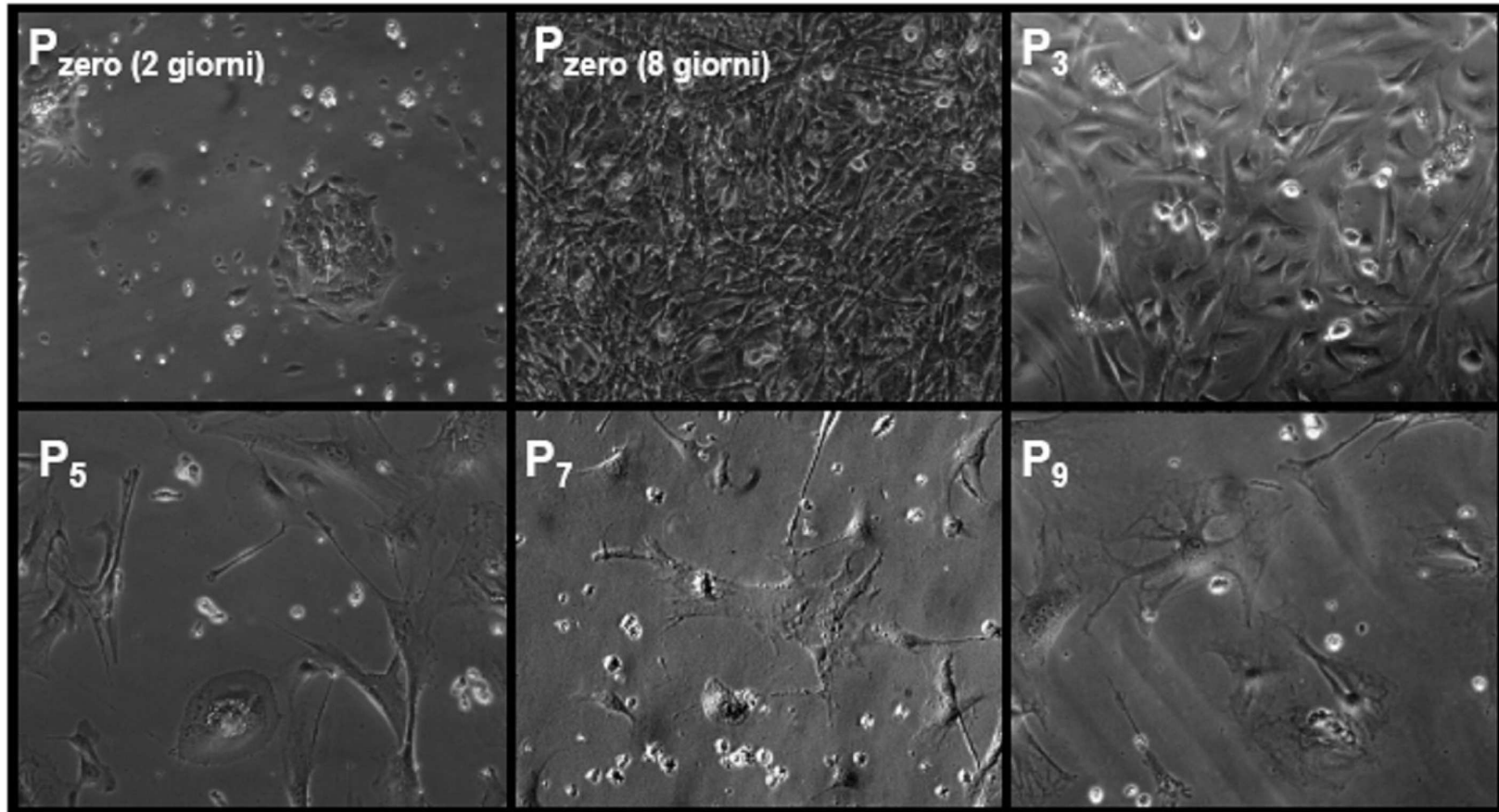
Le cellule Sca-1^{POS} sono una popolazione cellulare omogenea dopo la selezione immunomagnetica



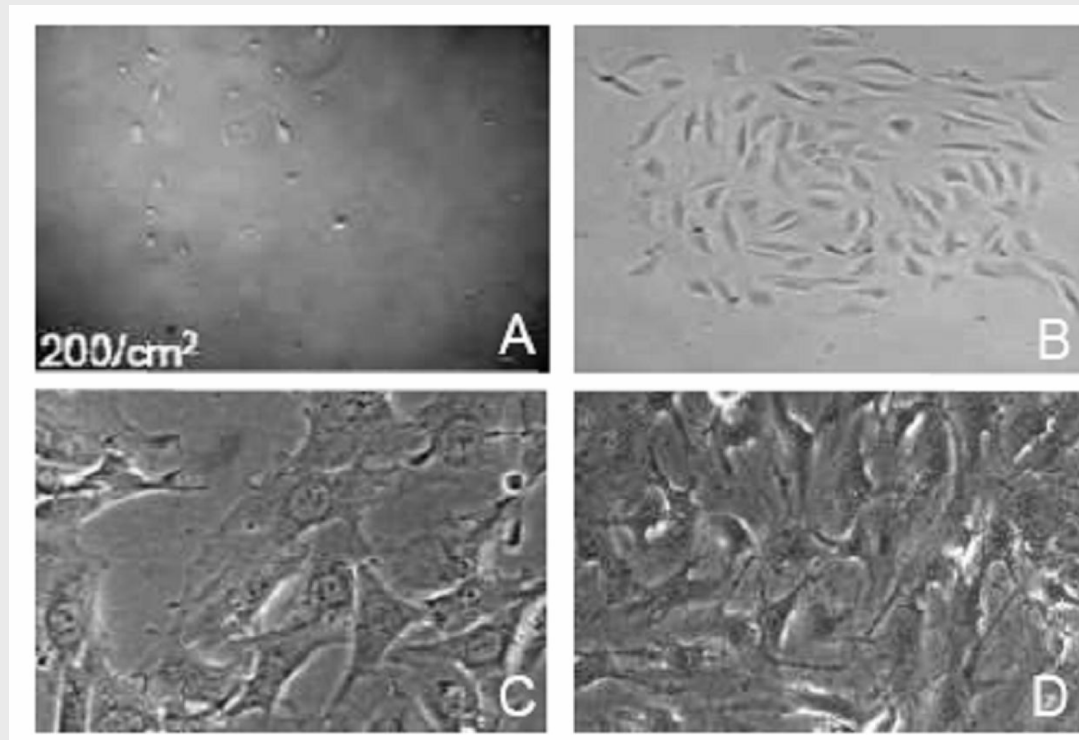
L'espressione di Sca-1 nelle cellule primarie diminuisce nel tempo



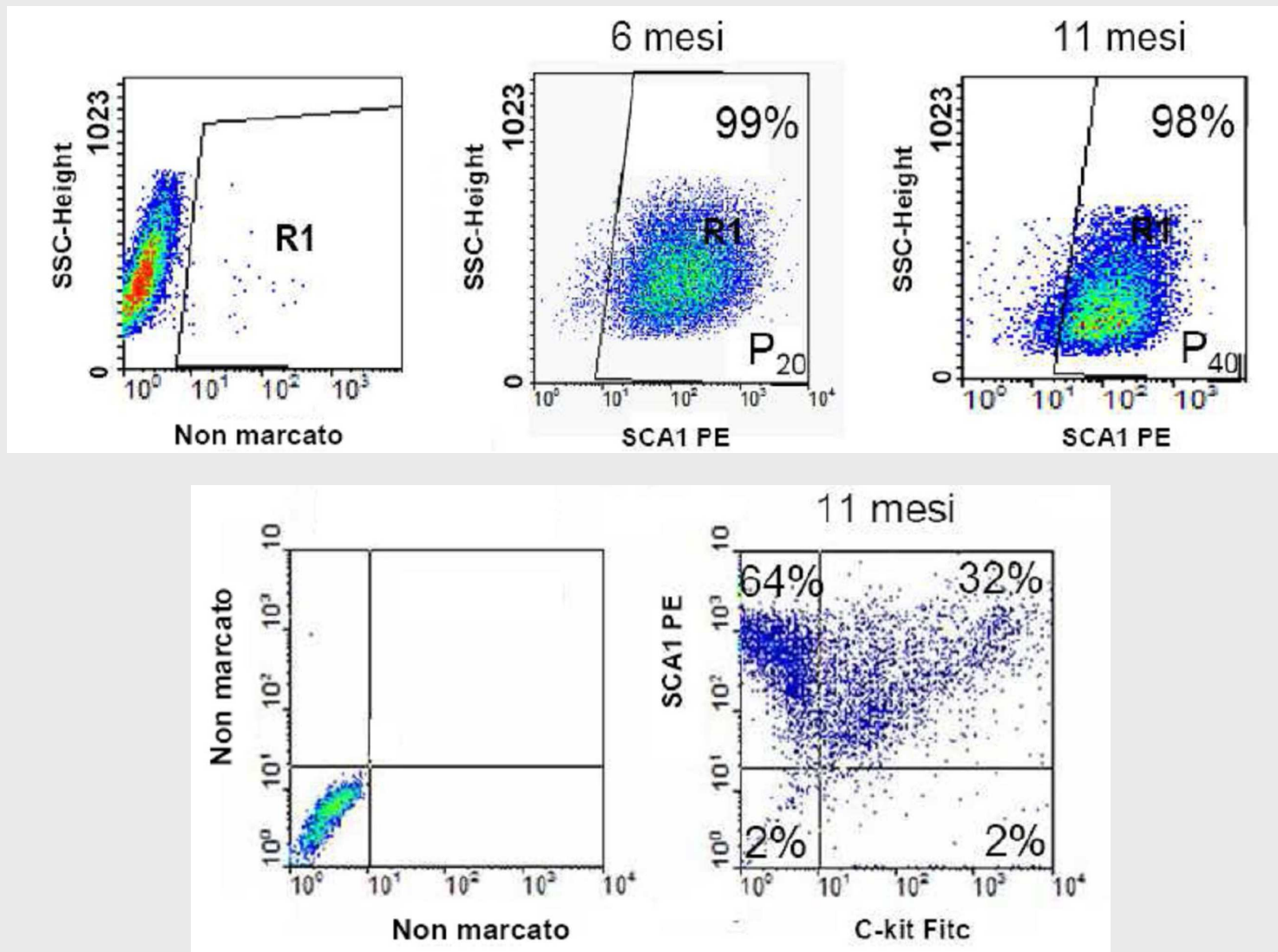
Le cellule Sca-1^{POS} diventano senescenti dopo poco tempo in coltura



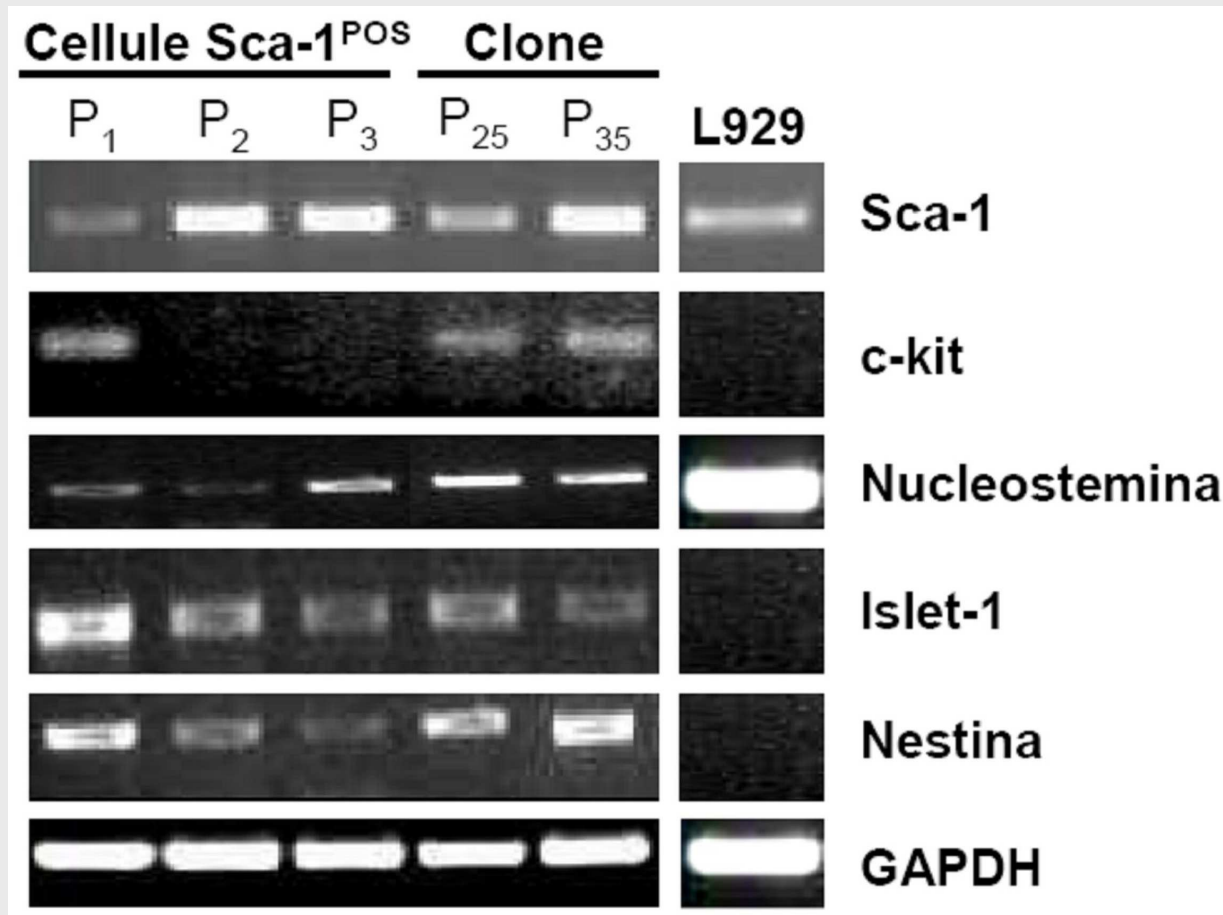
Generazione di un clone di cellule (m17.1SC) dalla popolazione Sca-1^{POS}



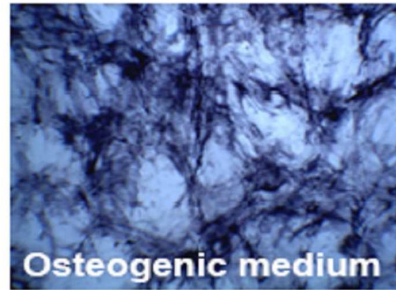
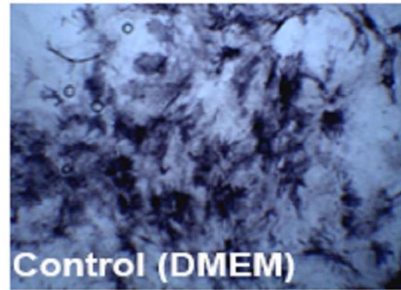
Espressione di Sca-1 e c-kit su m17.1SC a passaggi avanzati in coltura



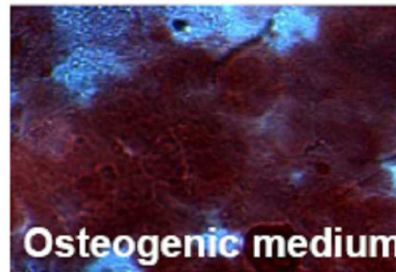
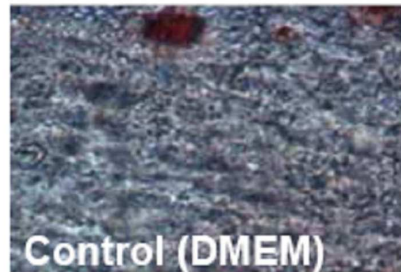
Espressione di marcatori di staminalità nelle cellule m17.1SC dopo un anno in coltura



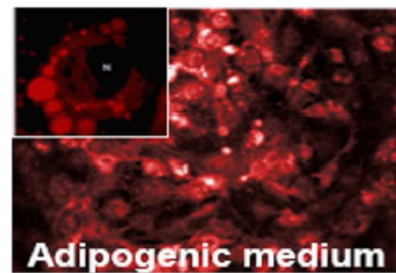
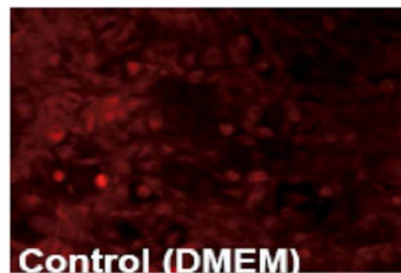
Il clone m17.1SC ha caratteristiche di multipotenza *in vitro*



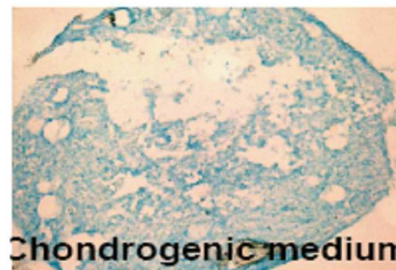
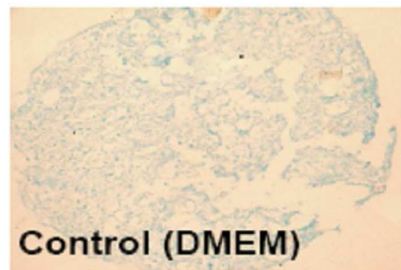
Fosfatasi Alcalina



Alizarin Red

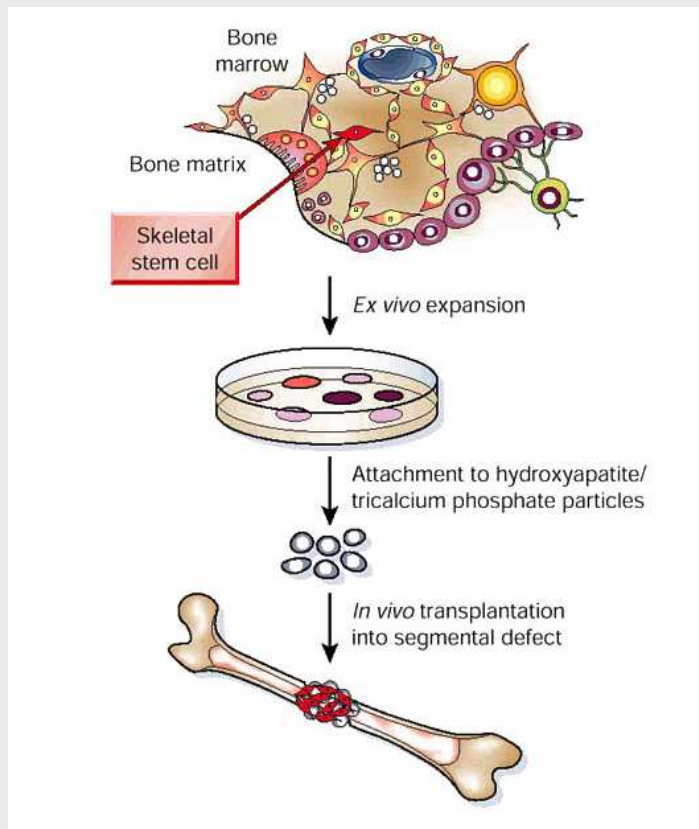


Adipo Red



Alcian Blue

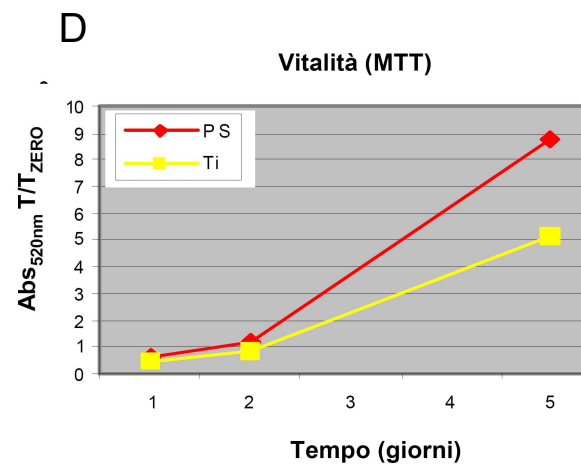
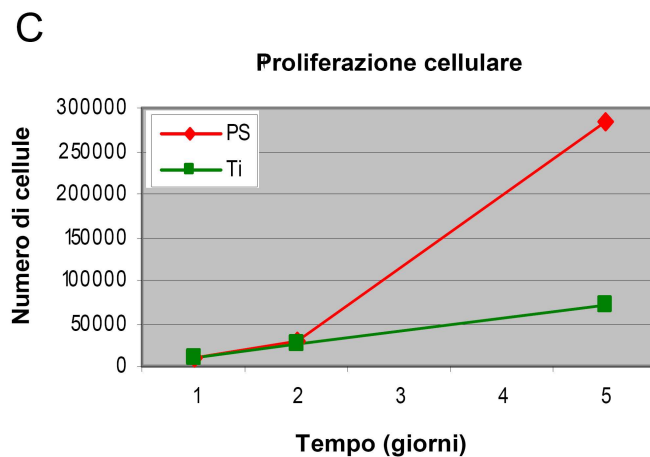
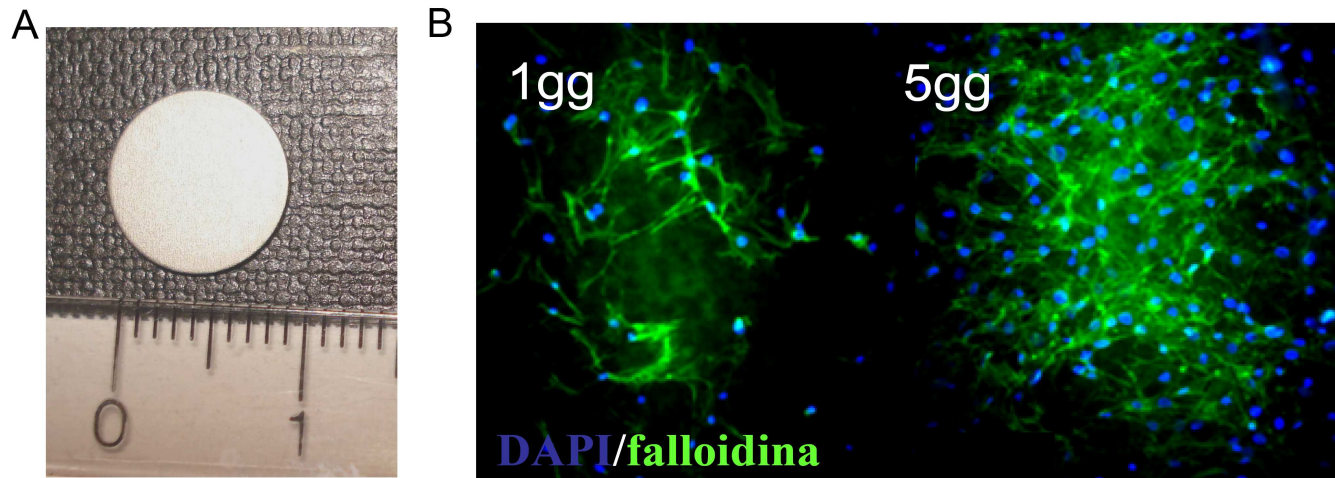
Le cellule staminali nella medicina rigenerativa del tessuto osseo



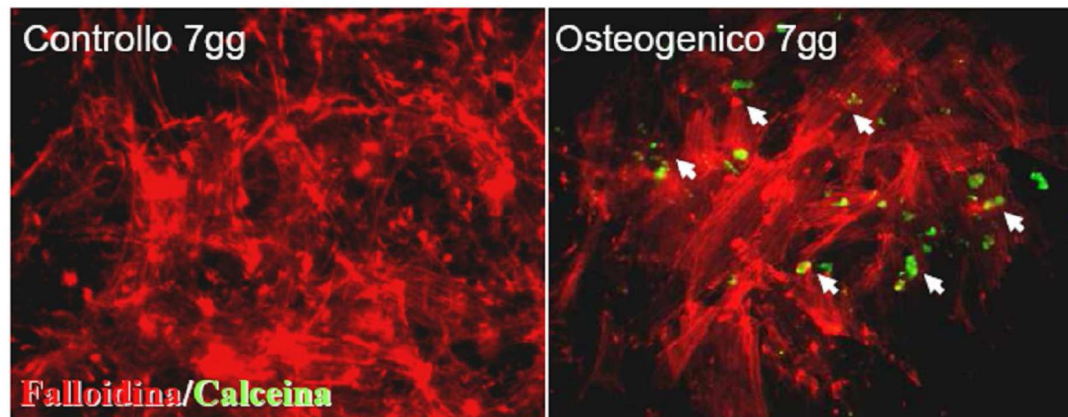
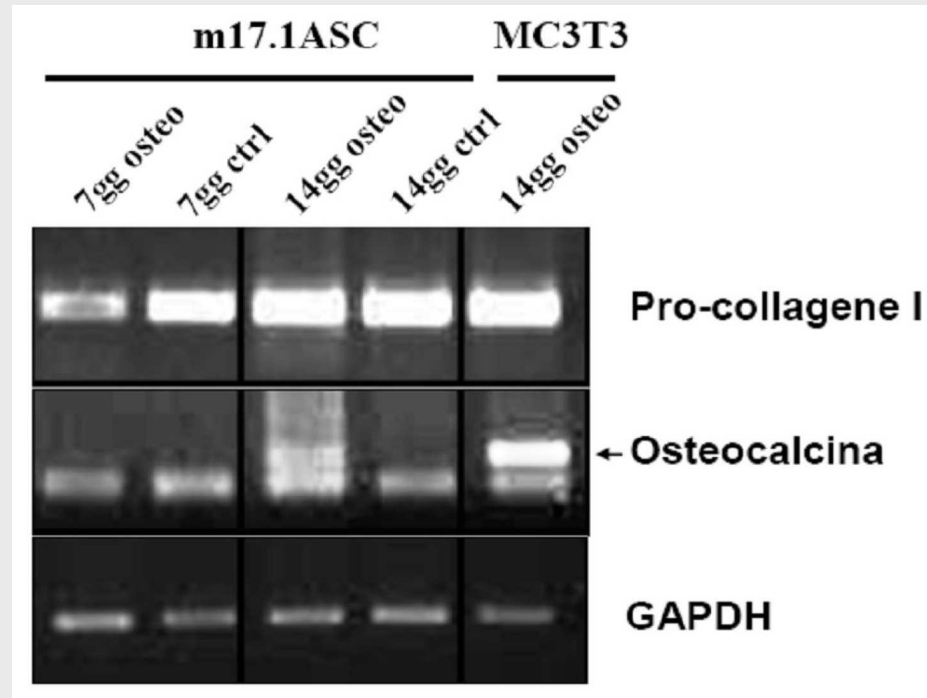
- Rappresentano un'alternativa alle procedure di sostituzione ossea
- Devono essere indotte verso il fenotipo osteoblastico
- Devono essere associate a matrici

Il titanio è una matrice biocompatibile e ampiamente utilizzata nella medicina rigenerativa dell'osso

Adesione e proliferazione delle cellule m17.1SC su dischi di titanio



Differenziamento osteogenico delle cellule m17.1SC su dischi di titanio



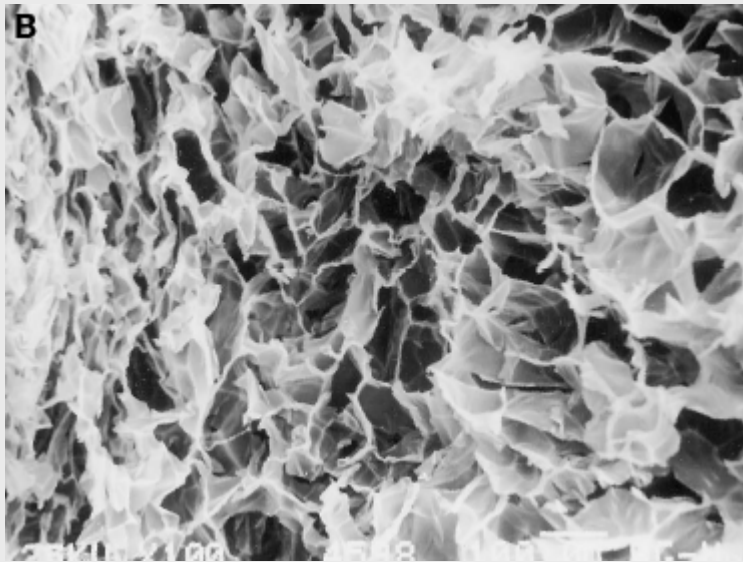
Conclusioni e Prospettive future

- Generazione di un clone stabile staminale e multipotente
- Ulteriore caratterizzazione:
 - Cariotipo
 - Lunghezza dei telomeri
 - Attività telomerasica
 - Potenziale tumorigenico

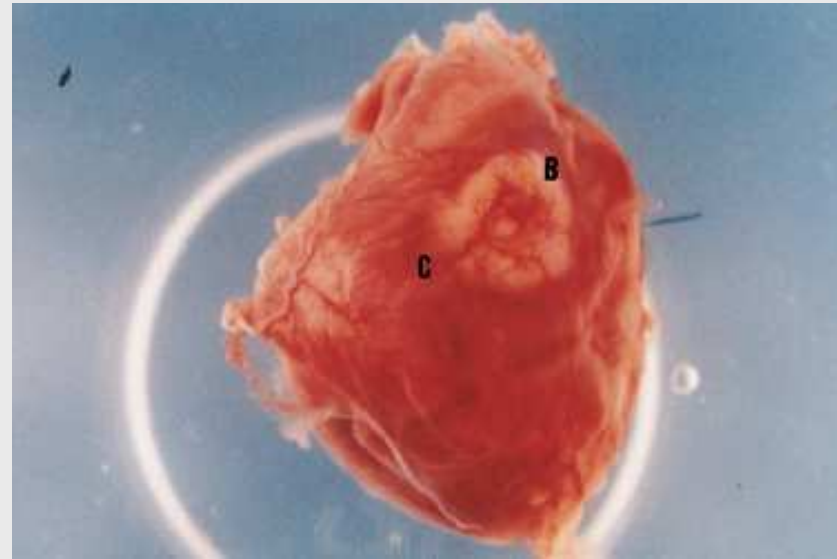
STRATEGIA

- Fornire il microambiente (tridimensionale) appropriato che dia segnali per i passaggi successivi (differenziamento voluto)
- nicchia come microambiente
- Interazioni cosiddette “ecologiche” sono centrali alla biologia della cellula staminale

Ingegneria tissutale è il futuro



Matrice 3D di biopolimeri biodegradabili
(alginato, derivati di acido poli-lattico e
poli-glicolico)



Trapianto di tessuto bioingegnerizzato

Leor et al., Circulation, 2000

Plasticità delle cellule staminali

- capacità di una cellula staminale tessuto-specifica di dare origine a cellule di linee eterologhe superando i confini linea-specifici.
- Questa proprietà si chiama anche

TRANSDIFFERENZIAMENTO
(fine anni '90)

Plasticità delle cellule staminali

Sorgente cellula donatrice	Tessuto bersaglio	Referenze
Midollo osseo	Muscolo scheletrico Muscolo cardiaco Fegato Cellule endoteliali Cervello	Ferrari et al., 1998 Bittner et al., 1999 Petersen et al., 1999 Shi et al., 1998 Mezey et al., Brazelton et al., 2000.
Muscolo scheletrico	Midollo osseo	Jackson et al., 1999
Cellula nervosa staminale	Sangue Muscolo scheletrico Tessuti embrionali	Bjornson et al., 1999 Galli et al., 2000 Clarke et al., 2000
Cellula emopoietica staminale/arricchita	Muscolo scheletrico Muscolo cardiaco Cellule endoteliali Epatociti Tessuti embrionali	Gussoni et al., 1999 Orlic et al., 2001 Jackson et al., 2001 Lagasse et al., 2000 Krause et al., 2001

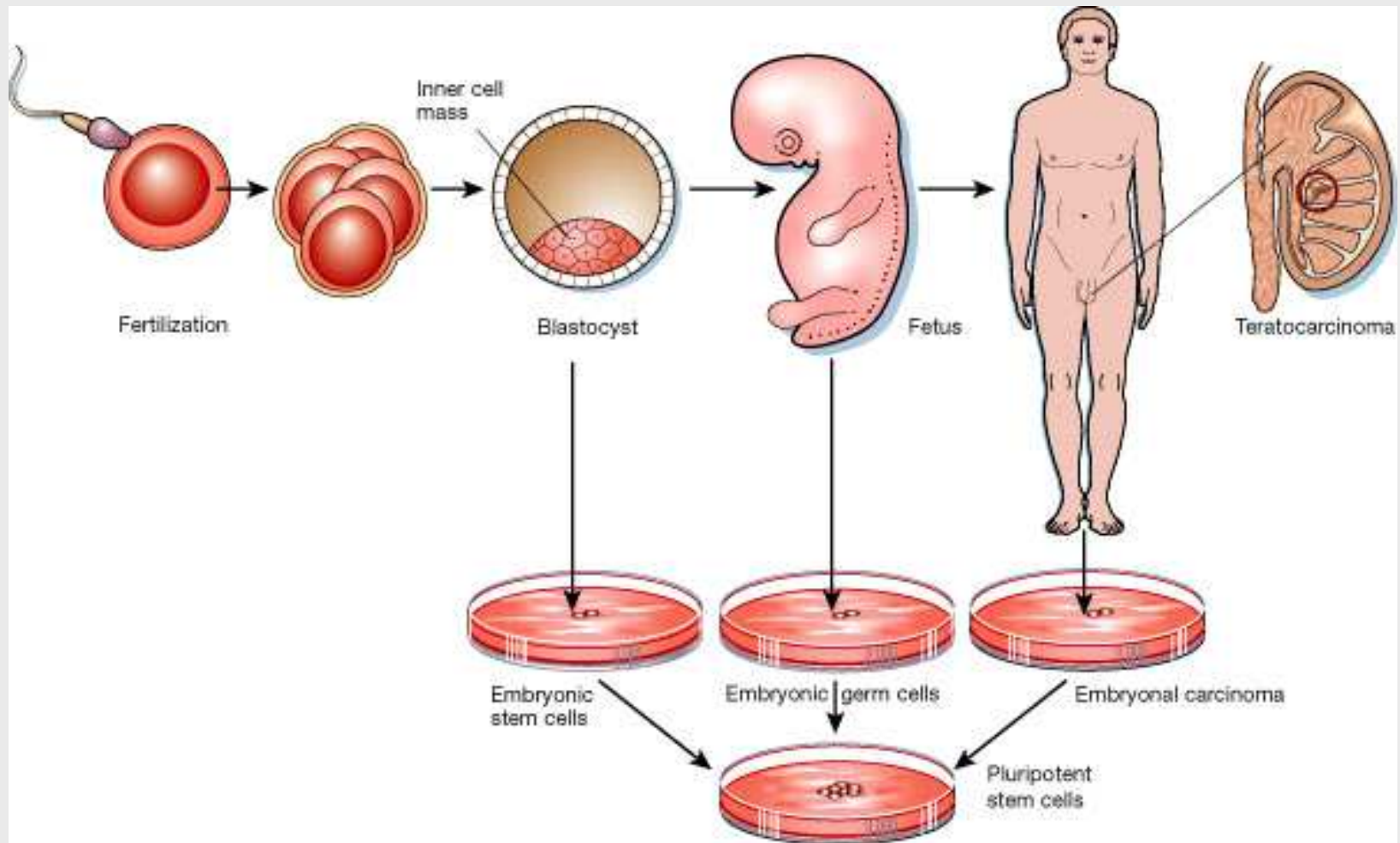
Differenze tra cellule staminali embrionali e adulte

- Pros per le adulte
- Identita' genica, quando possibile
- Le cellule staminali embrionali di topo talvolta danno teratocarcinomi in topi istocompatibili
- Le cellule staminali embrionali umane proliferano meno e si differenziano di piu' di quelle del topo
- Per essere espanse hanno bisogno di condizioni che sono ancora non controllabili (feeder layer)
- Ragioni etiche

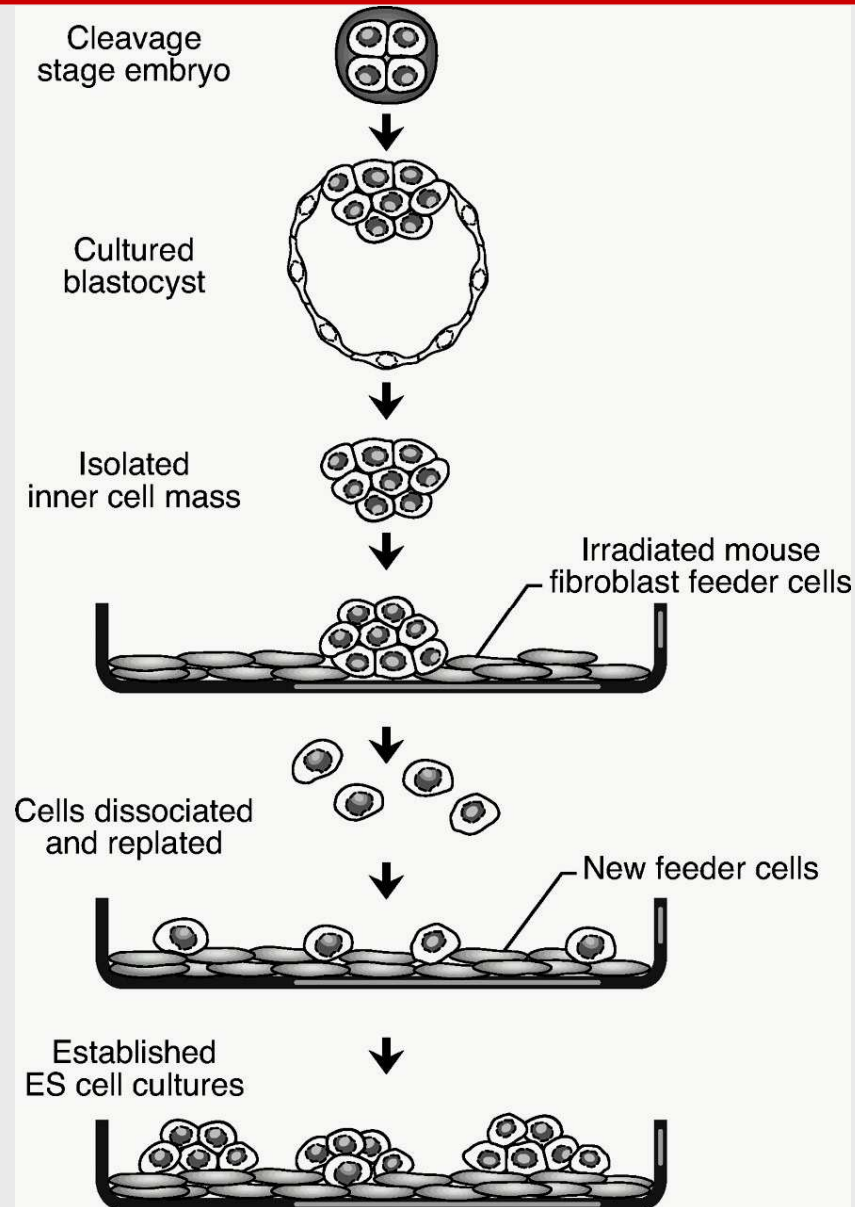
Differenze tra cellule staminali embrionali e adulte

- Pros per le embrionali
- Le adulte sono poche. Oligoclonalita'
- Tipi di cellule differenziate che si possono ottenere dalle adulte: molti ma non tutti e non tutti insieme
- Quantita' di cellule differenziate di ogni tipo che si possono ottenere dalle adulte: poche
- Possibilita' e necessita' di manipolazione (rischiosa) le adulte per ora necessitano di pre-espansione in vitro, marcatura, geni suicidi

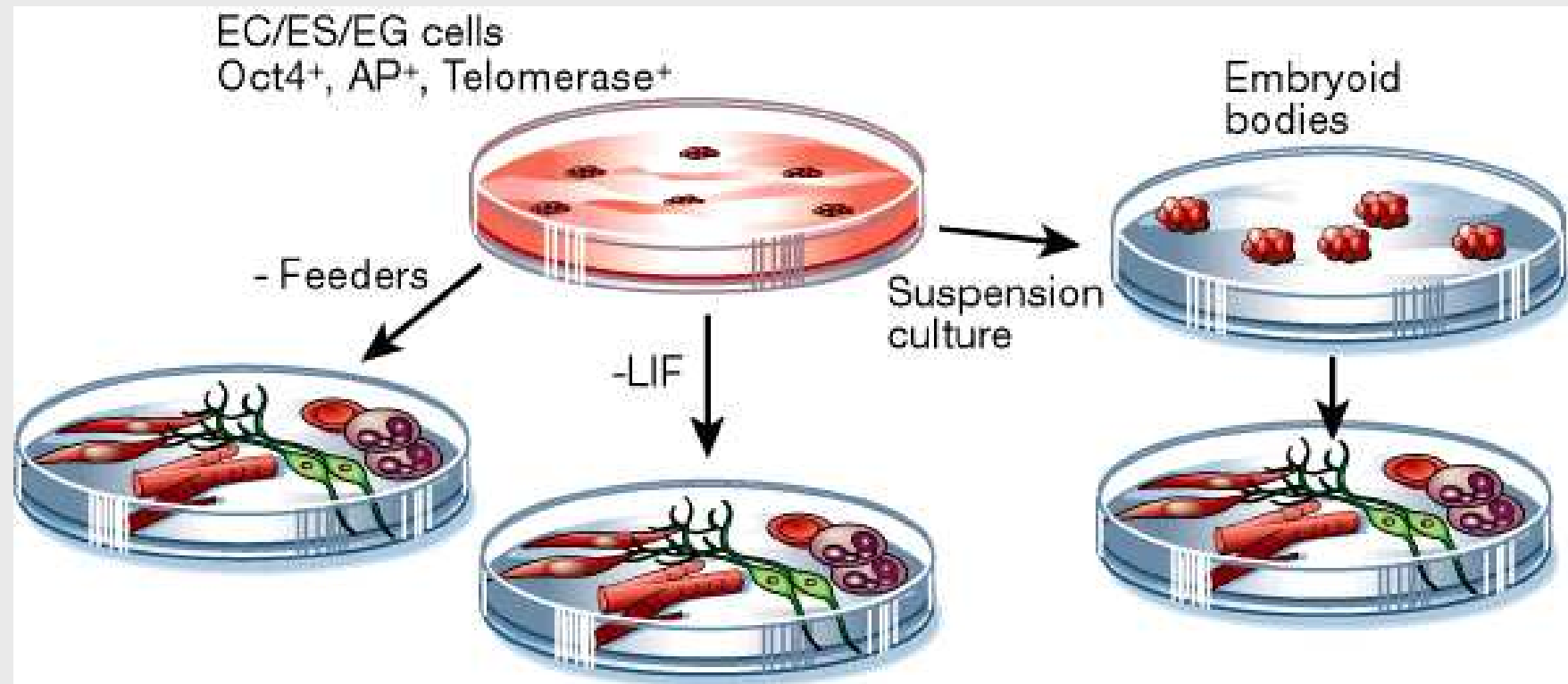
Cellule staminali embrionali



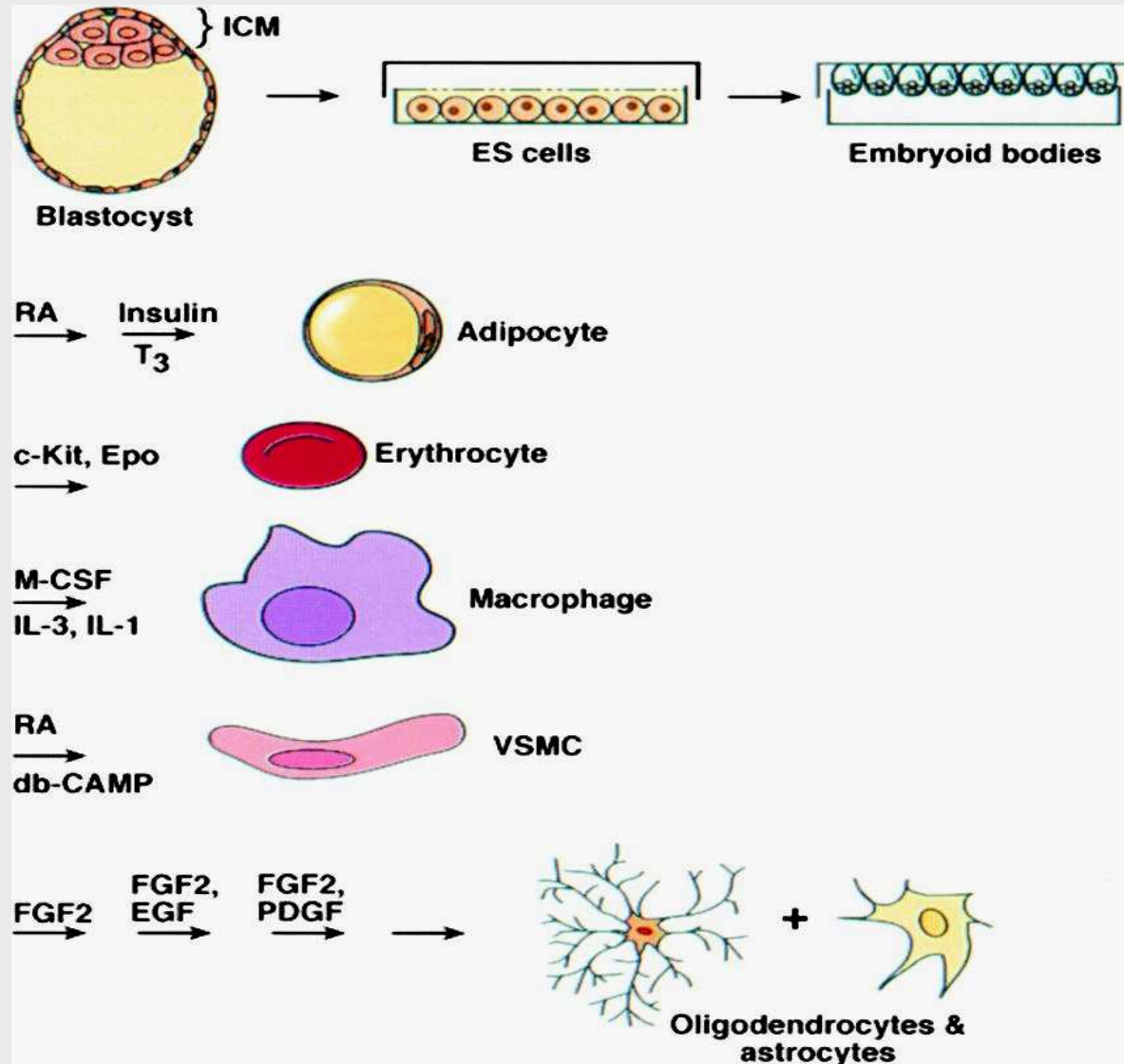
Cellule staminali embrionali



Cellule staminali in vitro



Differenziamento delle cellule staminali



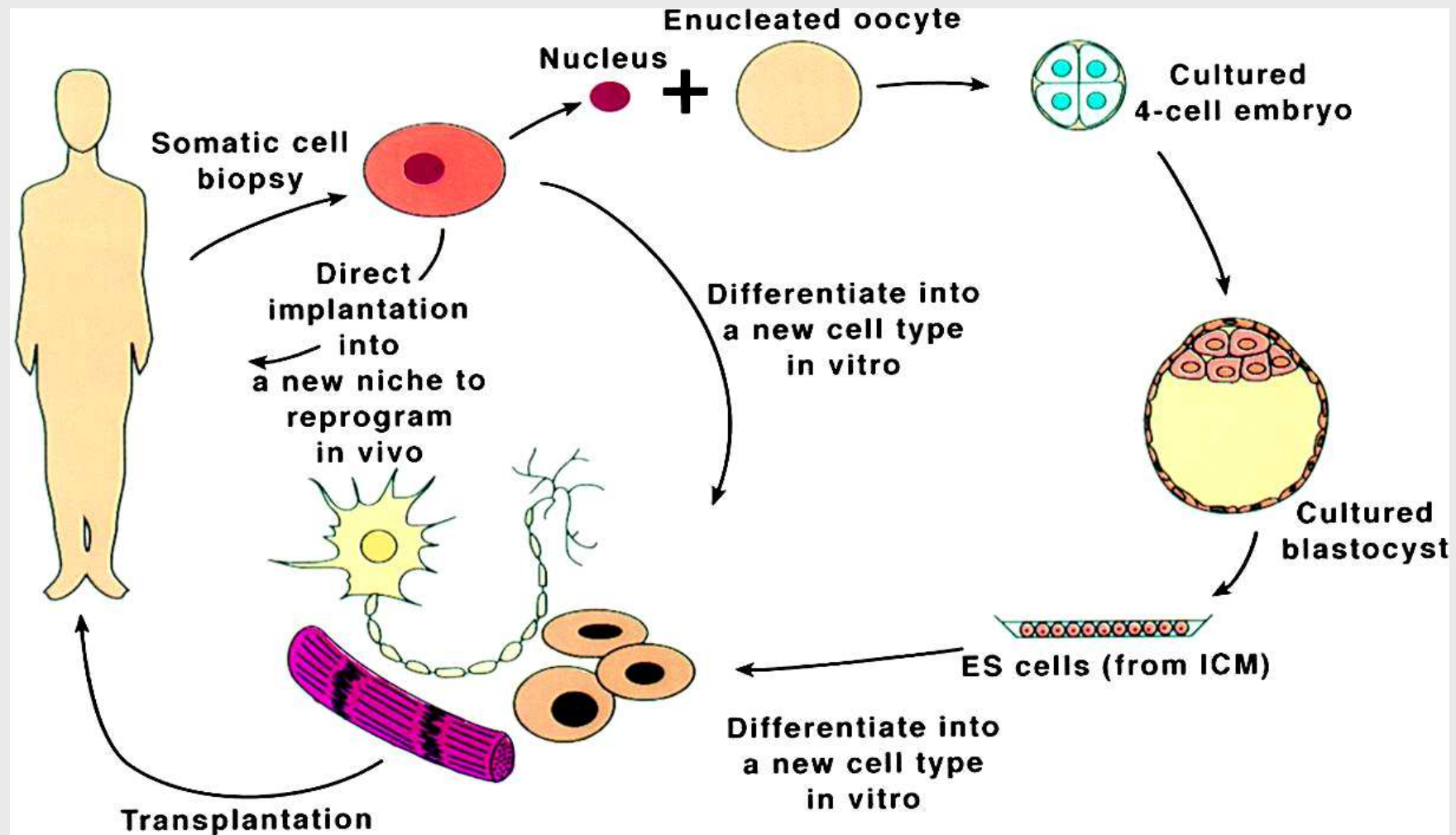
Cellule staminali (problemi)

- Potrebbero diventare tumorali
- Qualora dovessero essere trapiantate, potrebbero essere rigettate, perché non compatibili con il ricevente

Clonazione terapeutica

- procedimento che prevede la generazione di cellule staminali pluripotenti derivate dal paziente, la loro espansione in coltura, differenziazione nell'istotipo necessario e trapianto.
- prevede il trasferimento del nucleo di una cellula somatica matura in un oocita

Terapia con cellule staminali umane



Plasticità delle cellule

- cambio di fenotipo delle cellule differenziate
- rideterminazione del nucleo delle cellule somatiche con cambio di spettro di espressione genica
- Riprogrammazione attraverso **meccanismi epigenetici**

Clonazione terapeutica

Korean Team Speeds Up Creation Of Cloned Human Stem Cells

Nine of the 11 cell lines are derived from people, ranging in age from 10 to 56, who have suffered spinal cord injuries.

another ES cell line, derived from a 6-year-old type 1 diabetes patient,

another one from a patient with hypogammaglobulinemia

Science, 20 may 2005

**Queste ricerche sono state smentite
(Riproduzione partenogenetica)**

Clonazione riproduttiva

Cumulina con la madre nutrice, la pecora Dolly, gatto, cane, ..



Nature, 23 luglio 1998

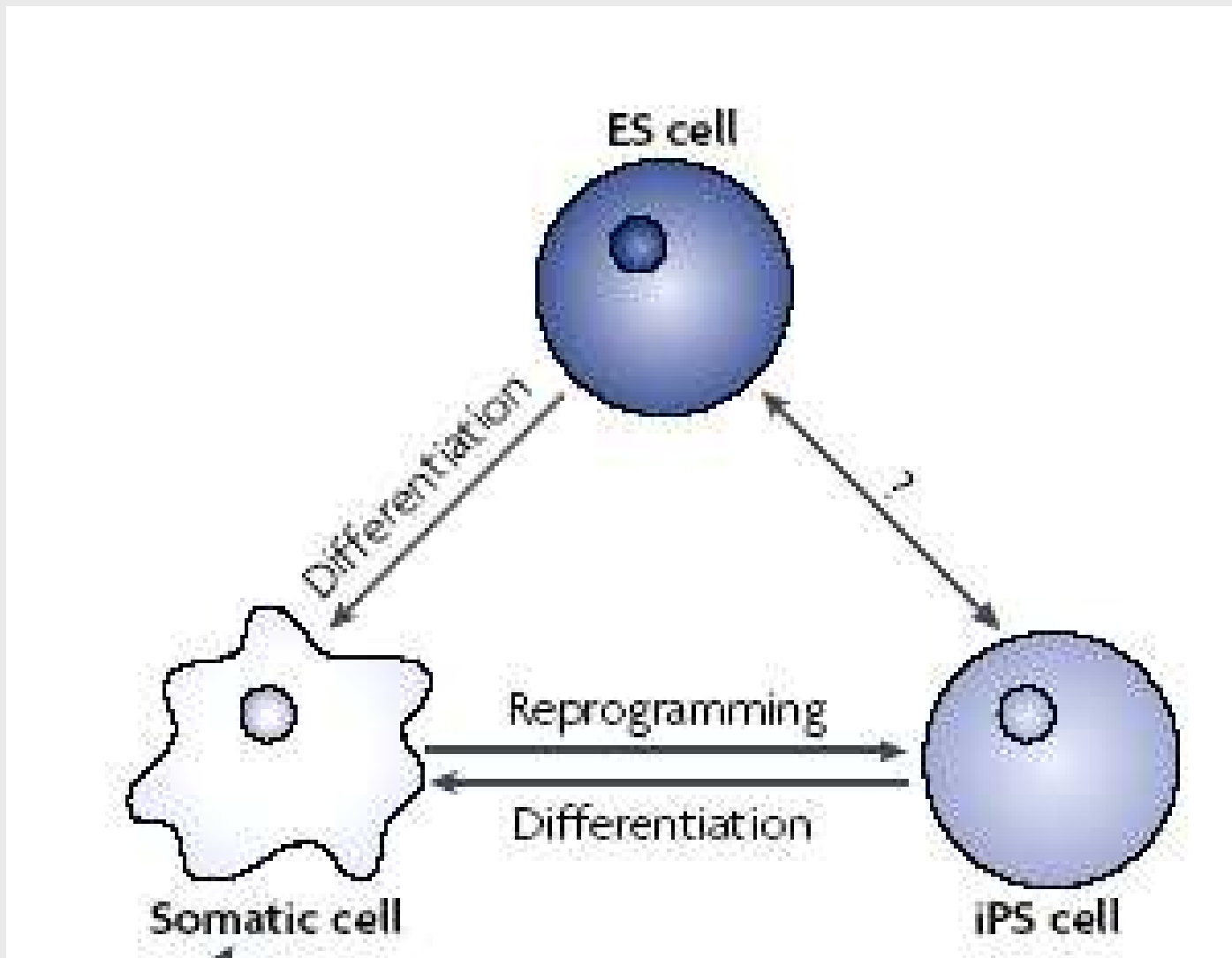
Plasticità delle cellule staminali e non solo staminali

- capacità di una cellula staminale tessuto-specifica di dare origine a cellule di linee eterologhe superando i confini linea-specifici.

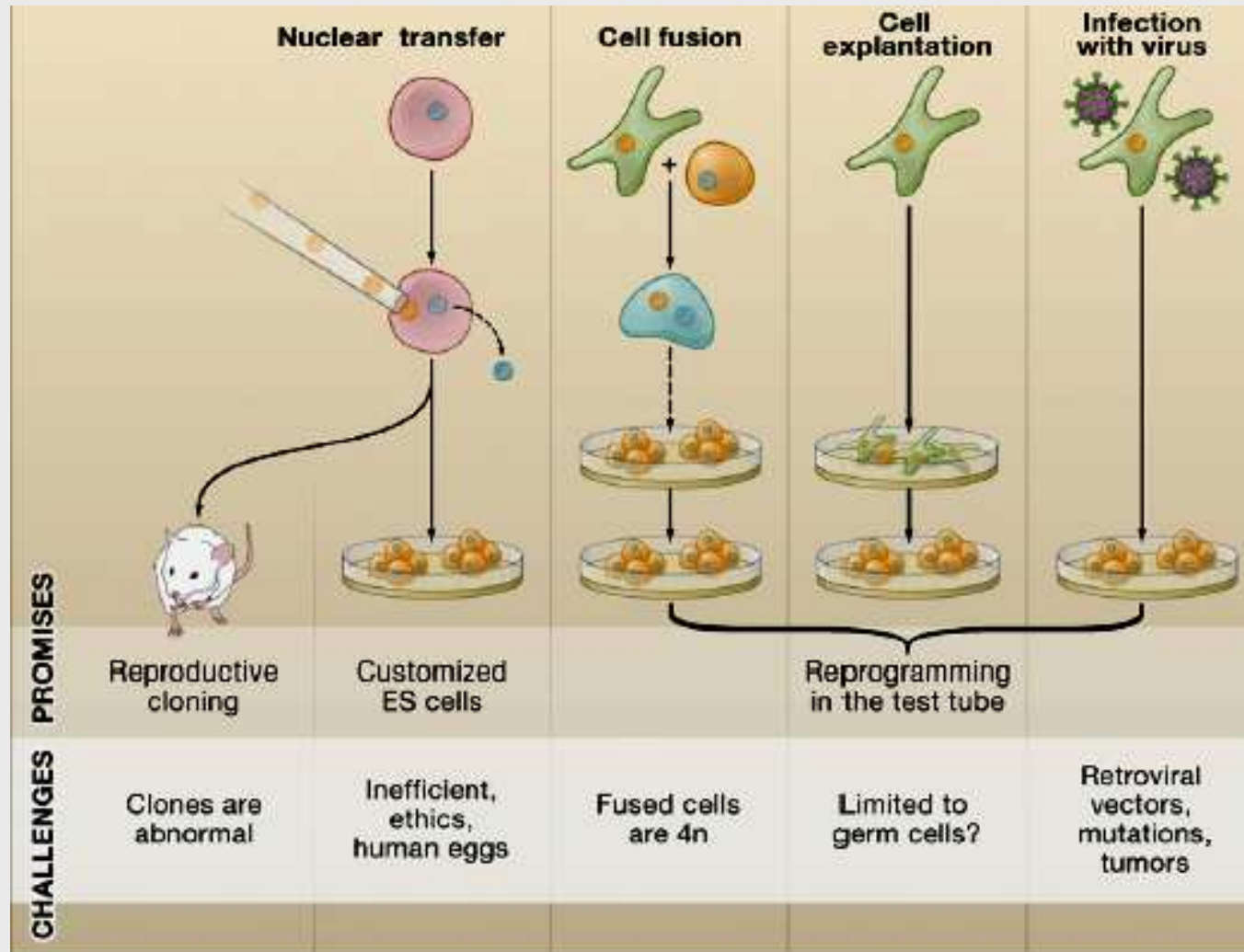
concetto di TRANSDIFFERENZIAMENTO

concetto di RIPROGRAMMAZIONE

Induzione di cellule staminali pluripotenti (iPS)



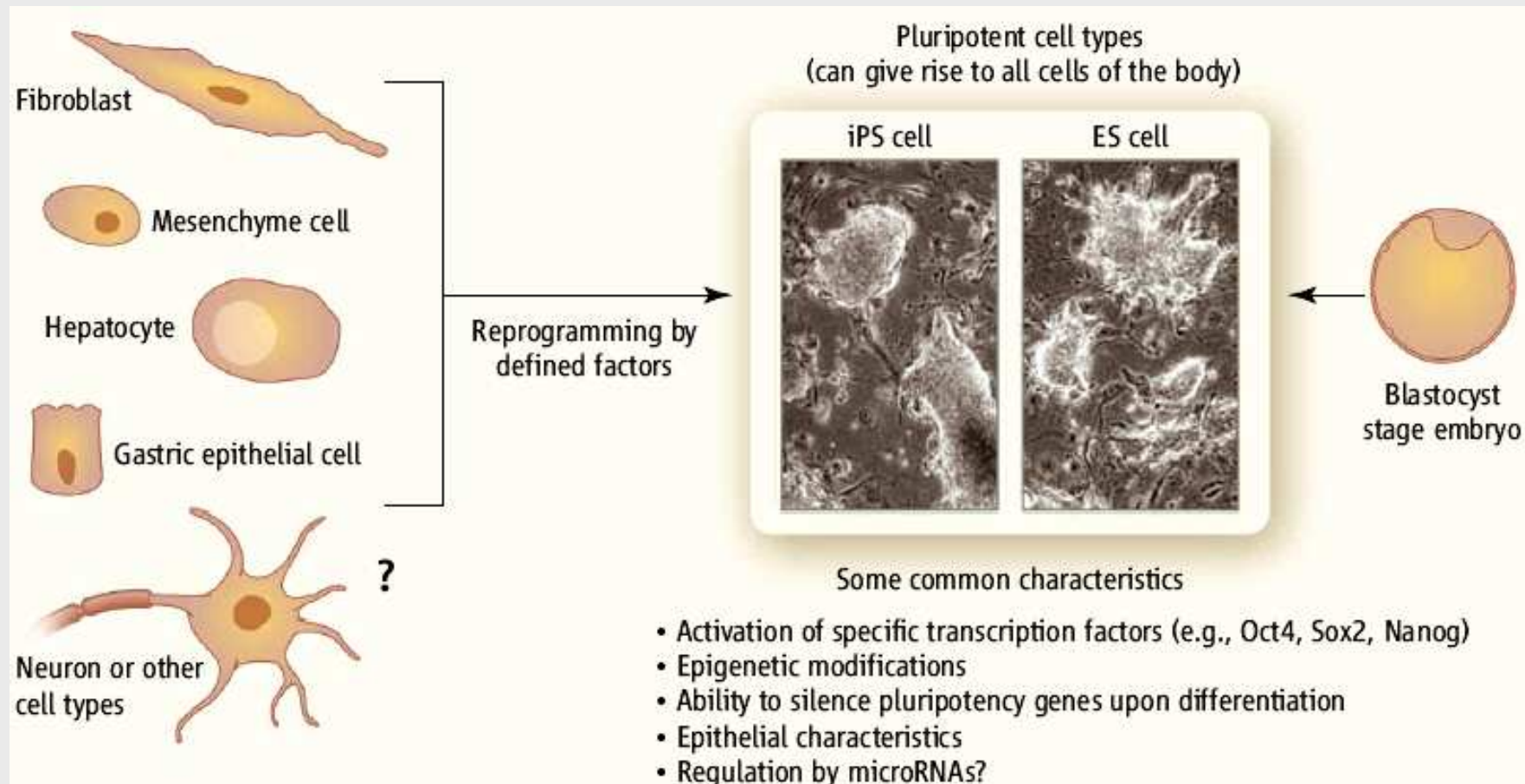
Quattro strategie per riprogrammare le cellule somatiche



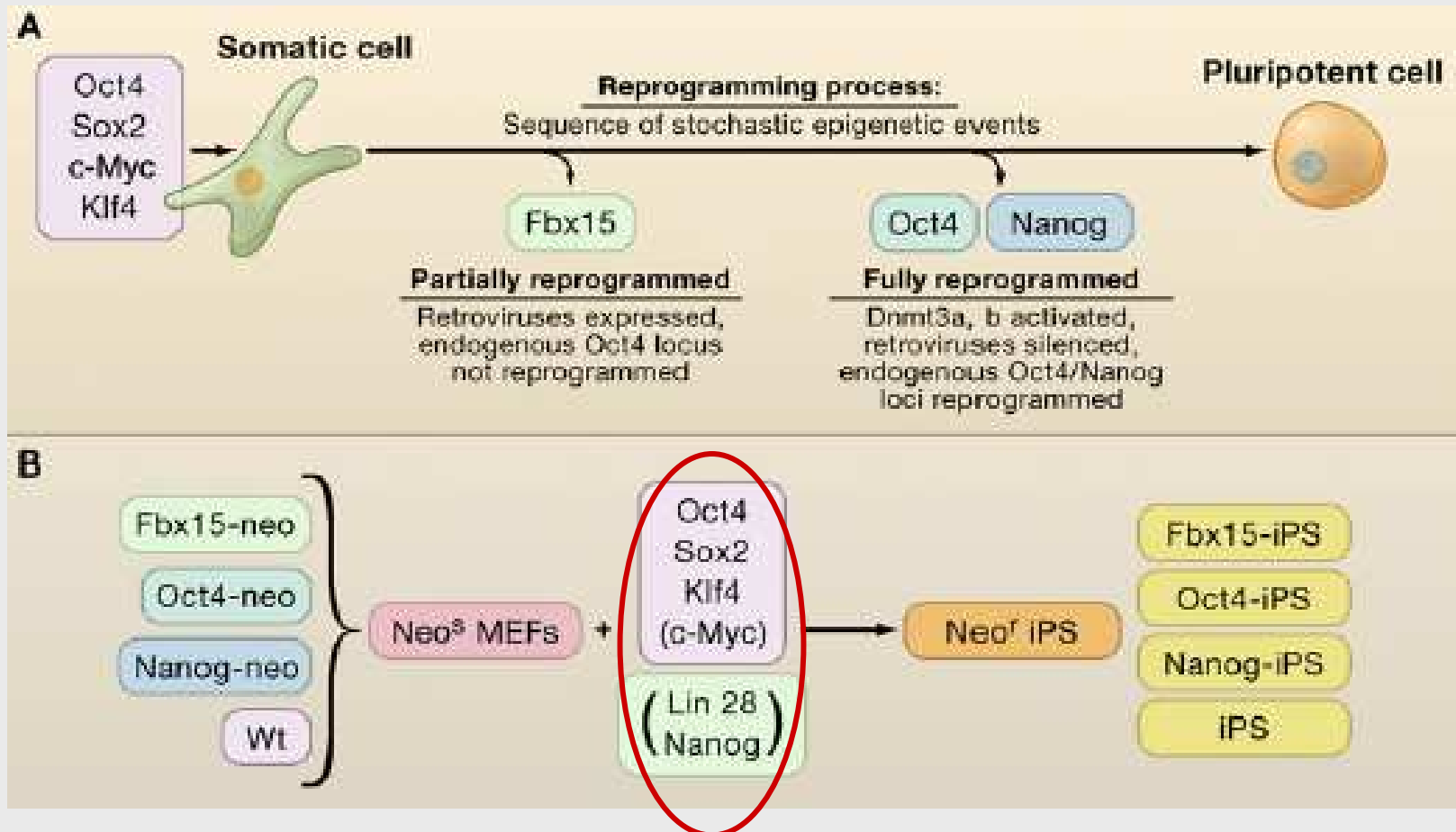
Basi teoriche

- lo sviluppo è condizionato da fattori **epigenetici** più che da eventi genetici → il differenziamento è, in principio, reversibile.
- il trasferimento del nucleo di una cellula somatica nell'oocita permette la riprogrammazione del nucleo somatico a uno stadio non differenziato tramite fattori transattivanti
- → **ricerca di questi fattori**

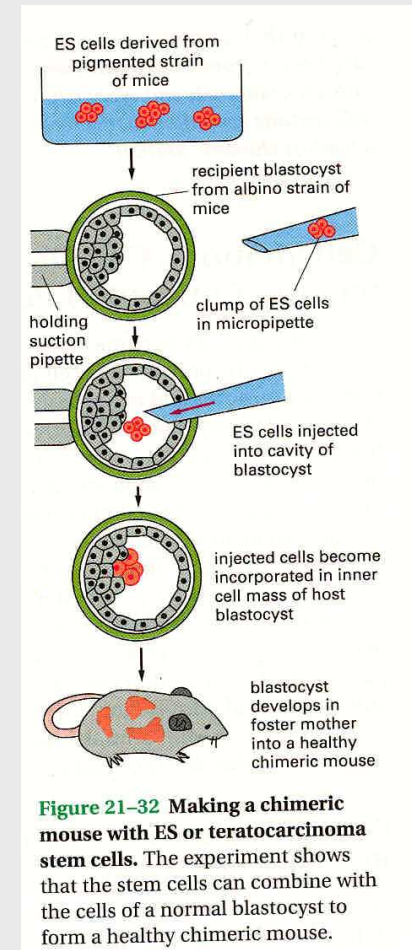
Induced-Pluripotent Stem Cells (iPSC)



Riprogrammazione di cellule somatiche a uno stato pluripotente (2-4 fattori necessari e sufficienti)



- Cellule iPS di topo dimostrate essere funzionalmente equivalenti a cellule ES di topo
- Esprimono marcatori ES-specifici, hanno profili di espressione genica simili
- formano teratomi in topi immunoincompetenti
- Contribuiscono a formare tutti i tipi cellulari degli animali chimerici



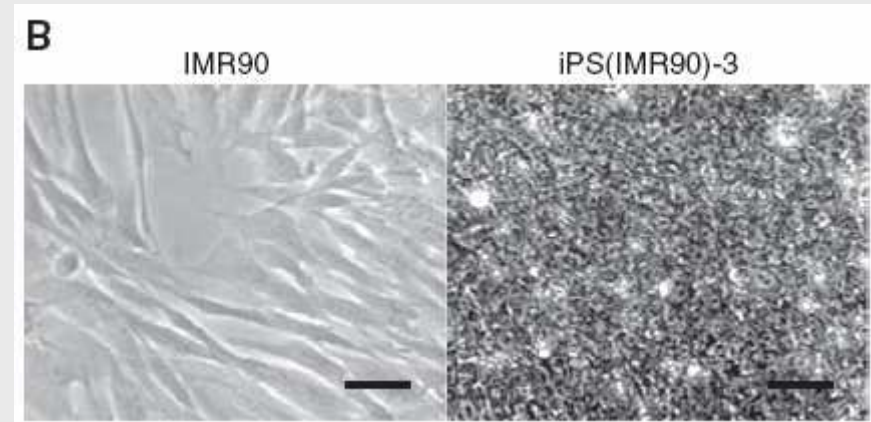
iPSC umane

- Oct4, Sox2, c-myc & Klf4 sono sufficienti per reprogrammare fibroblasti di **topo** a cellule staminali pluripotenti indifferenziate
→ **induced pluripotent stem (iPS) cells**
- c-myc provoca morte e differenziamento di cellule ES umane
- **OCT4, SOX2, NANOG & LIN28** sono sufficienti per riprogrammare cellule somatiche umane (evento raro 1:5000).

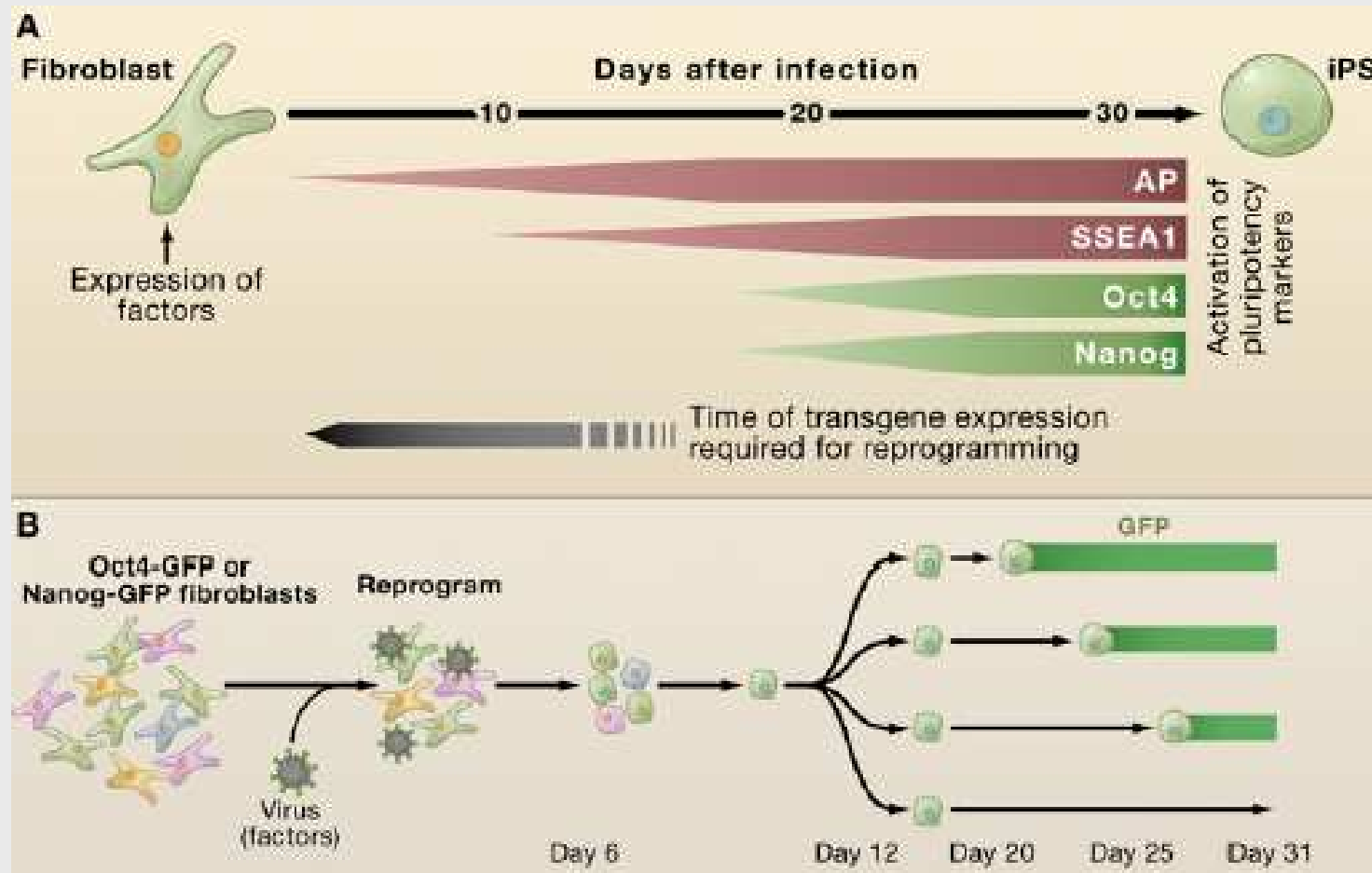
- Si possono derivare linee cellulari di iPS senza ricorrere a selezione con antibiotici (selezione su base di criteri morfologici).
- La riprogrammazione è un processo lento e graduale
- Si possono generare topi chimerici
- La riprogrammazione *in vitro* di fibroblasti avviene abbastanza frequentemente da poter esser rilevabile in coltura
- È stabile anche senza pressione selettiva

iPSC umane

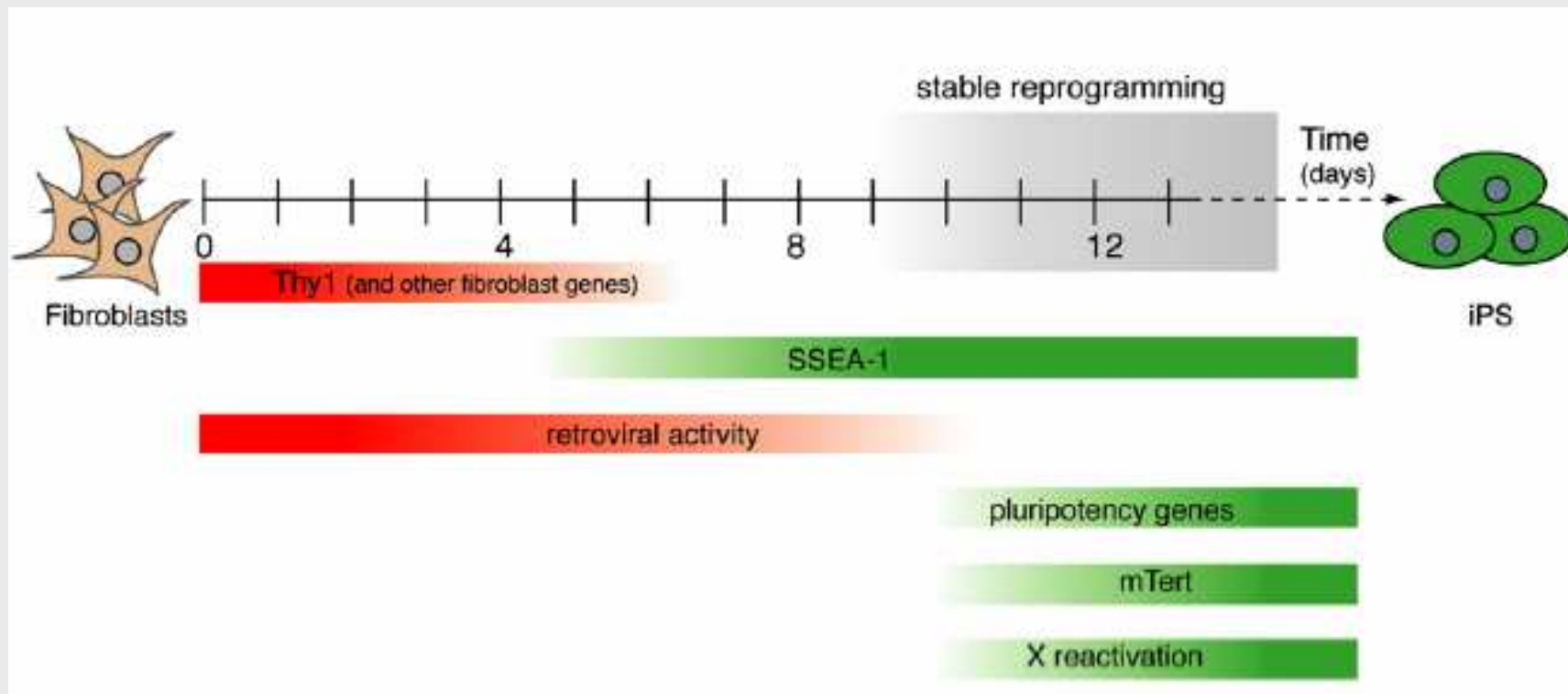
- morfologia tipica delle cellule ES umane
- cariotipo normale
telomerase activity
- antigeni di superficie ES cellula-specifici (SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81)
- formano corpi embrioidi e teratomi



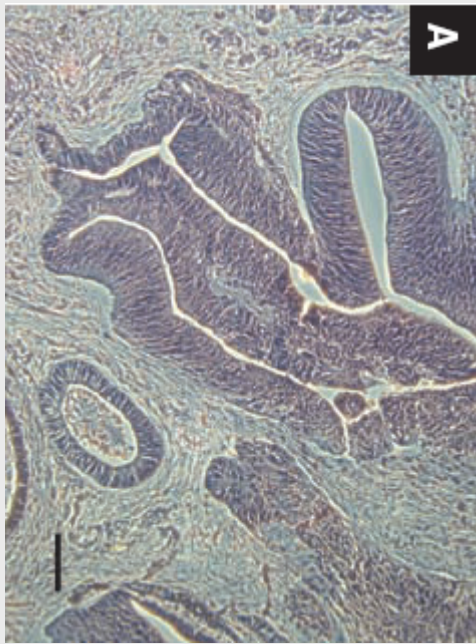
Riprogrammazione: eventi epigenetici stocastici e di espressione genica sequenziale



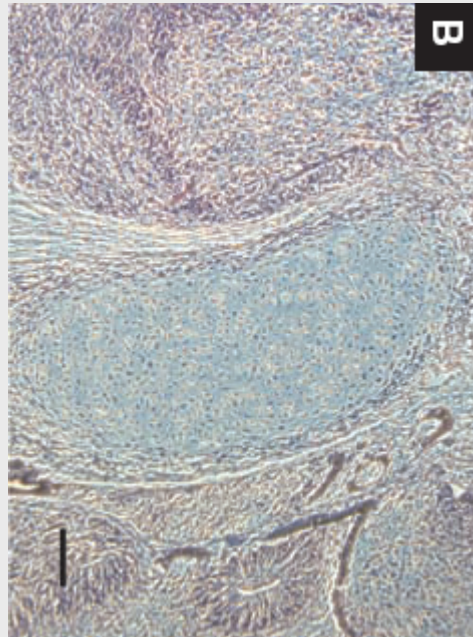
Cinetica di espressione di marcatori durante la riprogrammazione



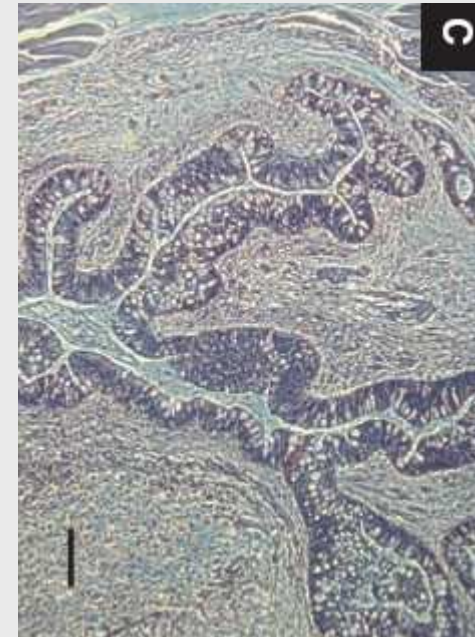
Pluripotenza delle cellule iPS umane (IMR90)



neural tissue



cartilage



gut epithelium

Conclusioni

- Queste cellule iPS umane rispondono ai criteri originariamente proposti per definire cellule ES umane, **tranne che per il fatto che le iPS non derivano da embrioni**
- Si possono usare per studiare lo sviluppo e le funzione dei tessuti umani, per scoprire e testare nuovi farmaci per la medicina da trapianto (→ iPSC paziente-specifiche)
- È necessario lavorare ancora per capire bene come operano i vettori

PLASTICITA' DELLE CELLULE STAMINALI

