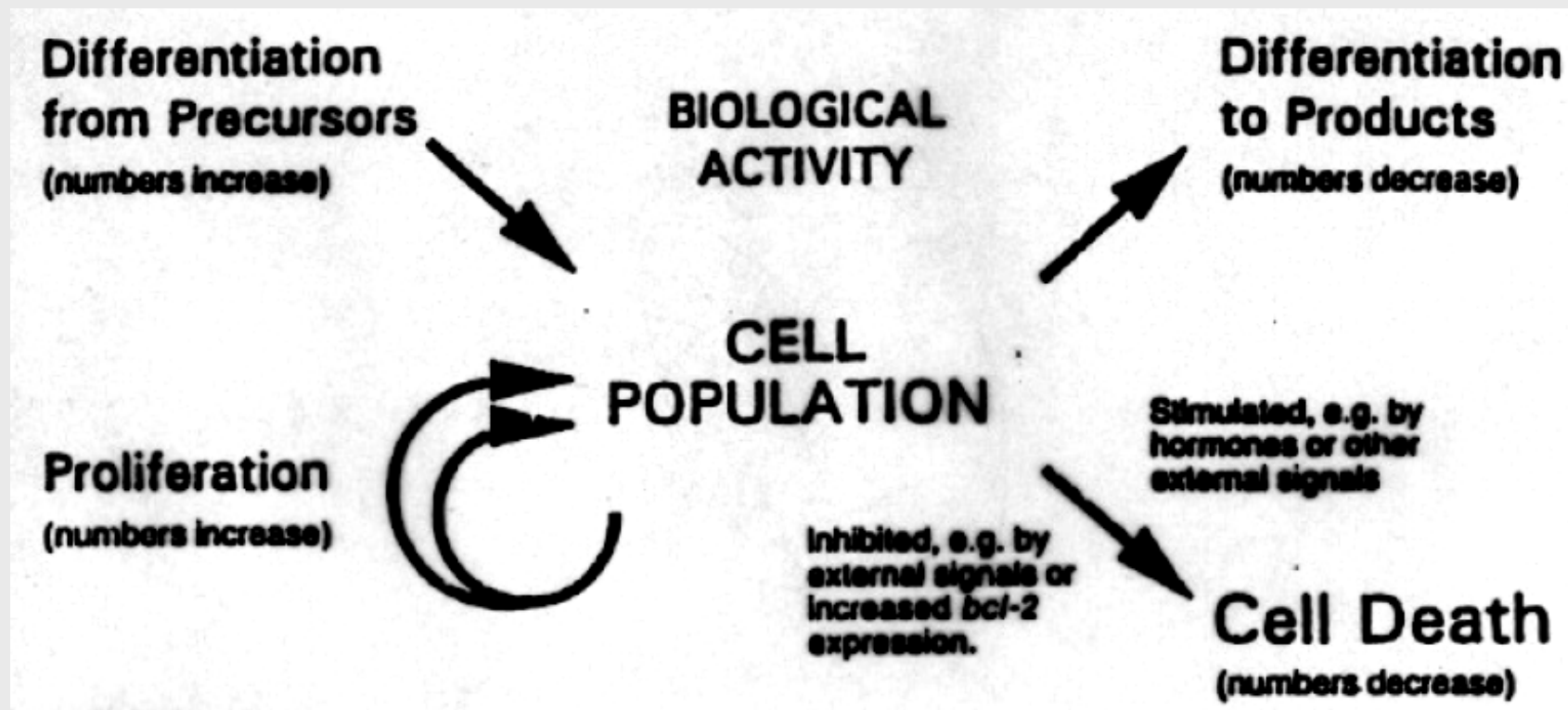
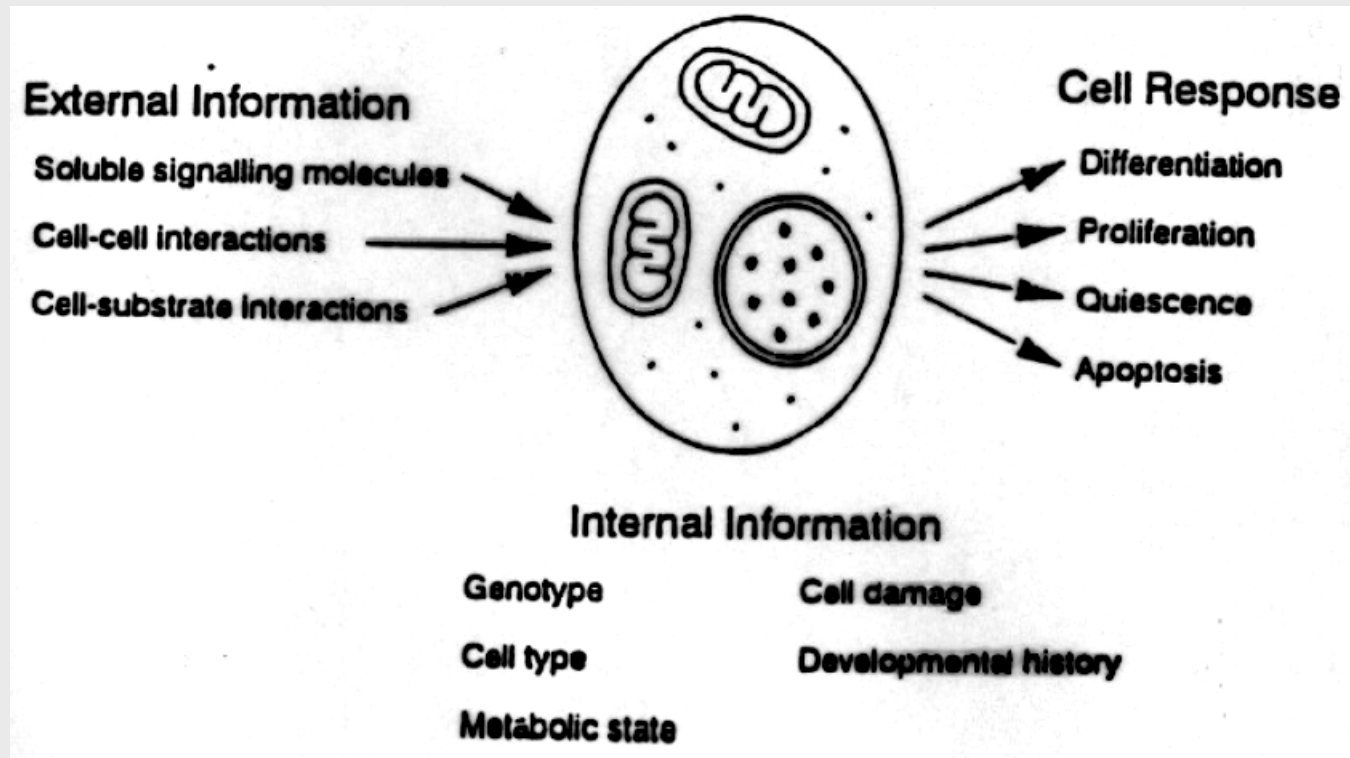


Omeostasi dell'organismo

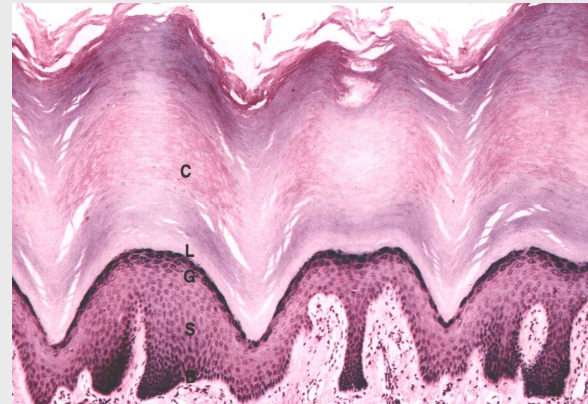
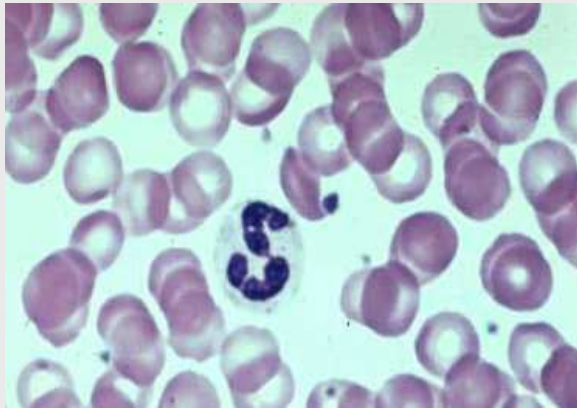


Le risposte della cellula a stimoli esterni dipendono anche dalla sua storia

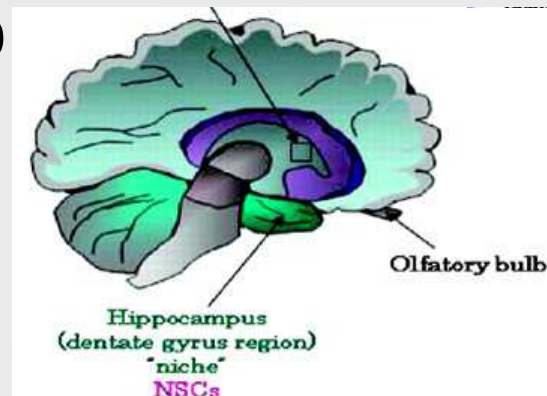


Omeostasi dei tessuti

- Tessuti **dinamici**: con notevole ricambio cellulare: sangue, epiteli



- Tessuti **statici**: sistema nervoso, muscolo cardiaco

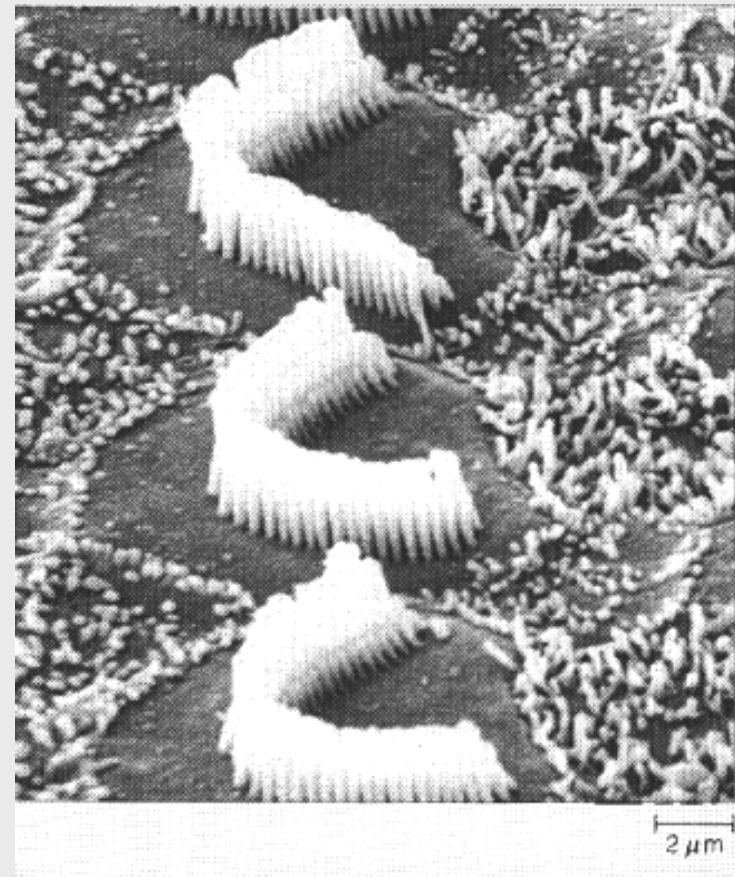
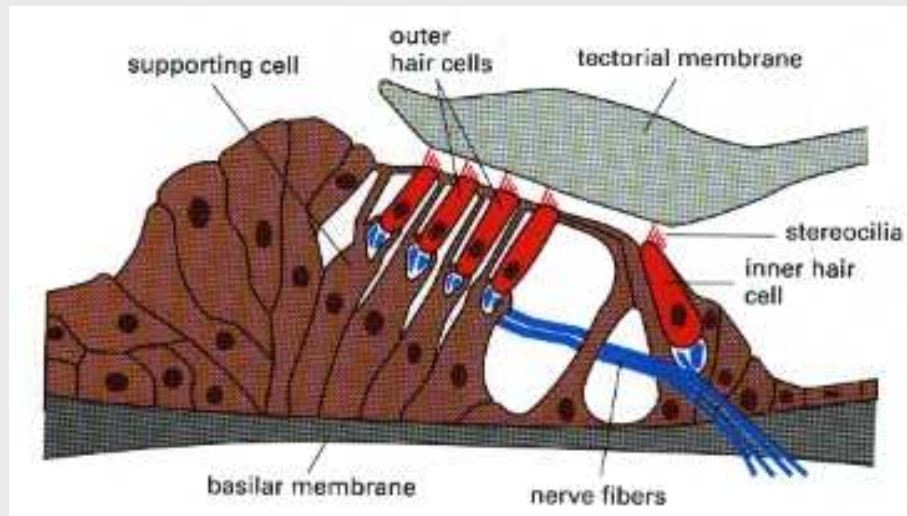


Cellule/tessuti hanno diverso potenziale proliferativo (cellula staminale)

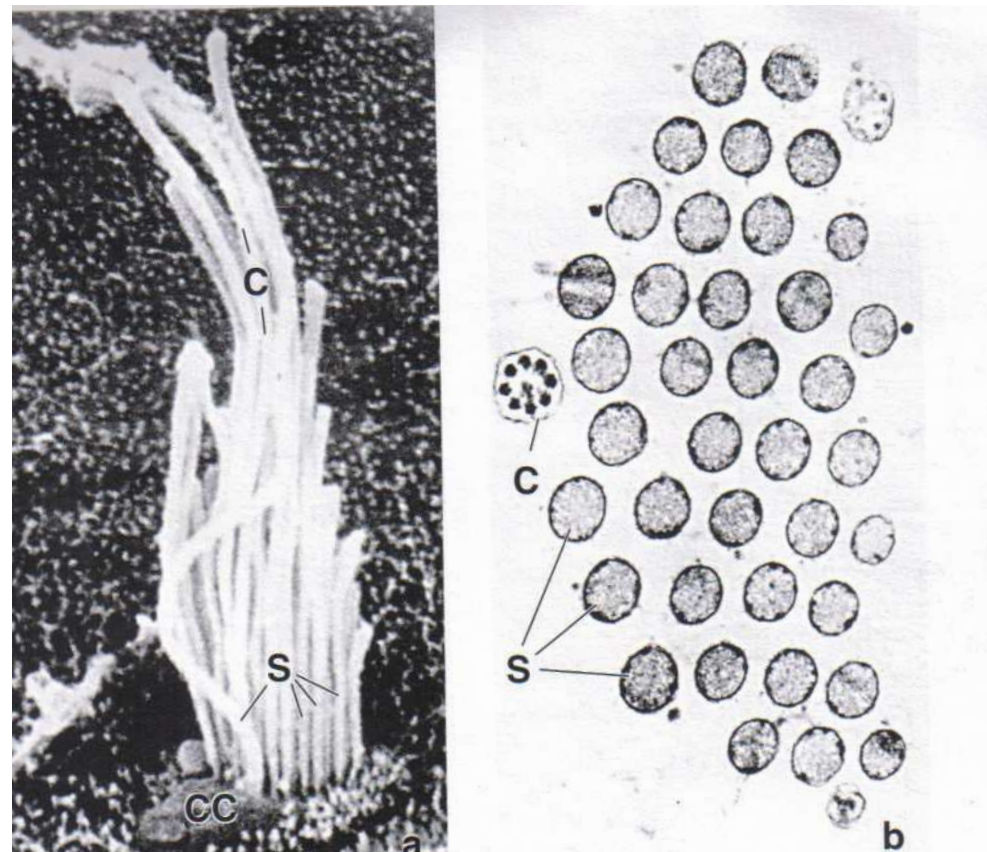
- Riparazione delle ferite (fratture ossee, ferite cutanee)
- Una volta i tessuti venivano suddivisi in
 - Tessuti “**labili**”: ex: sangue, epiteli
 - tessuti “**perenni**”: ex: SNC
 - tessuti “**stabili**”: ex: muscolo scheletrico, parenchima epatico

MA CI SONO ECCEZIONI!!!

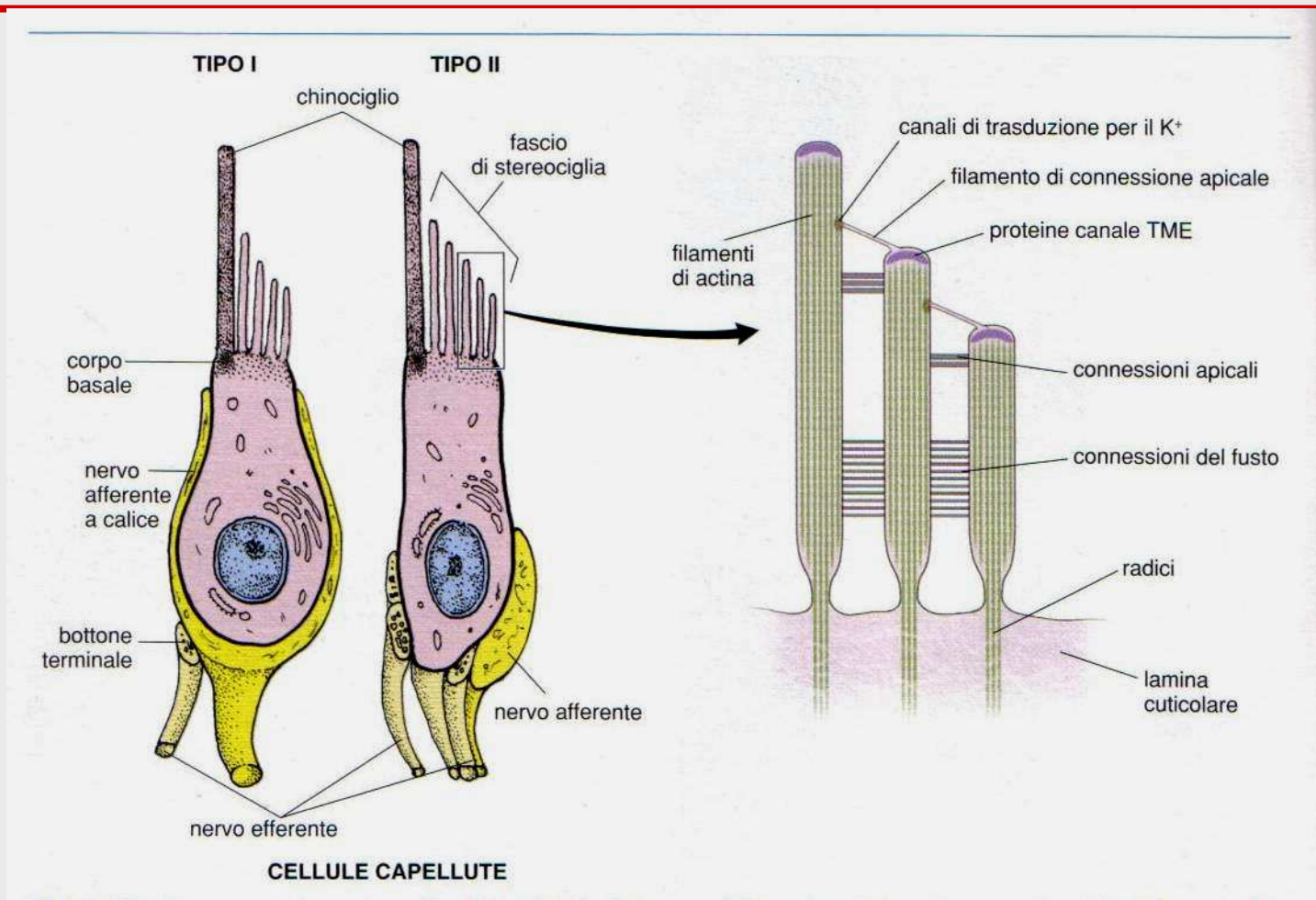
Le cellule capellute dell'orecchio (**benchè epiteliali**) non sono soggette a ricambio



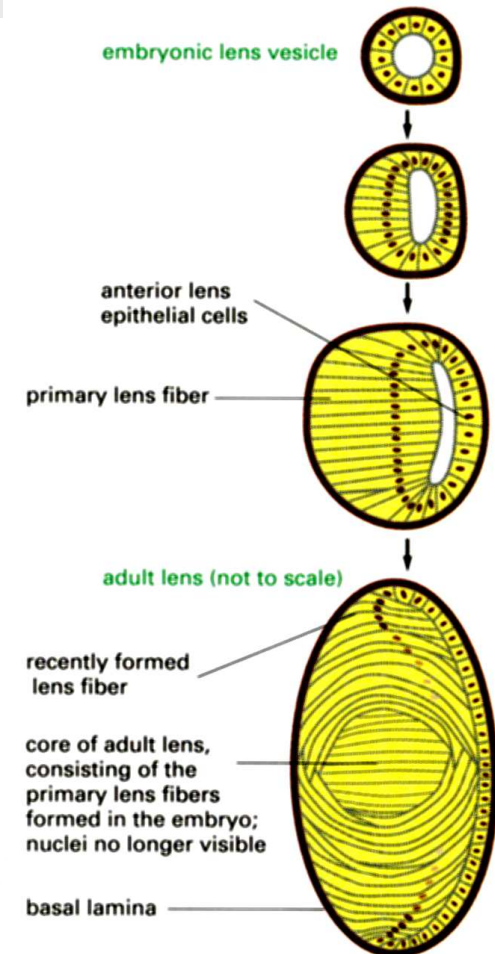
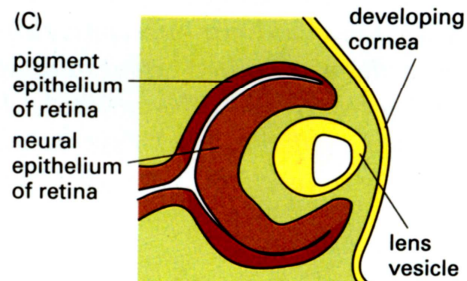
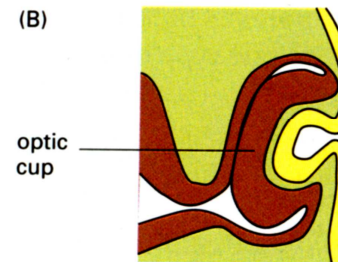
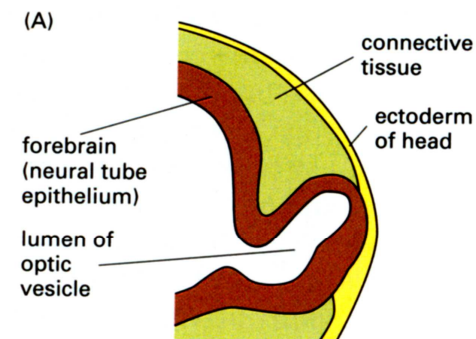
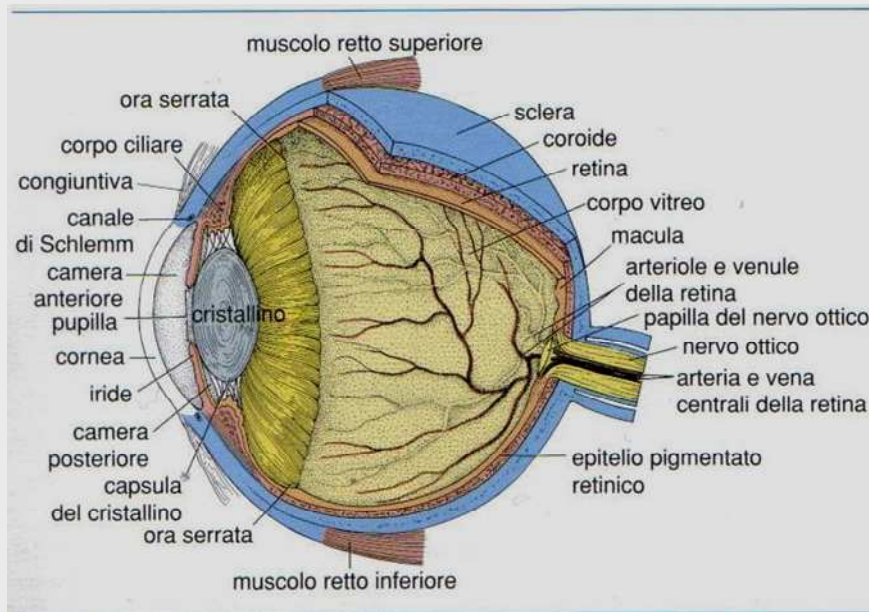
Ciglia delle cellule capellute dell'orecchio



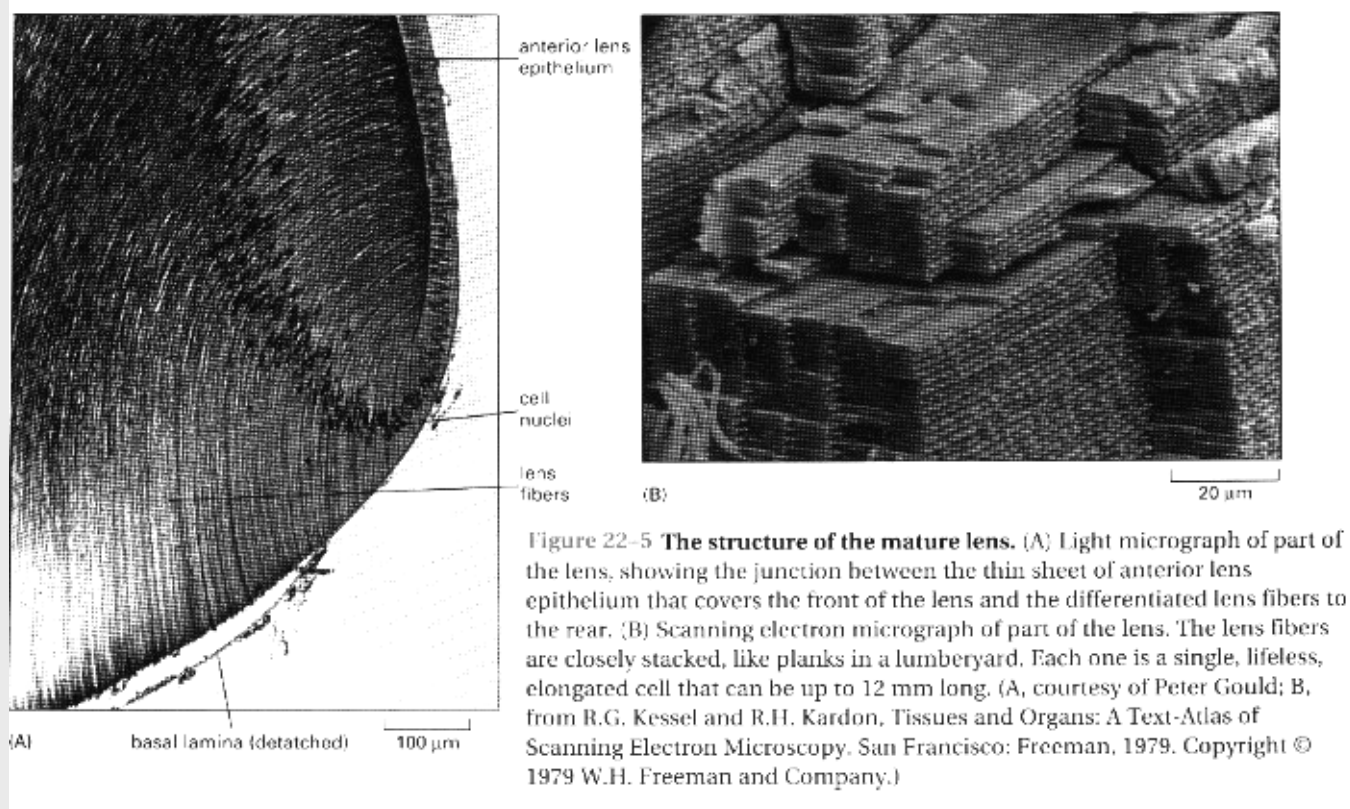
Ciglia delle cellule capellute dell'orecchio

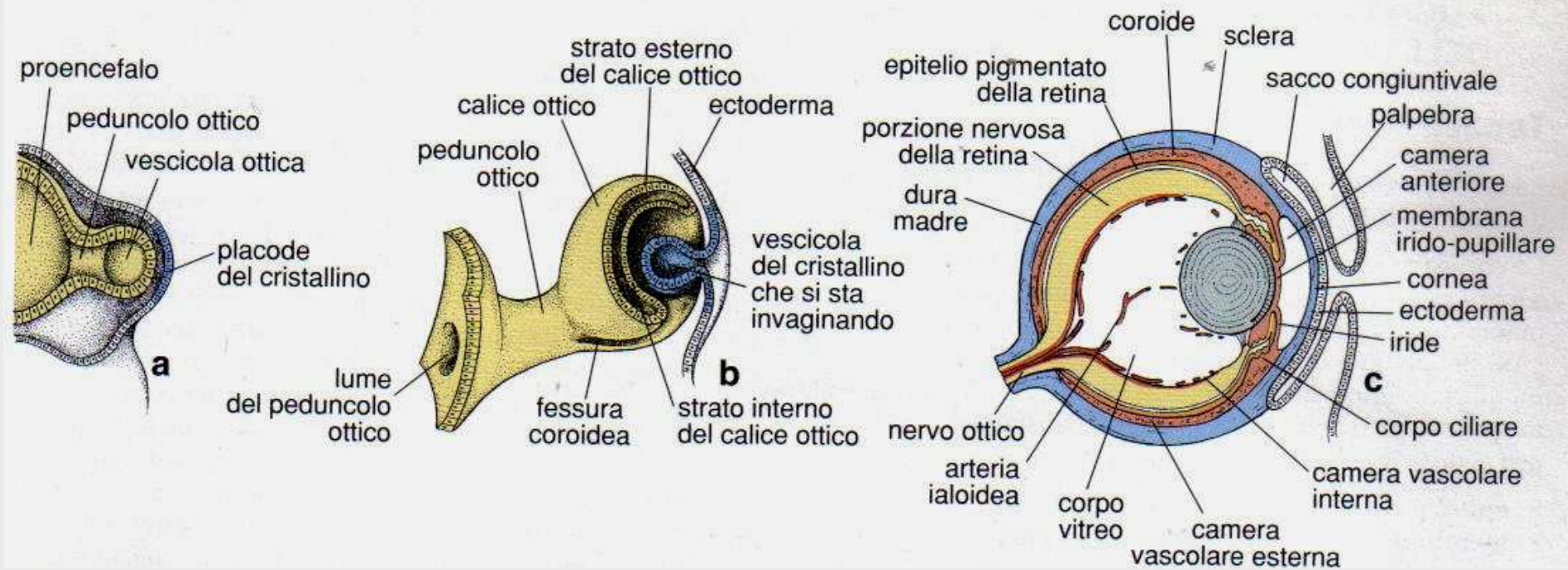


Il cristallino e sua formazione

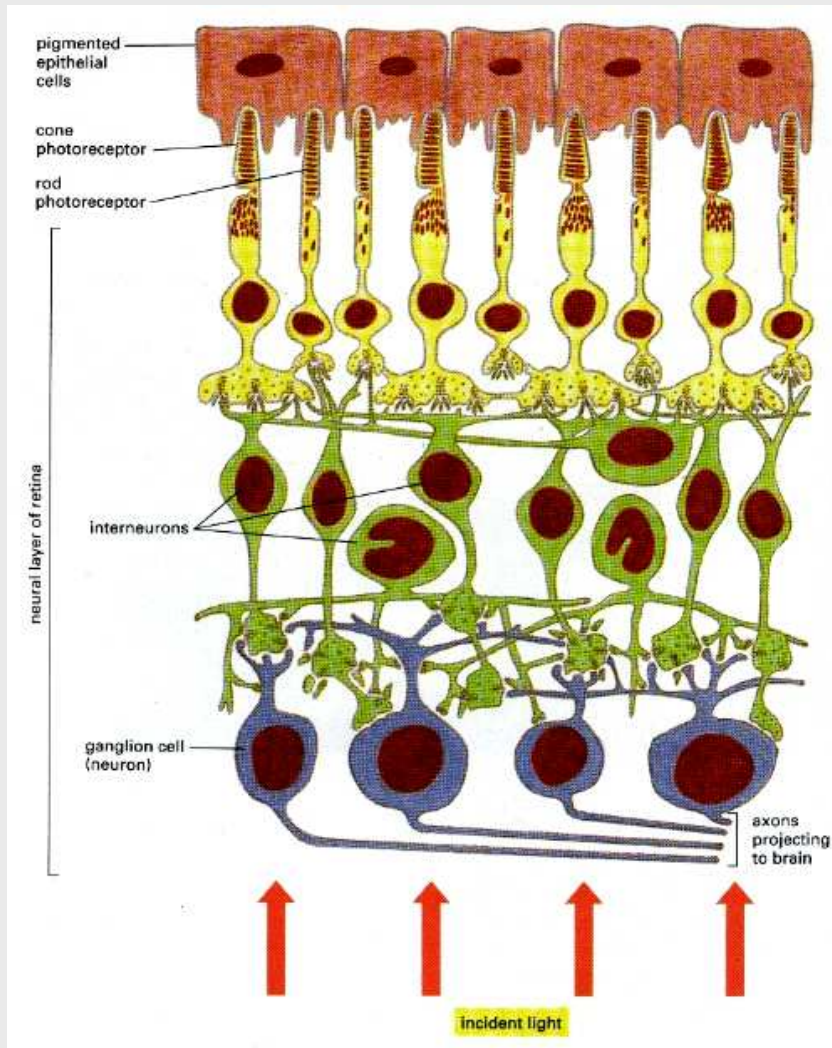


Il cristallino: le fibre sono strutture perenni





Struttura della retina



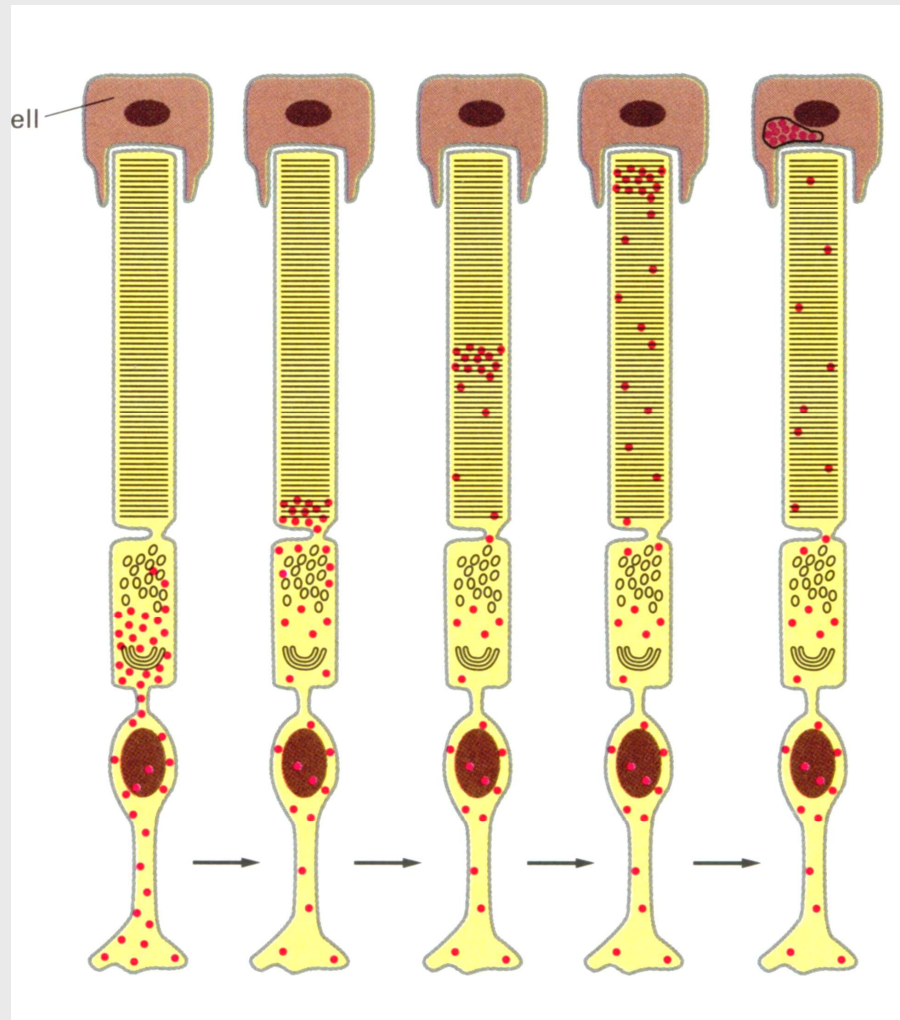
Cellule epiteliali pigmentate

Coni e bastoncelli

Interneuroni

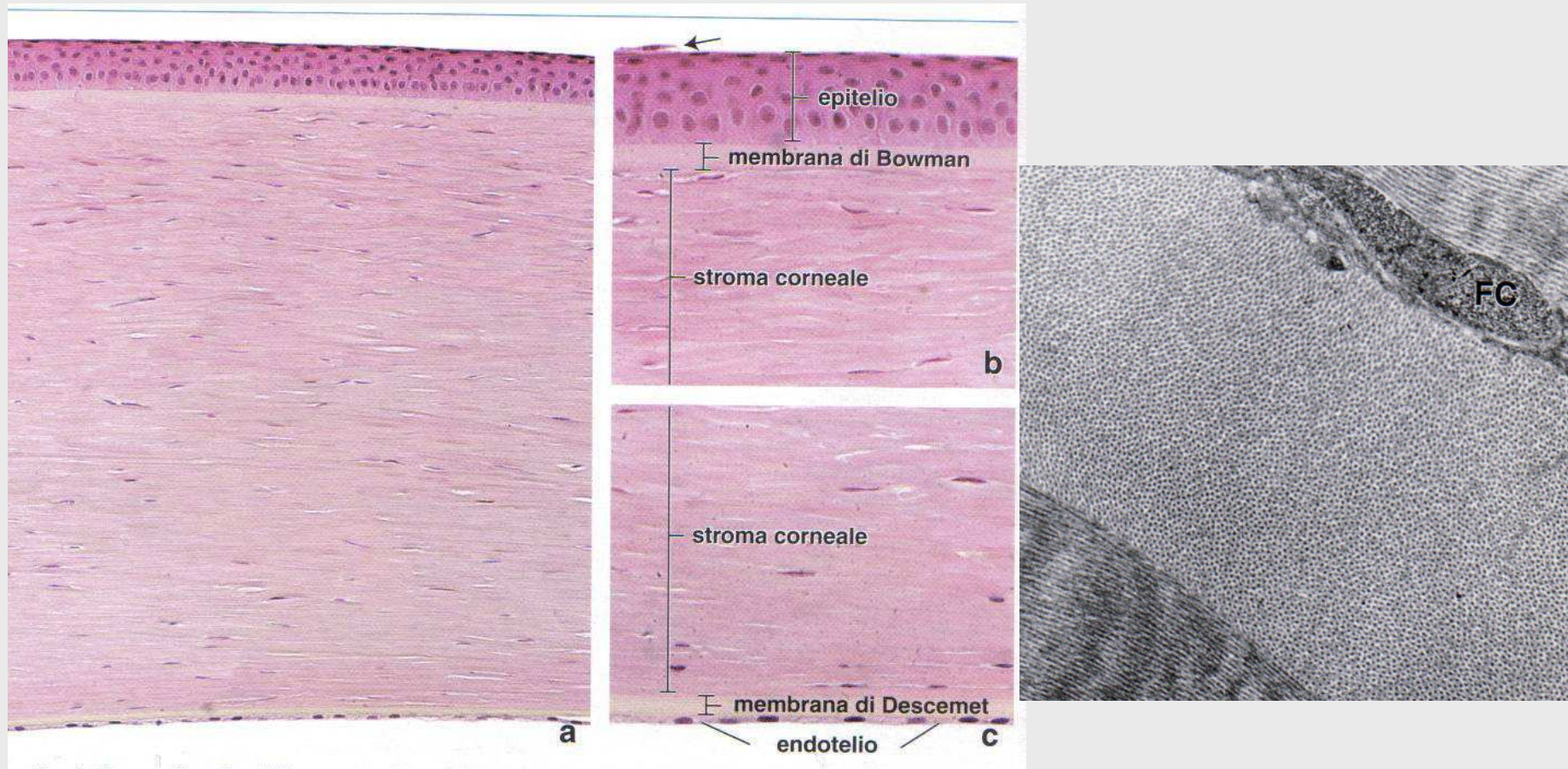
Cellule gangliari (neuroni)

Metabolismo nei bastoncelli della retina (cellule post-mitotiche)

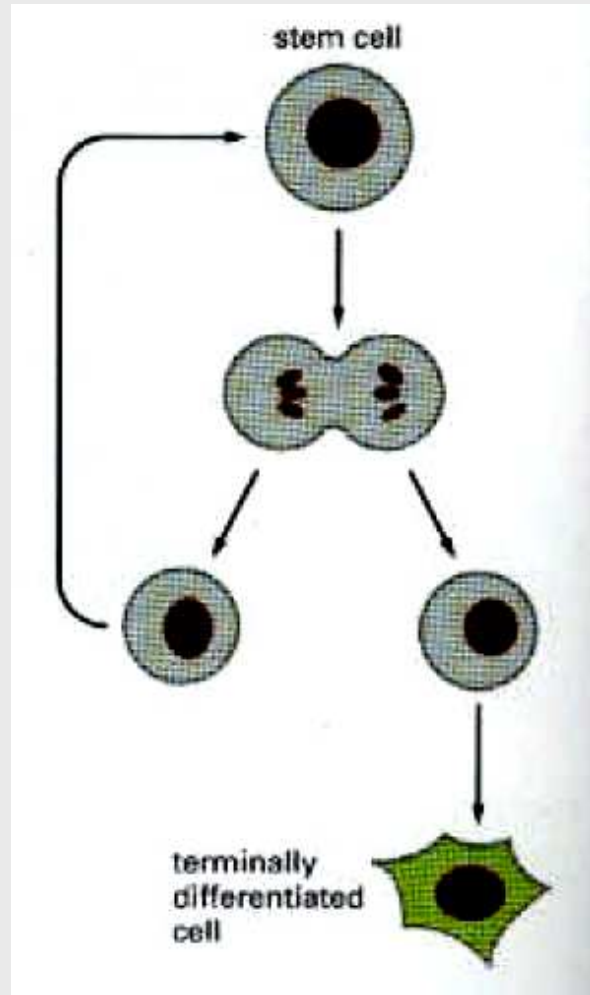


Turnover delle proteine
di membrana
(pulse-chase con
aminoacido radiomarcato)

Cornea



La cellula staminale



Una cellula in grado
di autorinnovarsi e
di differenziarsi



Viene mantenuta la
riserva

EVENTI CHIAVE DELLA RICERCA SULLE CELLULE STAMINALI

1880s – Prima definizione di “cellule staminali” ([Wilhem Roux](#))

1960s – Esistono cellule staminali nervose ([Joseph Altman](#) e [Gopal Das](#))

1963 – Dimostrare cellule staminali autorinnovanti nel **midollo osseo** di topo ([McCulloch](#) e [Till](#))

1968 - Trapianto di midollo osseo tra due fratelli tratta con successo la [SCID](#) (Sever Combined Immunodeficiency)

1978 - Scoperte cellule staminali ematopoietiche nel **cordone ombelicale** umano

1981 - Derivate **cellule embrionali staminali di topo** dalla massa cellulare interna

1992 - Coltivate in vitro le **neurosfe**

1995 - Illegali i fondi federali per la ricerca su cellule staminali ottenute con la distruzione dell'embrione ([Bill Clinton](#))

1997 - La leucemia origina da cellule staminali ematopoietiche

EVENTI CHIAVE DELLA RICERCA SULLE CELLULE STAMINALI

1998 - Derivata la **prima linea di cellule staminali embrionali umana** ([James Thomson](#))

2000 – Dimostrata la **plasticità** delle cellule staminali adulte

2003 - Cellule staminali adulte nei denti da latte dei bambini ([Songtao Shi](#))

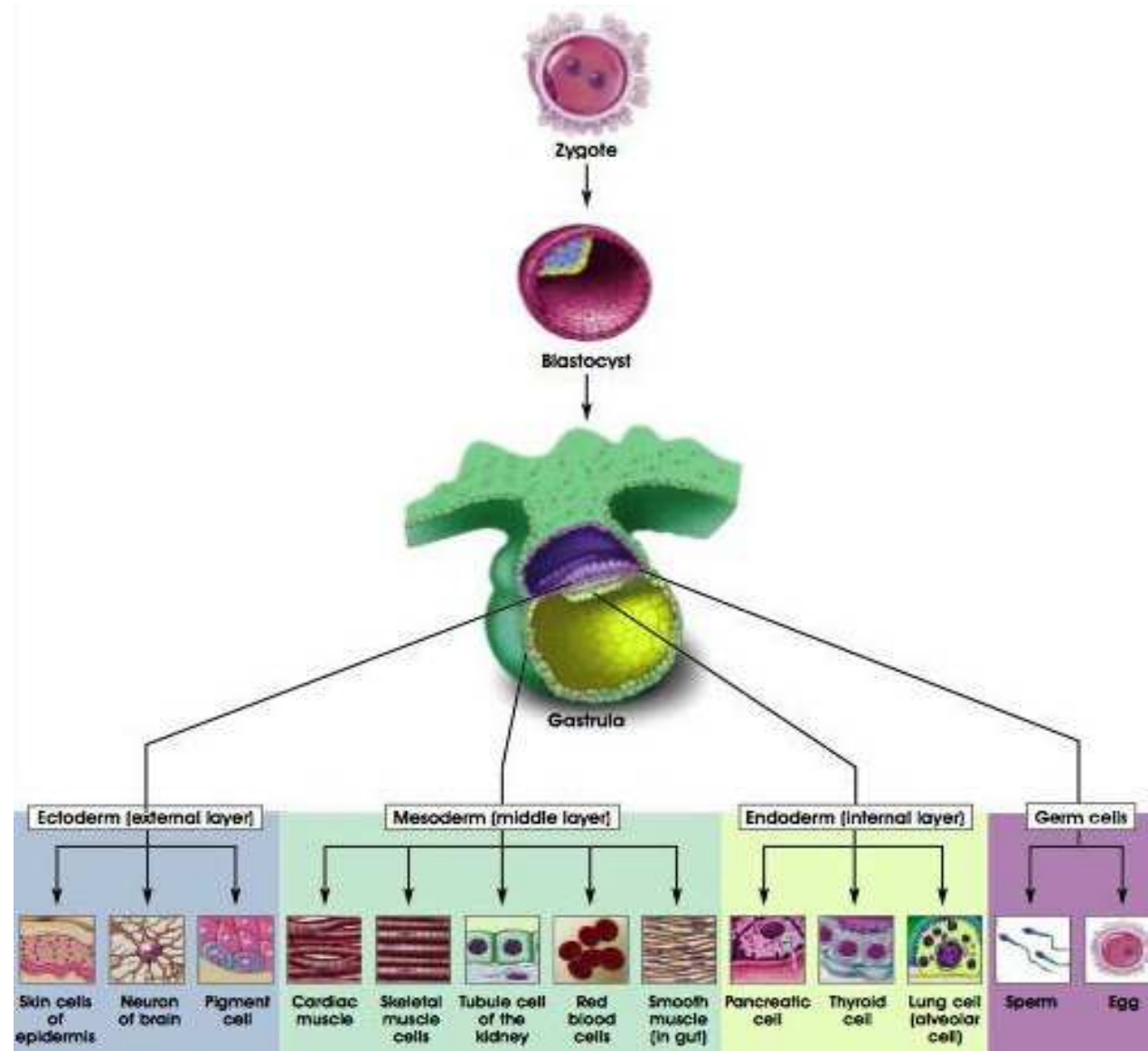
2004-2005 - [Hwang Woo-Suk](#) asserisce di avere creato numerose linee di cellule staminali embrionali umane da ociti umani non fertilizzati. Si scopre che non era vero

19 luglio 2006 - vietata la legge che permette l'uso di fondi federali per la ricerca su cellule staminali ottenute dalla distruzione dell'embrione ([George W. Bush](#))

4 settembre 2007 - Il Regno Unito approva la produzione di embrioni chimera per scopi di ricerca.

2007 – vengono prodotte le **iPSC** (= Induced Pluripotent Stem Cells) ([S. Yamanaka](#))

Cellule staminali con potenzialità diversa



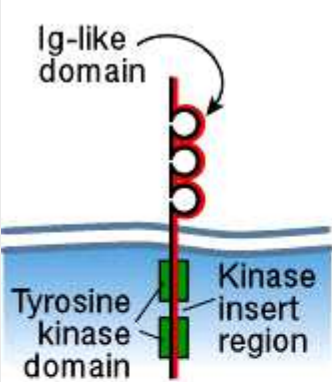
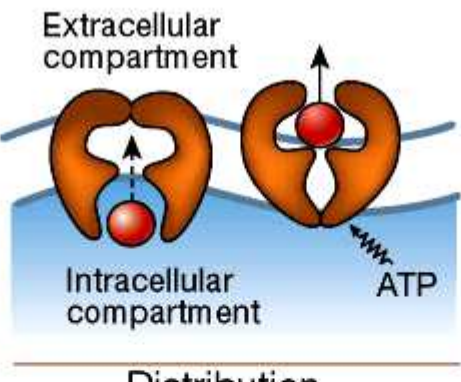
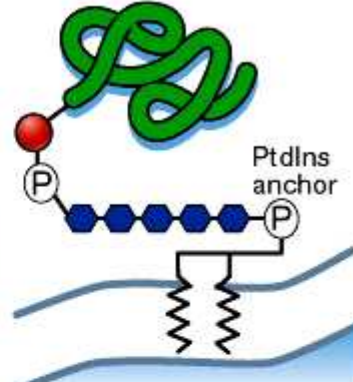
Cellule staminali

- 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
-

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

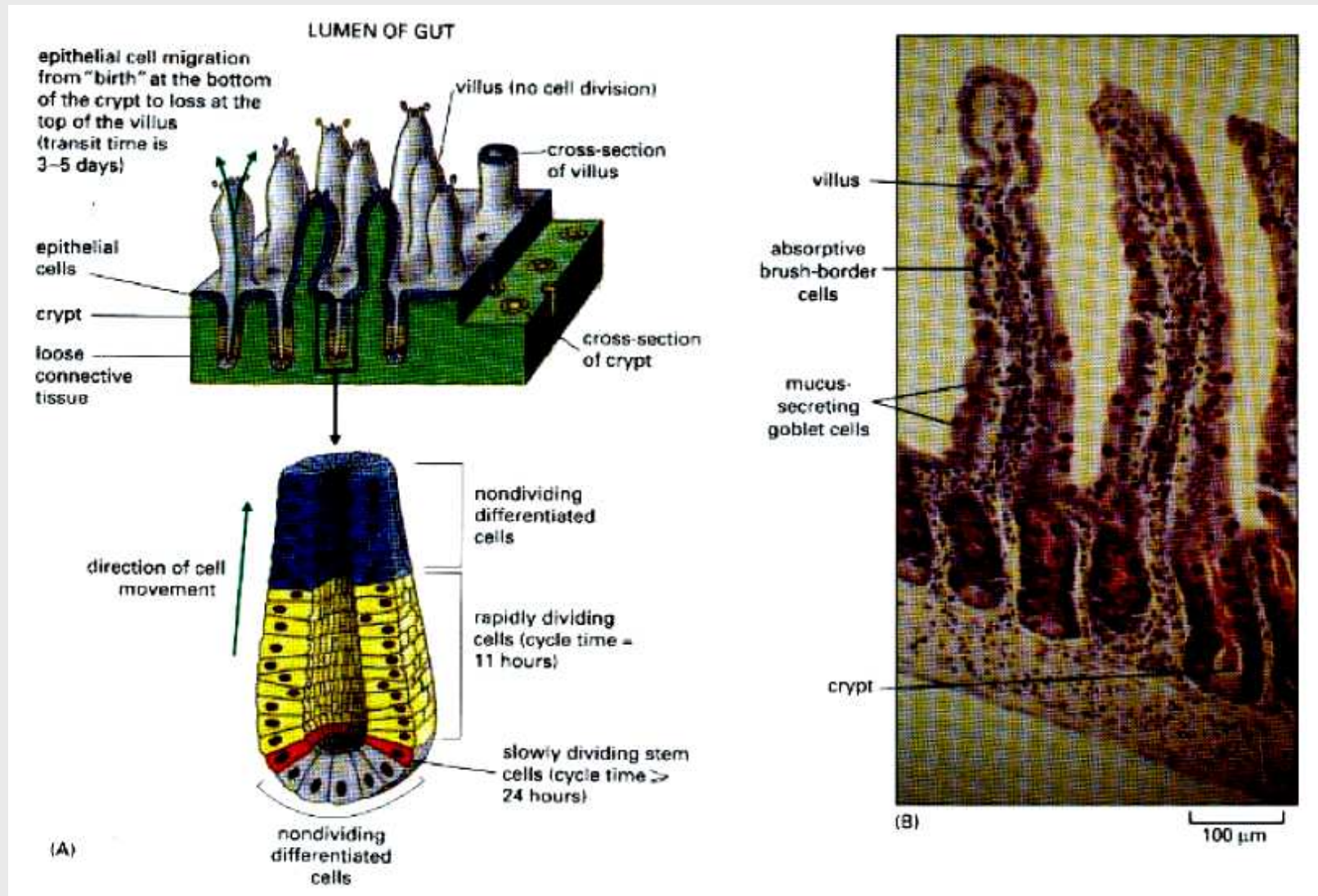
Marcatori di cellule staminali

c-kit 	P-glycoprotein or MRD1 	Sca-1 
Distribution • Melanocytes • Mast cells • Germ cells • Stem cells	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

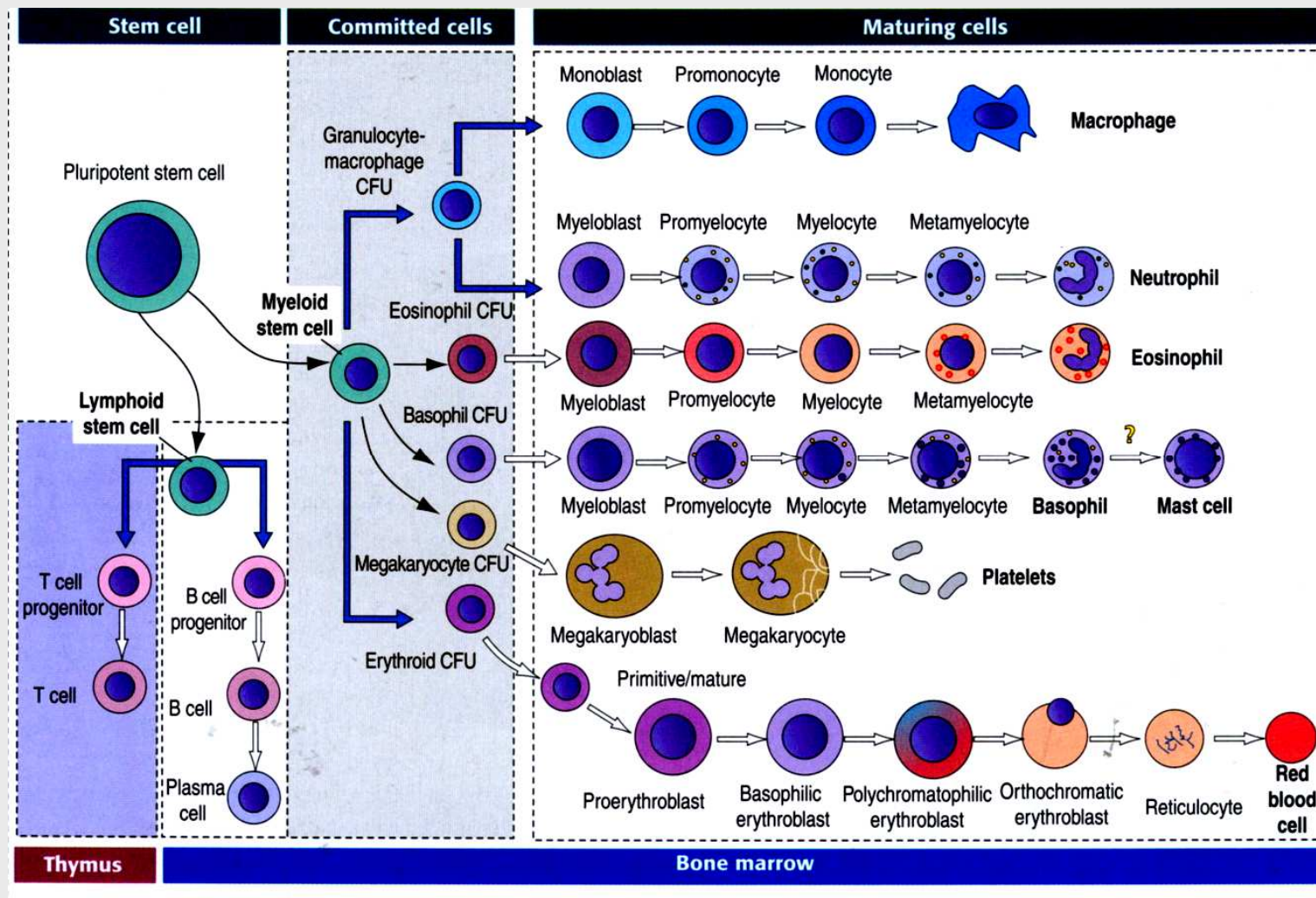
Dove si trovano le SC nell'adulto?

- Concetto di nicchia come microambiente
- Interazioni cosiddette “ecologiche” sono centrali alla biologia della cellula staminale

Cellule staminali dell'apparato GI

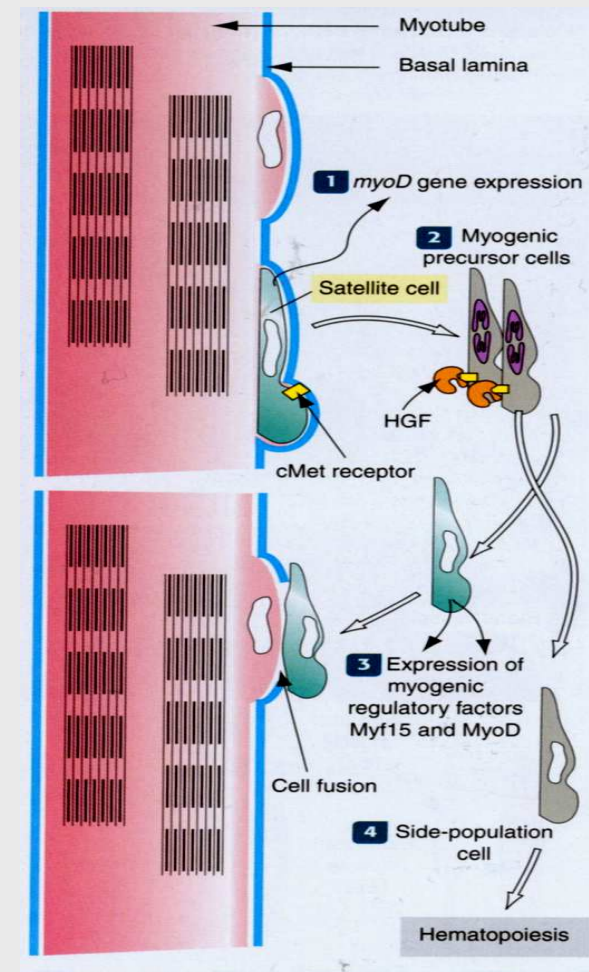
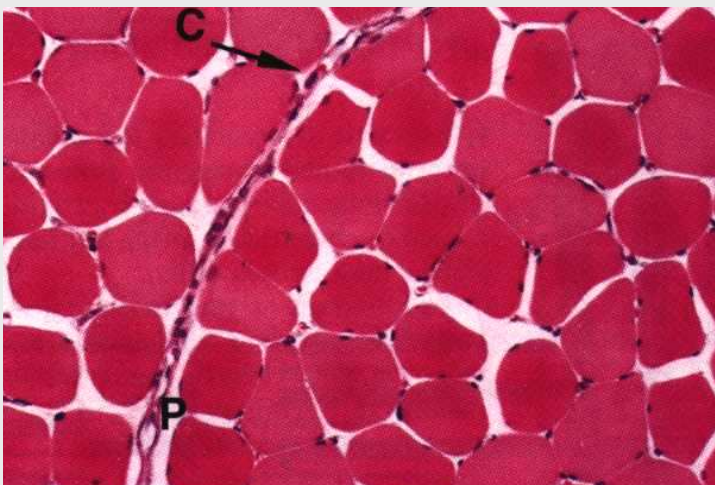
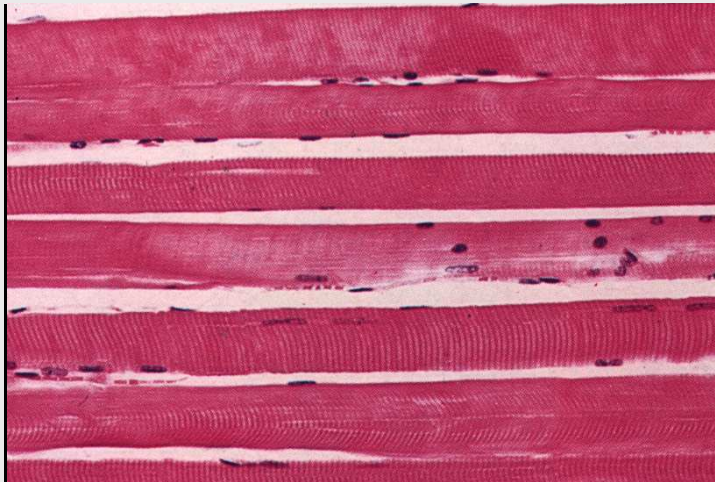


La cellula emopoietica staminale



CFU = Colony Forming Unit

La cellula staminale del muscolo scheletrico (cellula satellite)

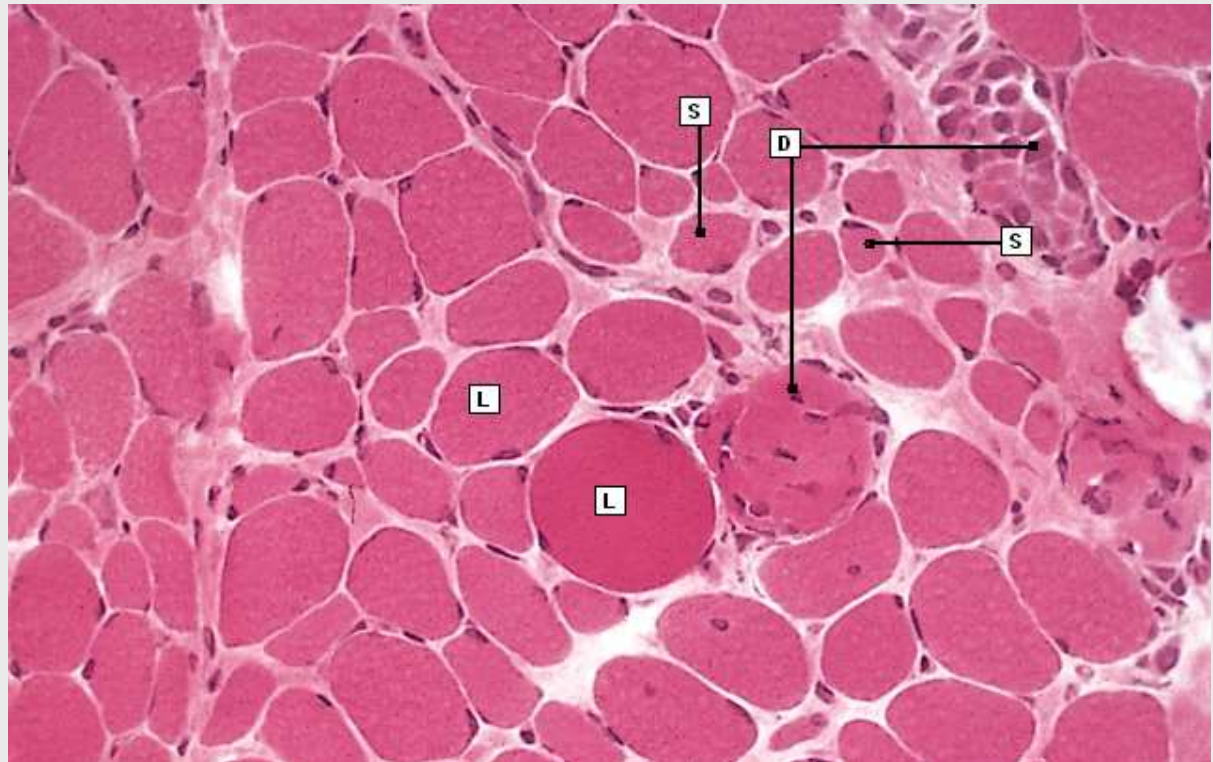
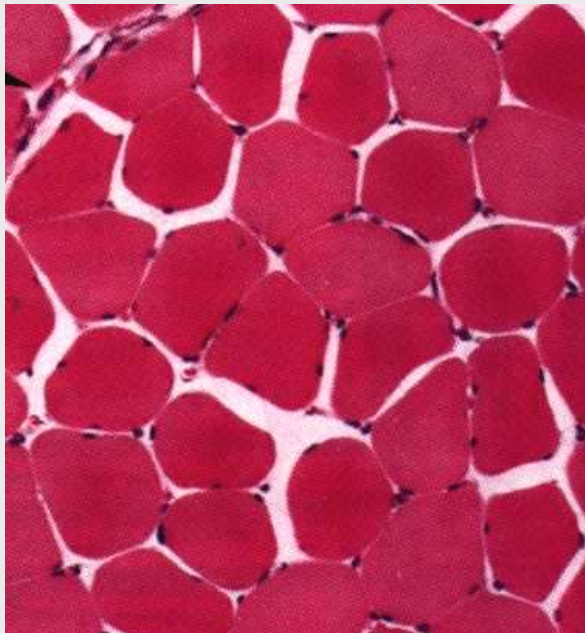


Distrofia muscolare di Duchenne: difetto del gene della distrofina

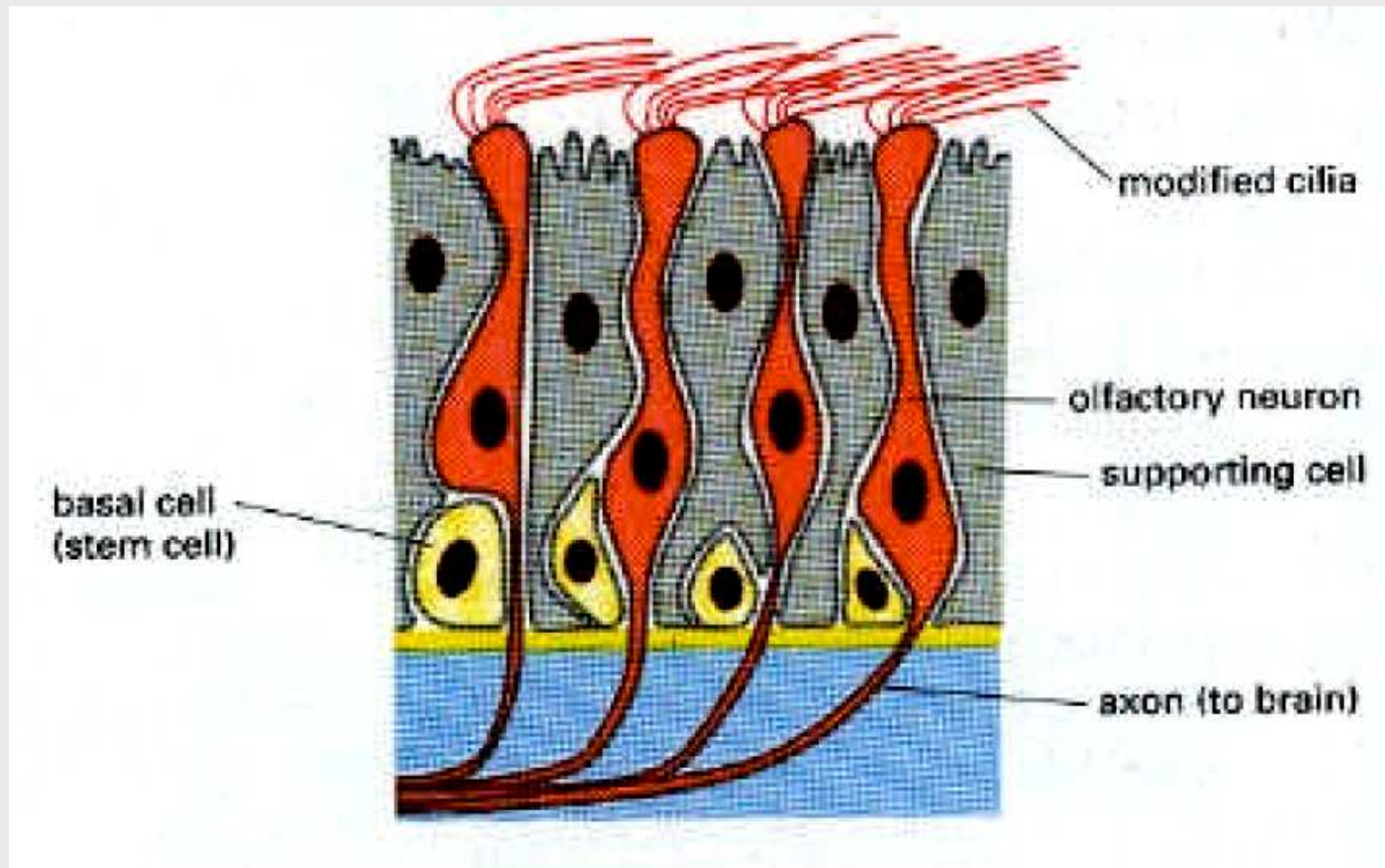
Le fibre malate degenerano e, per compensare, vengono reclutate nuove cellule satelliti
finchè la riserva non è consumata



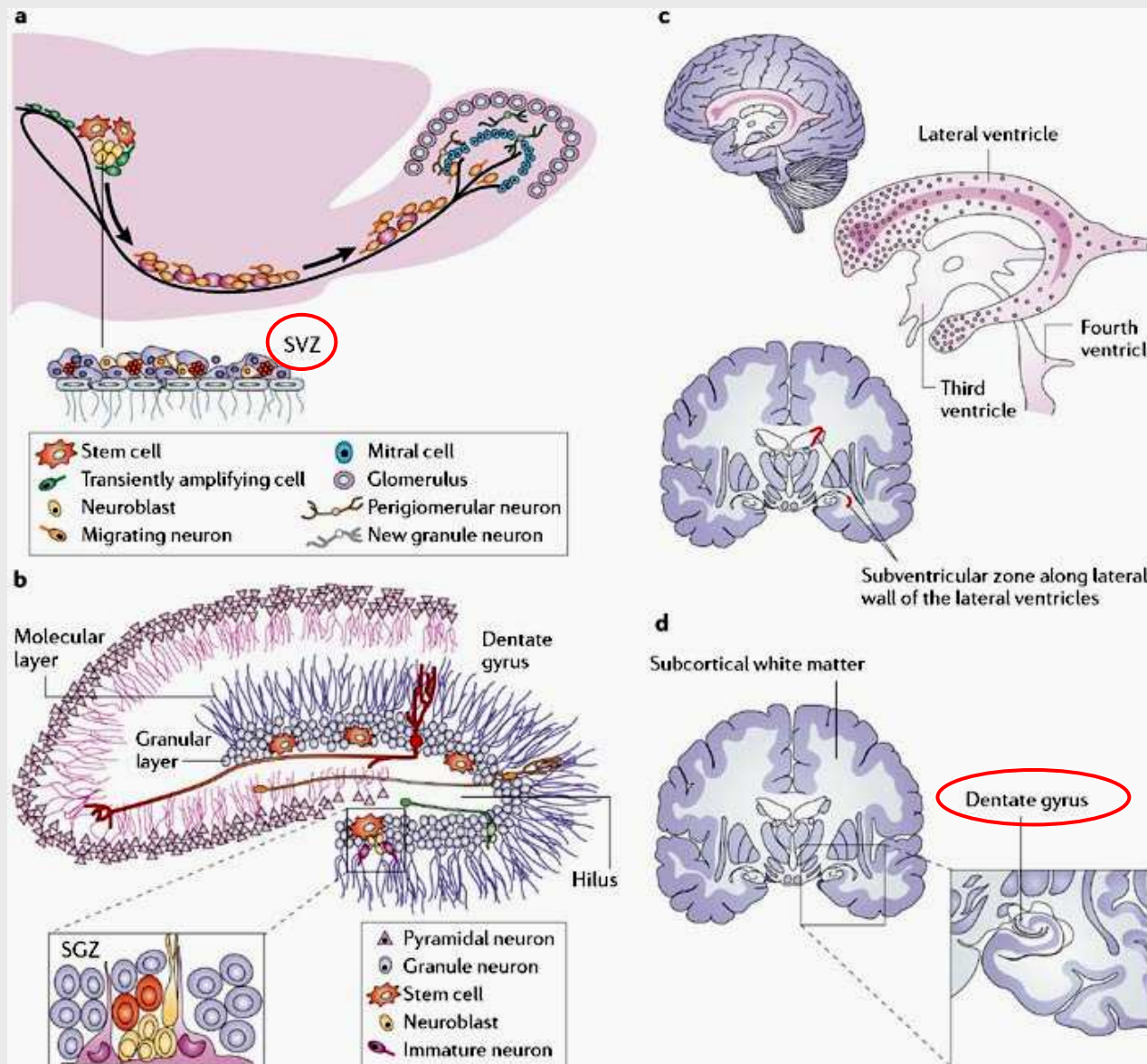
tessuto
sano



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



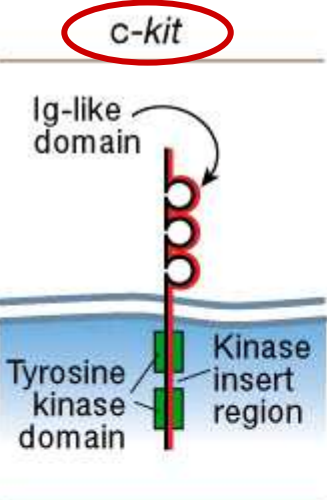
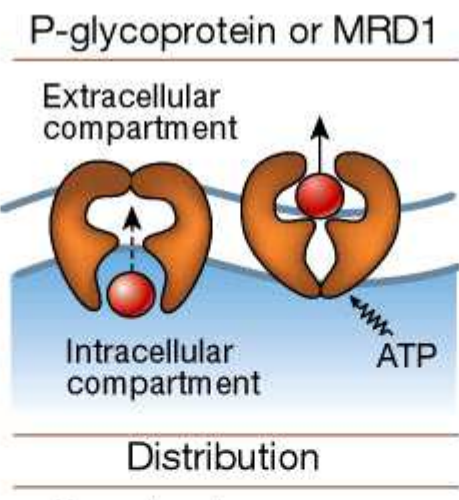
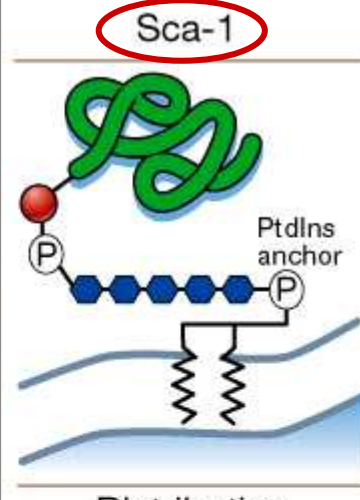
Cellule Staminali nervose



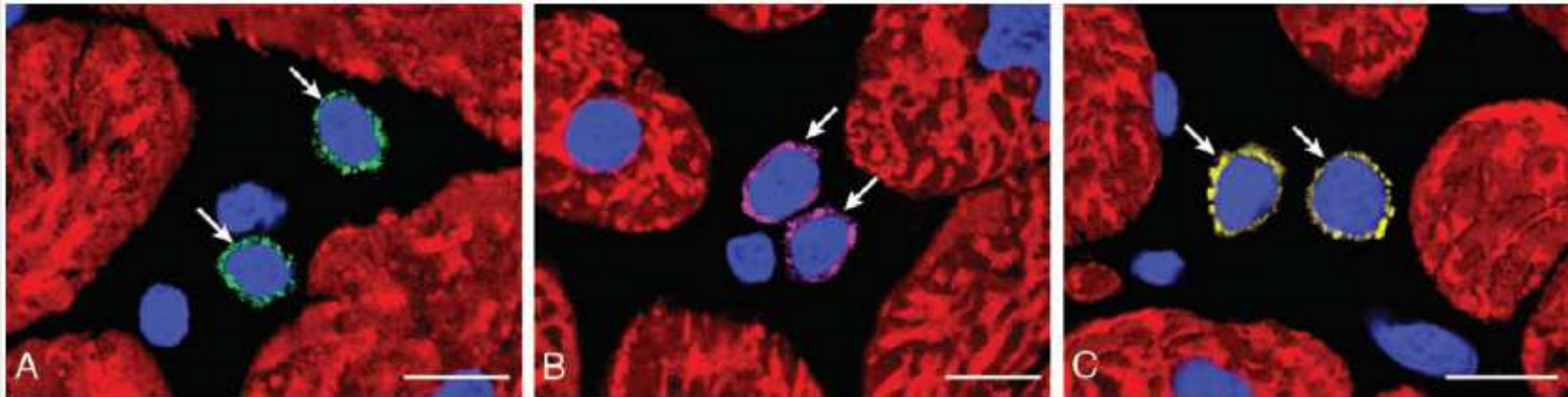
Cellule staminali nel cervello adulto

- Si trovano in due zone:
- Zona sottoventricolare dei ventricoli laterali (dove originano i neuroni olfattivi)
- Zona sottogranulare del giro dentato (integrate 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 	P-glycoprotein or MRD1 	Sca-1 
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 (identificate grazie a marcatori)



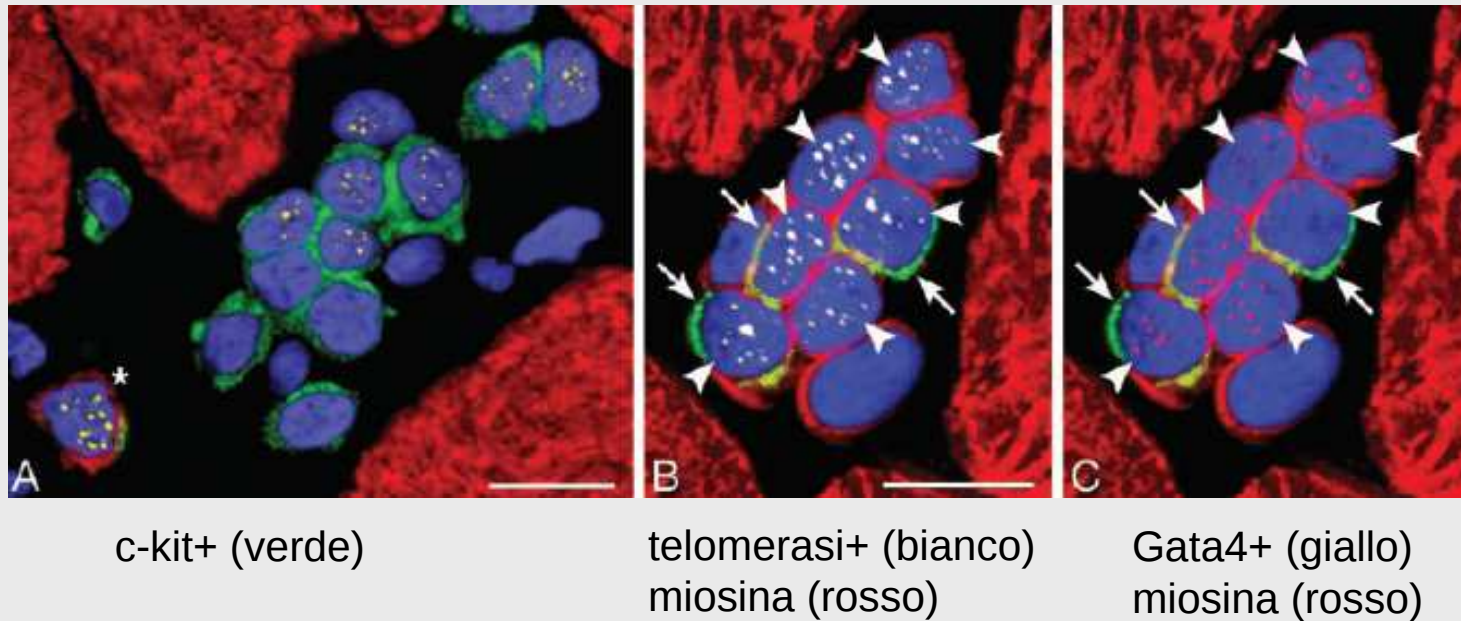
c-kit+

MDR+

Sca1+

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

Cellule staminali aumentano nel miocardio adulto che ha subito danno



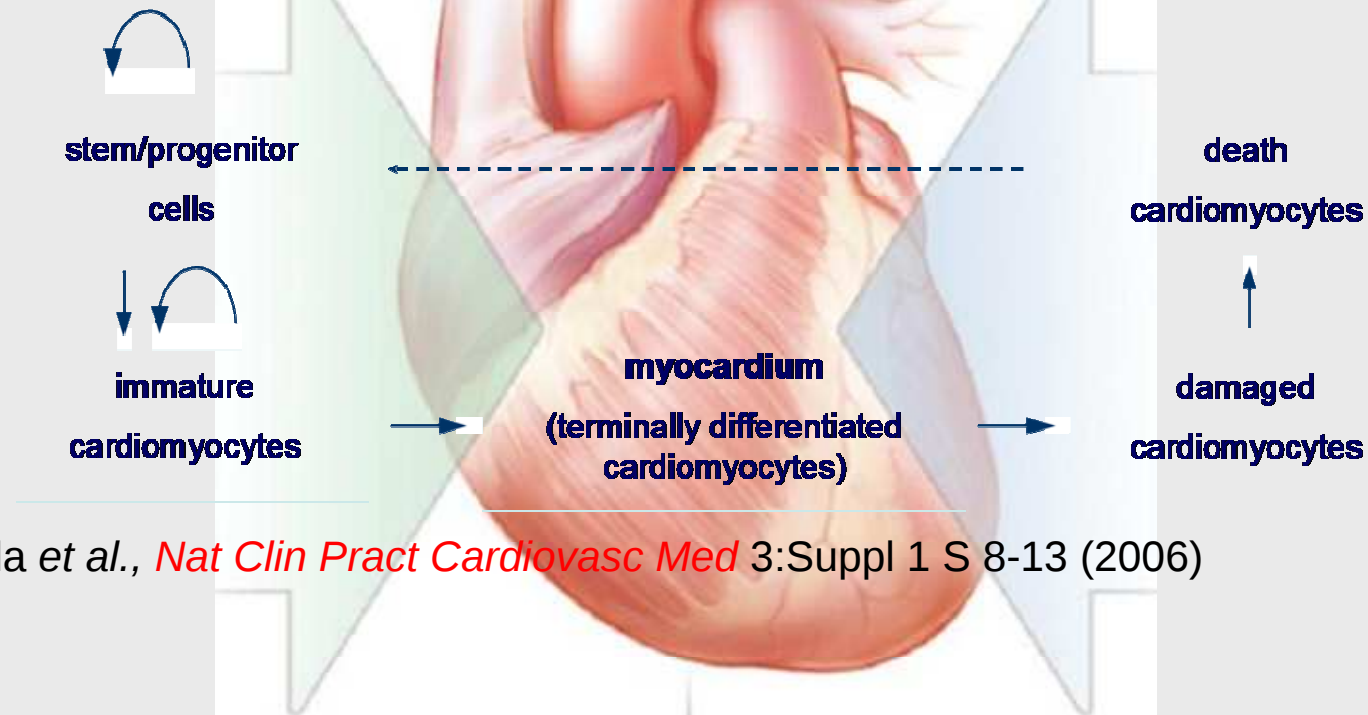
In seguito a danno d'organo proliferano (telomerasi+) e poi si differenziano, acquisendo l'espressione di marcatori miocardio-specifici (GATA4, MEF-2c, alpha-cardiac MHC, laminina)

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

Accrescimento miocardio

- Vita fetale: notevole proliferazione
- Da neonato a adulto: la massa aumenta di circa 30-50x, soprattutto per **ipertrofia** (nella prima decade generate cellule binucleate e poliploidi)
- La duplicazione cellulare generalmente studiata con marcatura del DNA a breve termine mostra livelli bassissimi

Omeostasi dei cardiomiociti

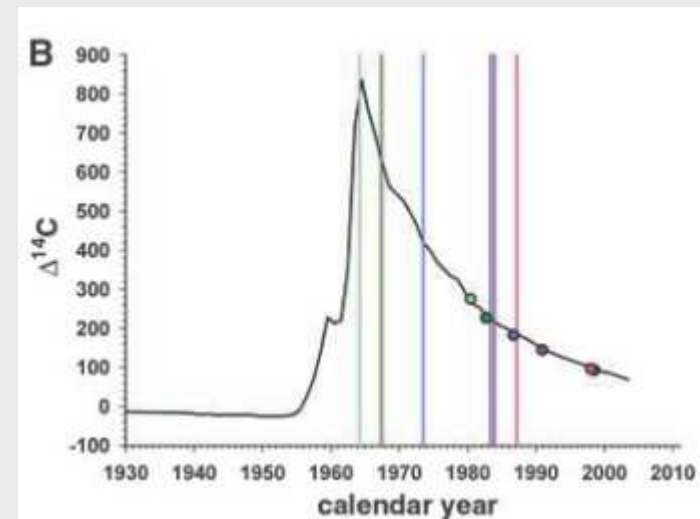
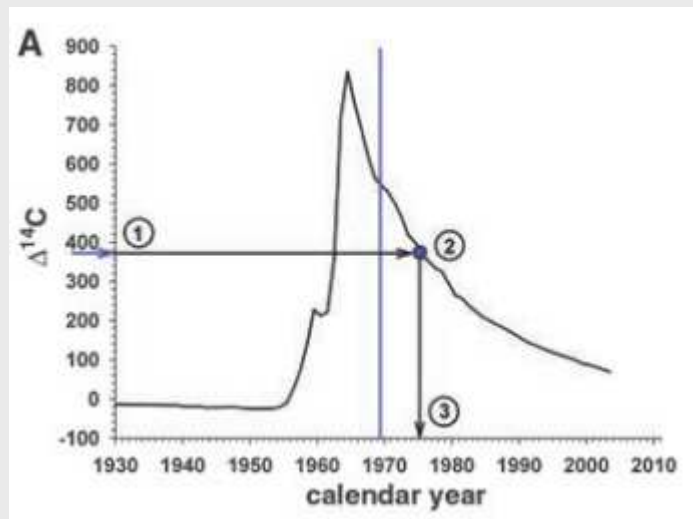


Torella et al., *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3:Suppl 1 S 8-13 (2006)

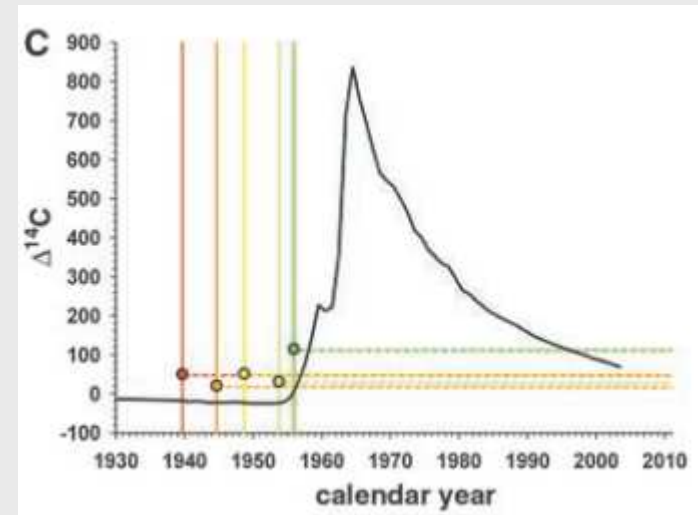
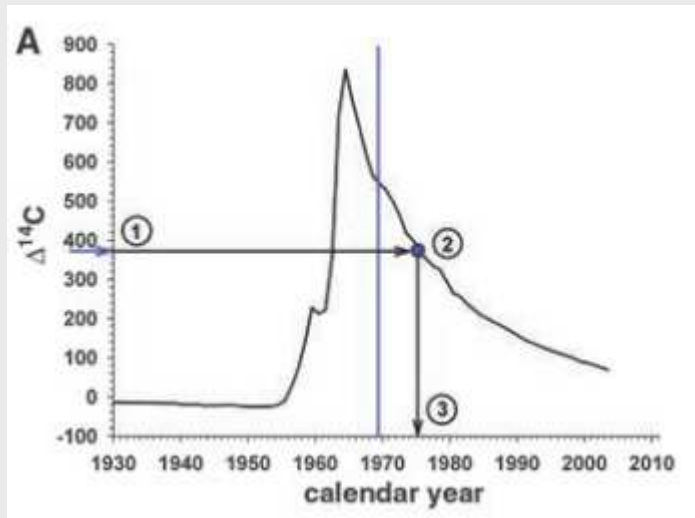
- I cardiomiociti si rinnovano, con un ritmo che va dal **1%** annuale all'età di **25** anni all'**0.45%** all'età di **75** anni.
- Meno del **50%** dei cardiomiociti sono sostituiti durante la vita.

Bergmann et al., *Science* 324: 98 (2009)

- Il **turnover** delle popolazioni cellulari saggiata nei tessuti umani sulla base del carbonio radioattivo (^{14}C) incorporato nel DNA (fullout dei test nucleari della guerra fredda)
- Il trattato del 1963 bandiva i test
- Anno di cutoff: prima del 1963: ^{14}C incorporato nel DNA (= **esperimento in vivo di pulse-chase**)
- Paragonando l'età del DNA dei cardiomiociti con l'età anagrafica dei pazienti → si può stimare il turnover della popolazione cardiomiocitica



^{14}C concentrations from all individuals born around or after the nuclear bomb tests **corresponded to atmospheric concentrations** several years after the subjects' birth



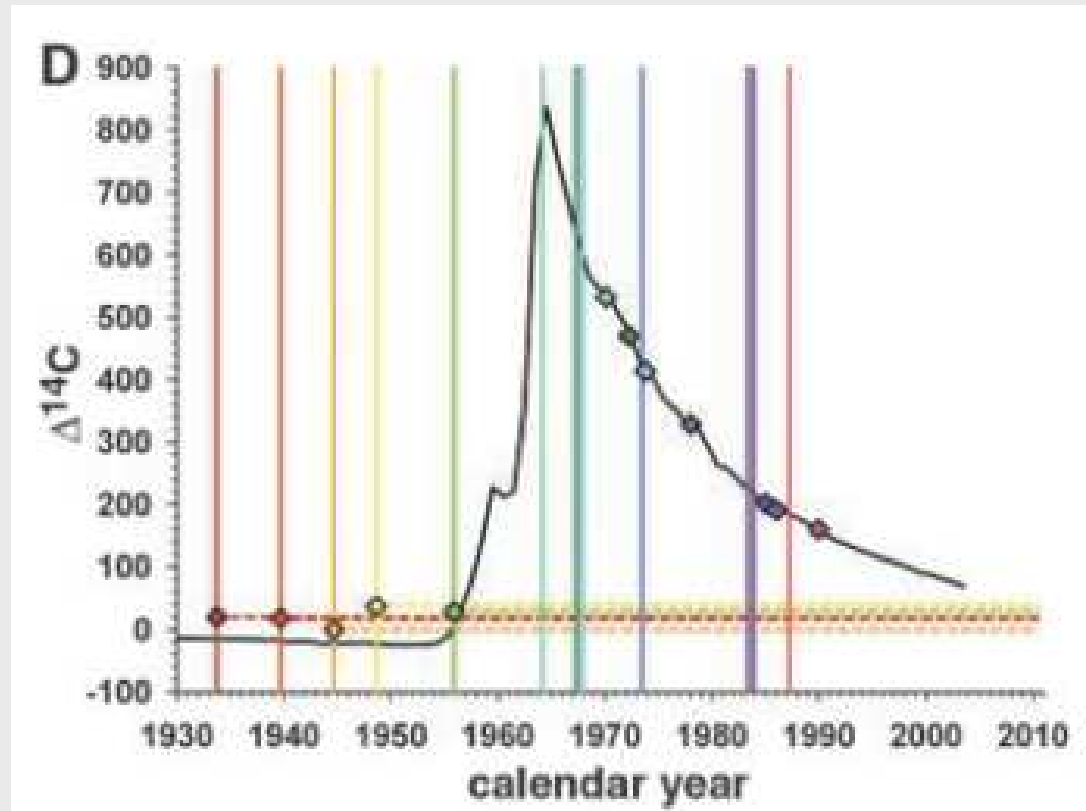
In all studied cases, born up to 22 years before the onset of the nuclear bomb tests, ^{14}C concentrations **were elevated** compared to the levels before the nuclear bomb tests

- L'età media del DNA delle cellule di tutto il cuore era sostanzialmente più giovane dell'età anagrafica del paziente → turnover cellulare
- Separati i nuclei dei miociti/non miociti
- → il DNA dei nuclei dei cardiomiociti era anch'esso più giovane dell'età anagrafica → significativa sintesi postnatale di DNA

I cardiomiociti umani sintetizzano DNA dopo la nascita

- In pazienti nati prima della guerra fredda, la concentrazione di ^{14}C nel DNA dei loro cardiomiociti è maggiore della concentrazione atmosferica del ^{14}C all'epoca della loro nascita
- In pazienti nati durante o dopo i test nucleari la concentrazione di ^{14}C è uguale a quella di ^{14}C atmosferico
- I pazienti adulti all'epoca in cui iniziarono i test nucleari hanno ancora incorporato ^{14}C nel DNA dei loro cardiomiociti

Cardiomiociti umani sintetizzano DNA dopo la nascita



Il rinnovamento dei cardiomiociti è un processo età-dipendente

- Ritmo dell'~**1%/anno a 20 anni**, che diminuisce allo 0.4%/anno a 75 anni (modelli matematici)
- → a 50 anni, 55% dei cardiomiociti sarebbero quelli presenti dalla nascita e 45% sarebbero stati generati dopo la nascita
- al contrario, il turnover dei non-miociti nel cuore è del 18%/anno con vita media di circa 4 anni.
- Esperimenti di marcatura con **timidina radiomarcata** in **topi**: i cardiomiociti si rinnovano a un ritmo di **1.1%/anno**.

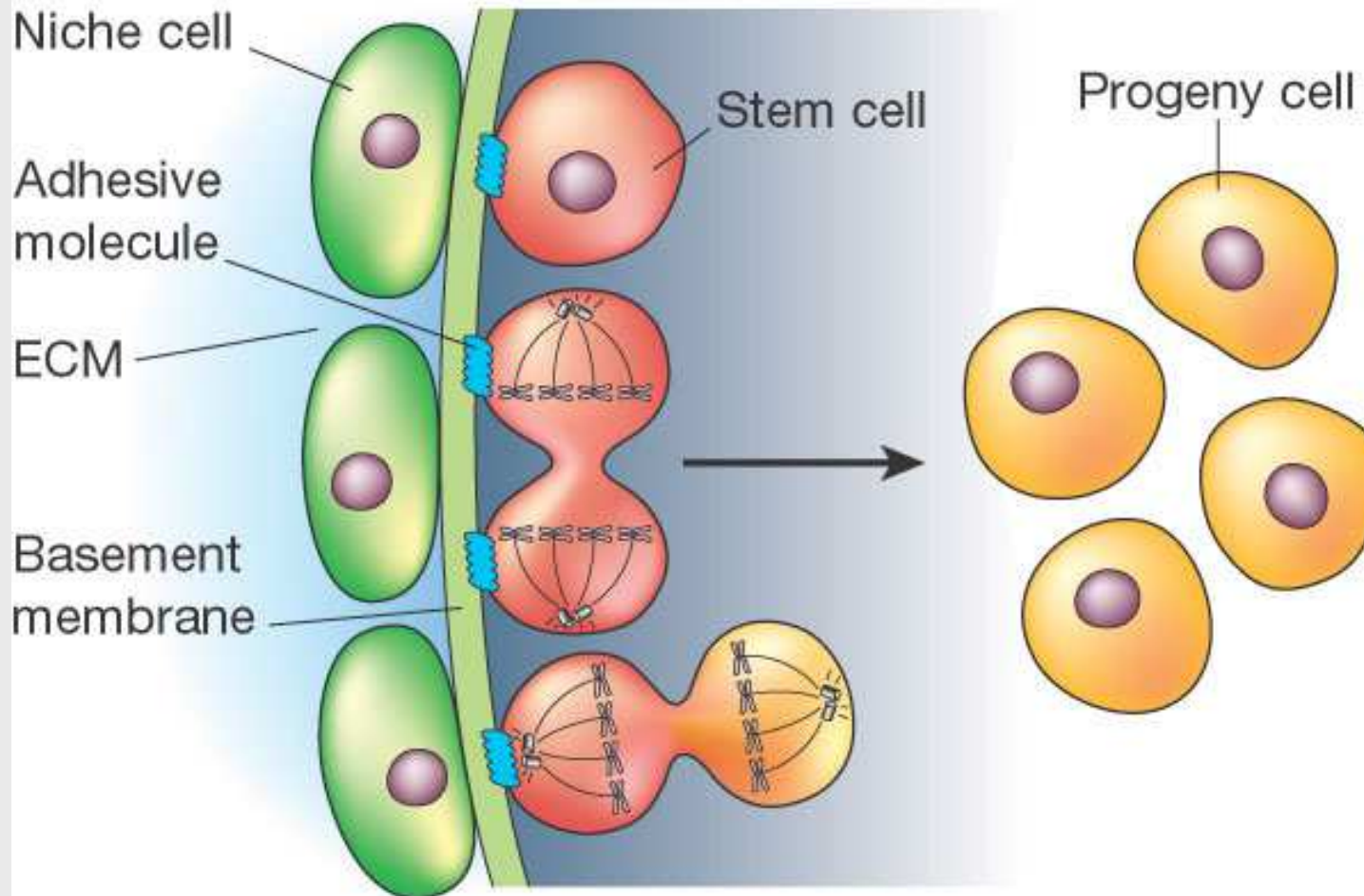
Definizioni delle cellule staminali ES, EG, EC o da adulto

- **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

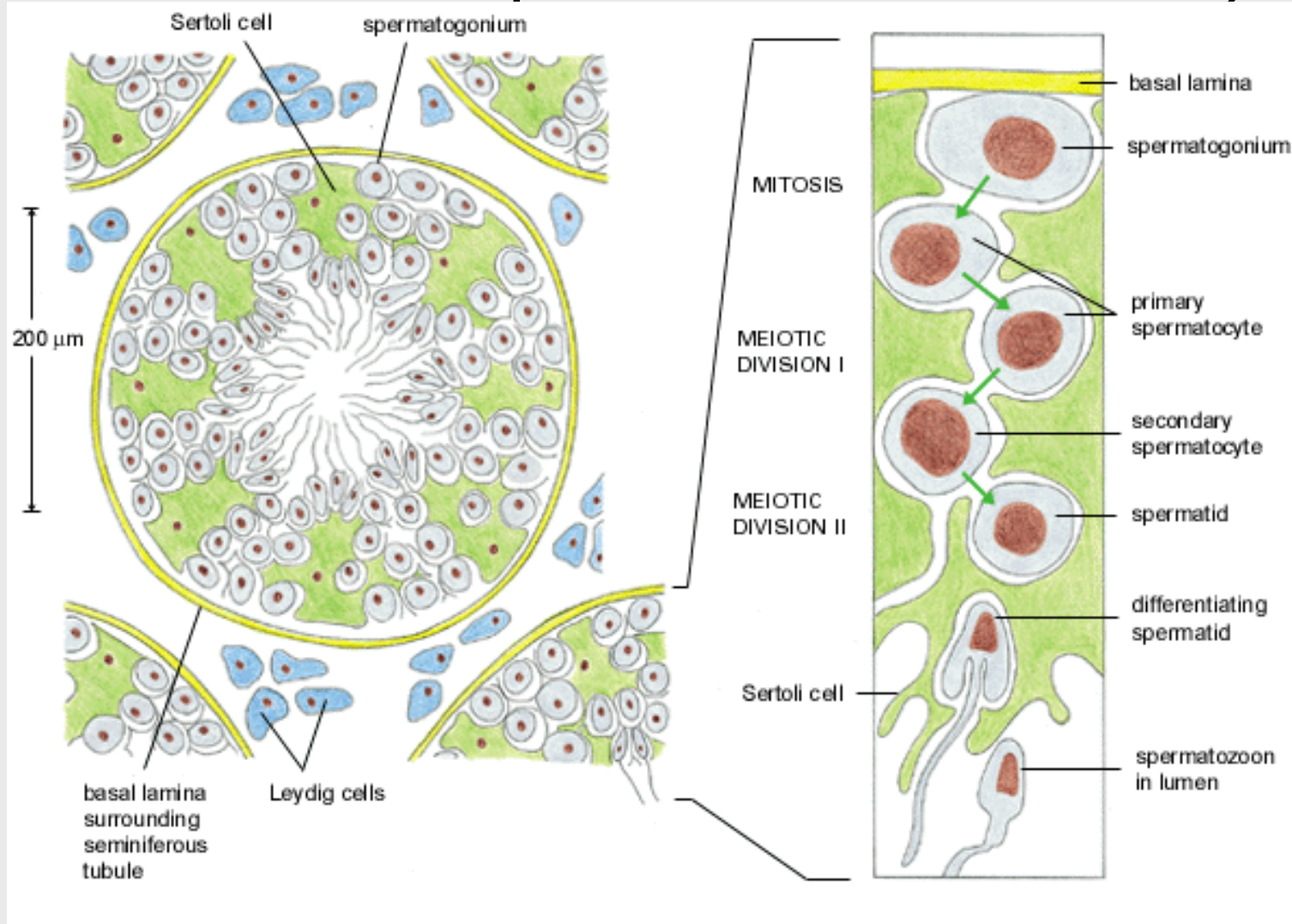
Cellule staminali dell'adulto

- 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

Ruolo della nicchia ambientale (nel mantenere staminalità e determinare tipo di differenziamento)



Ruolo della nicchia ambientale (nel mantenere staminalità e determinare tipo di differenziamento)



Omeostasi dei tessuti

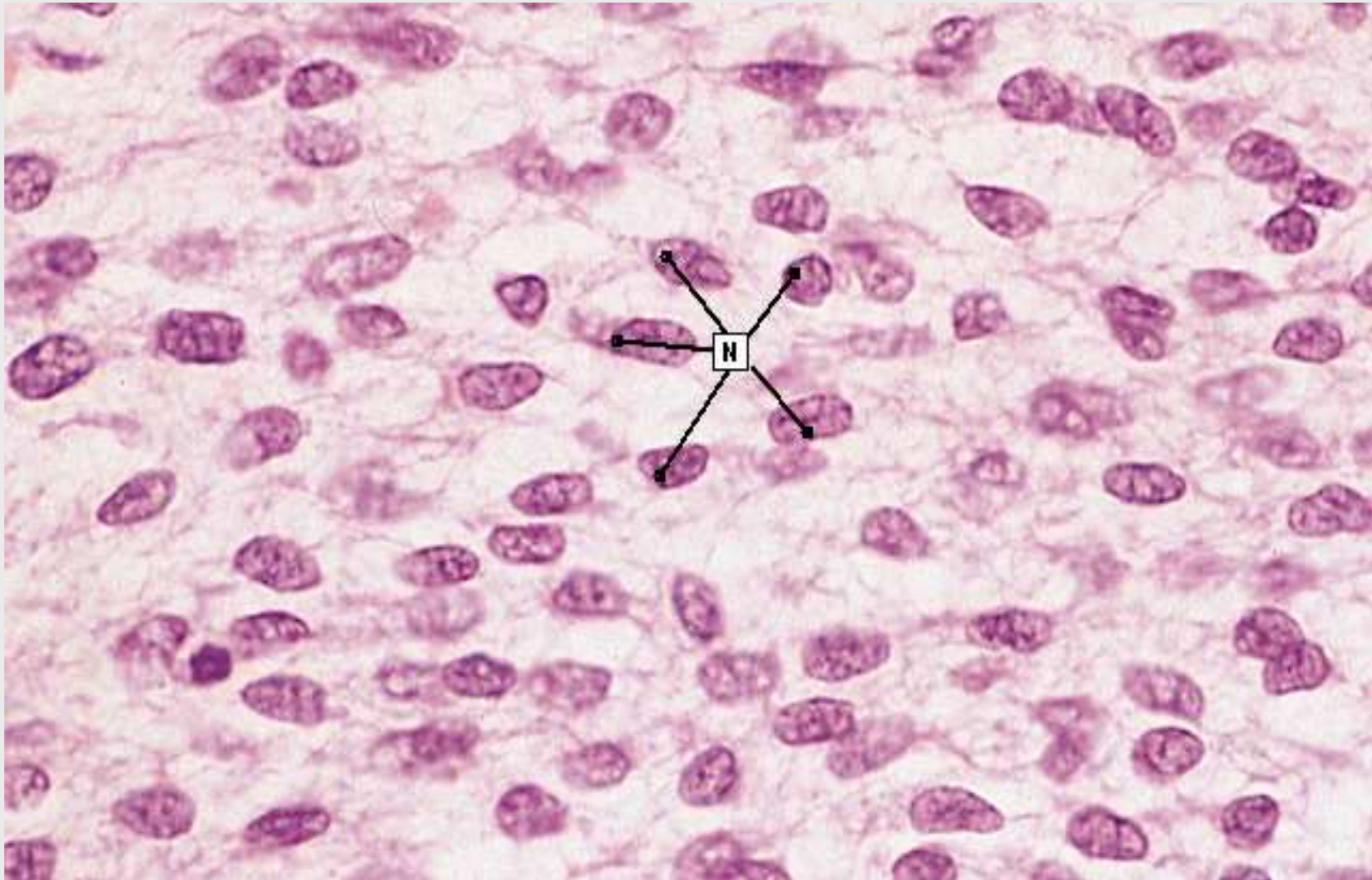


- Queste cellule servono per il mantenimento del tessuto e in condizioni normali sono sufficienti
- Ma alcuni tessuti sono al limite, soprattutto ora che la vita si è allungata
- → trovare altre riserve di cellule staminali
- Identificazione non facile: basata
 - Funzionalità
 - Localizzazione (concetto di nicchia)

Cellule staminali e medicina rigenerativa

- Ogni tessuto/organo ha una riserva di cellule staminali, ma grandi differenze e perciò diversa potenzialità
- Alcuni tessuti/organi contengono una notevole riserva di cellule staminali:
 - Midollo osseo
 - Cordone ombelicale
 - Tessuto adiposo
 - Sangue
 - Placenta, liquido amniotico
- **Concetto di plasticità**
 - epitelio, osso, tess nervoso, emopoietico, endotelio

Mesenchima embrionale



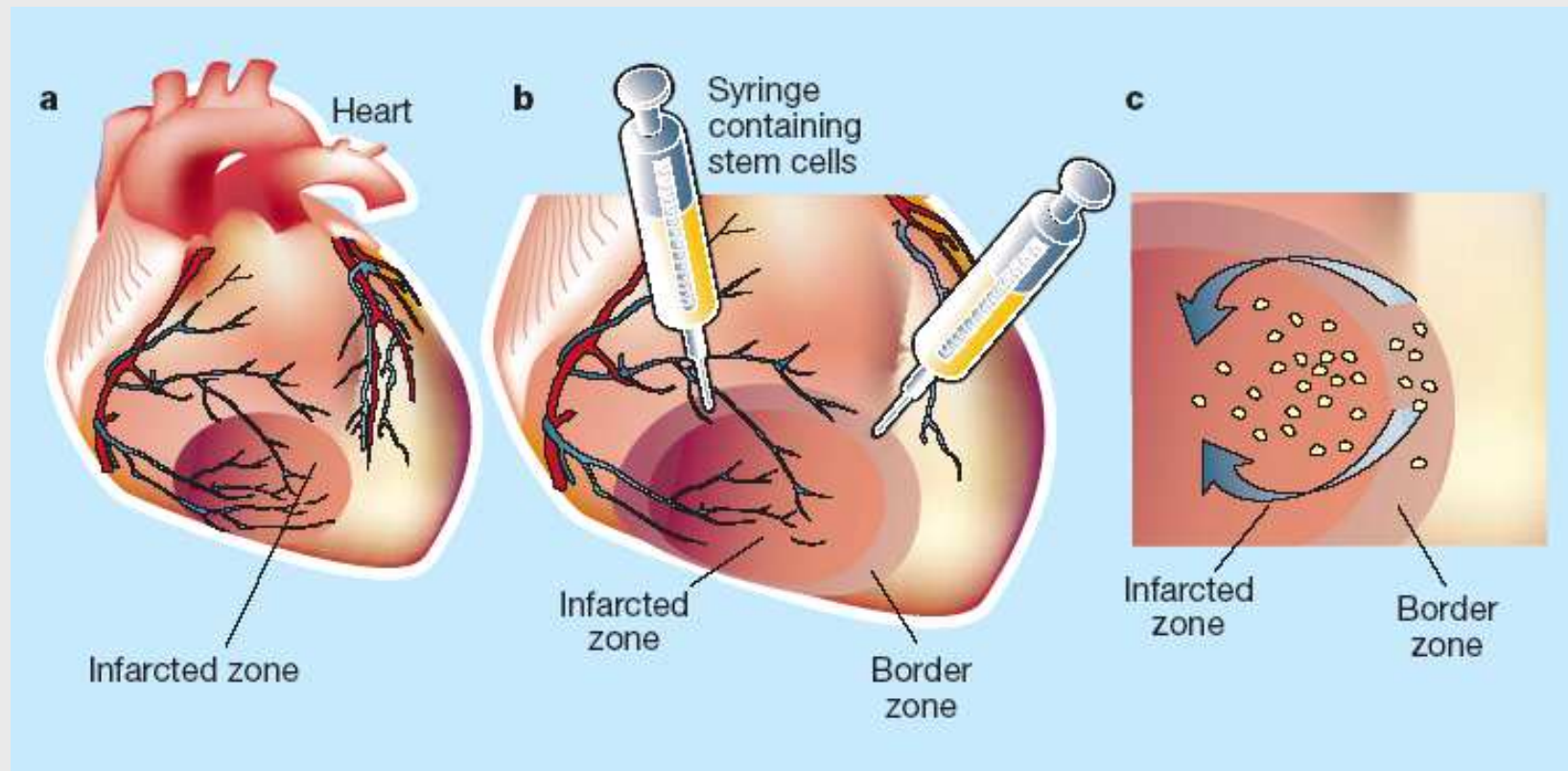
Le cellule del midollo osseo hanno grandi potenzialità

- 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

Cellule mesenchimali staminali (MSC) riparano il cuore infartuato

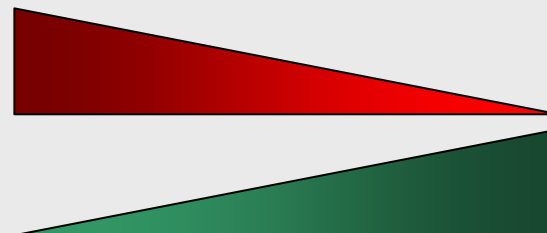


Pochi laboratori sono riusciti a confermare il dato!!! Sussman, Nature 5 aprile 2001

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 gran maggioranza delle cellule)
- Meccanismi **epigenetici ereditabili** (metilazione del DNA, imprinting)
- Memoria molecolare ereditabile attraverso meccanismi epigenetici
- Stabilità del fenotipo
- **NOVITA': Possibilità di riprogrammazione**

potenzialità
differenziamento



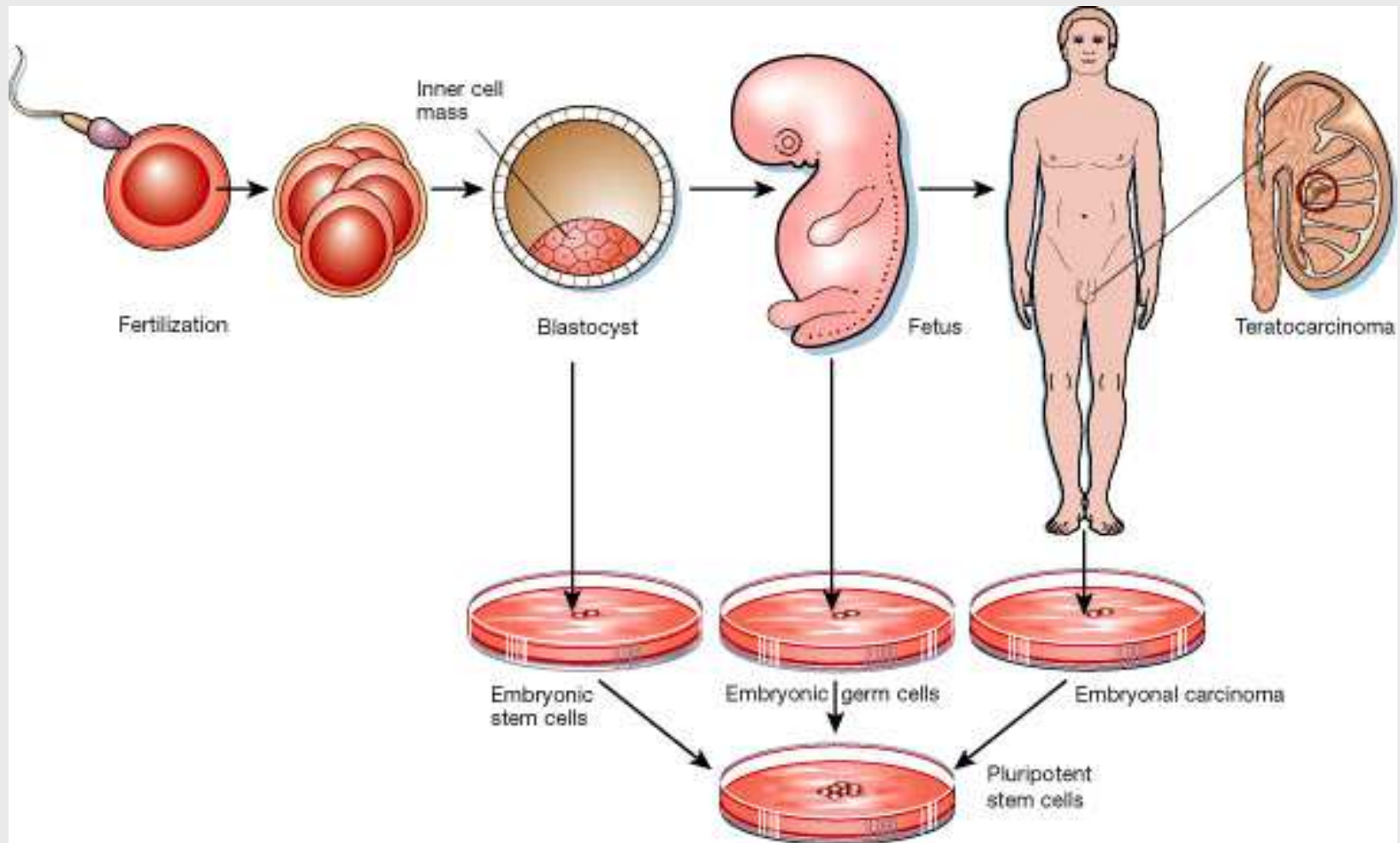
Differenze tra cellule staminali embrionali e adulte

- 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

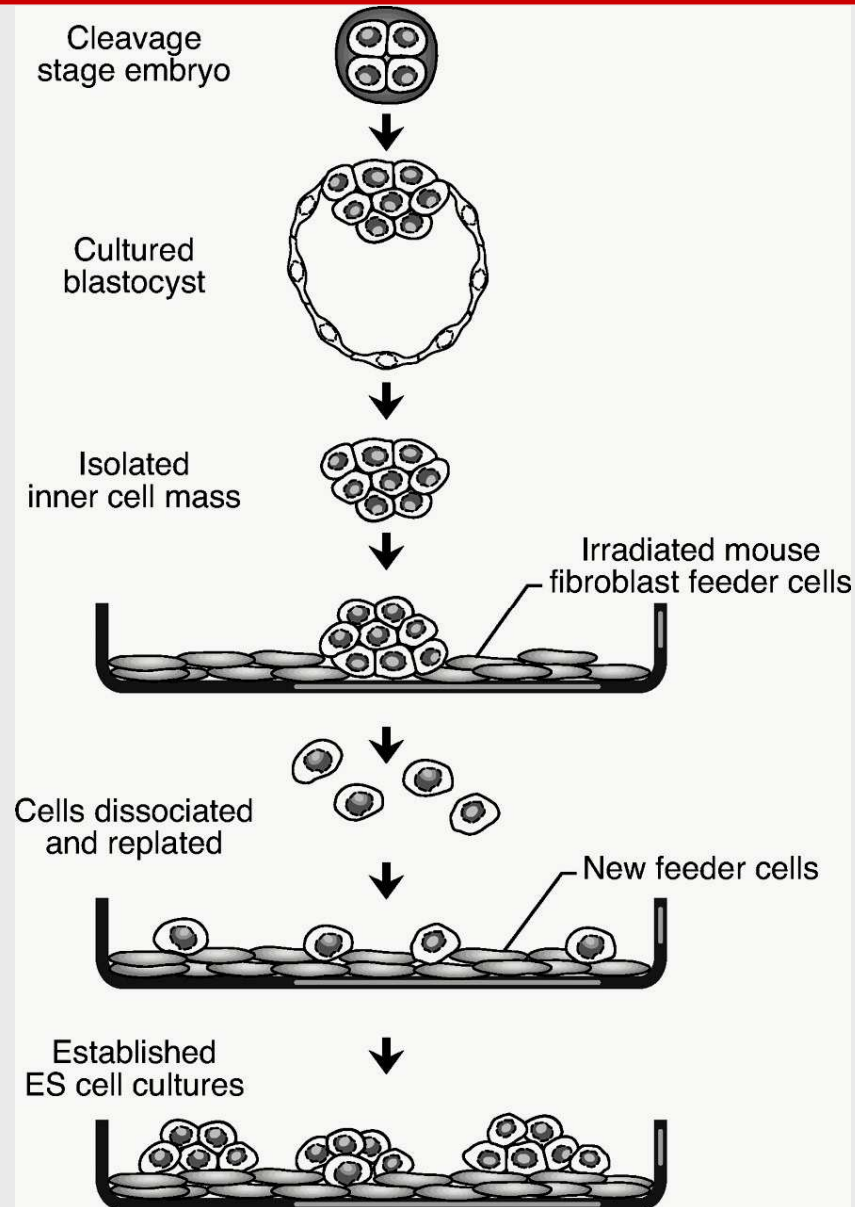
Differenze tra cellule staminali embrionali e adulte

- 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

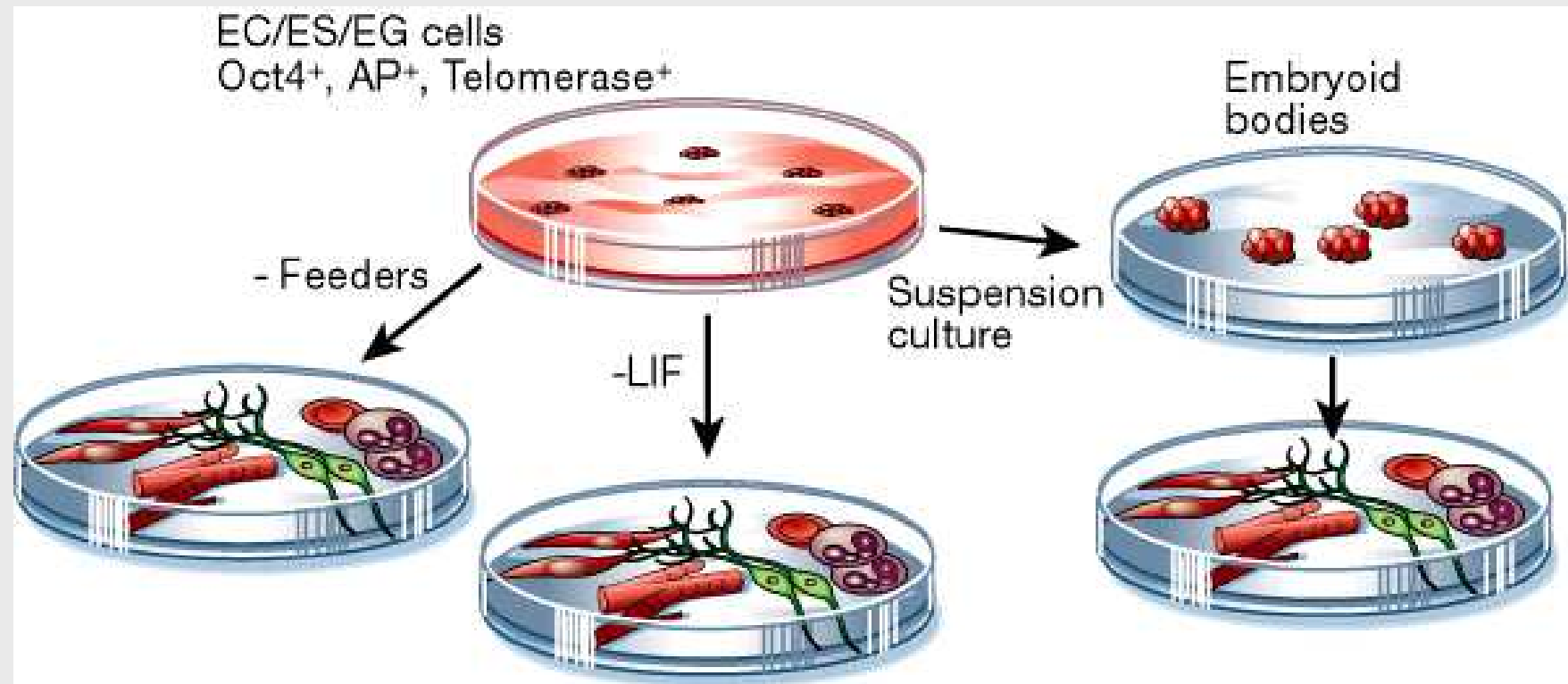
Cellule staminali embrionali



Cellule staminali embrionali



Cellule staminali in vitro



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

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

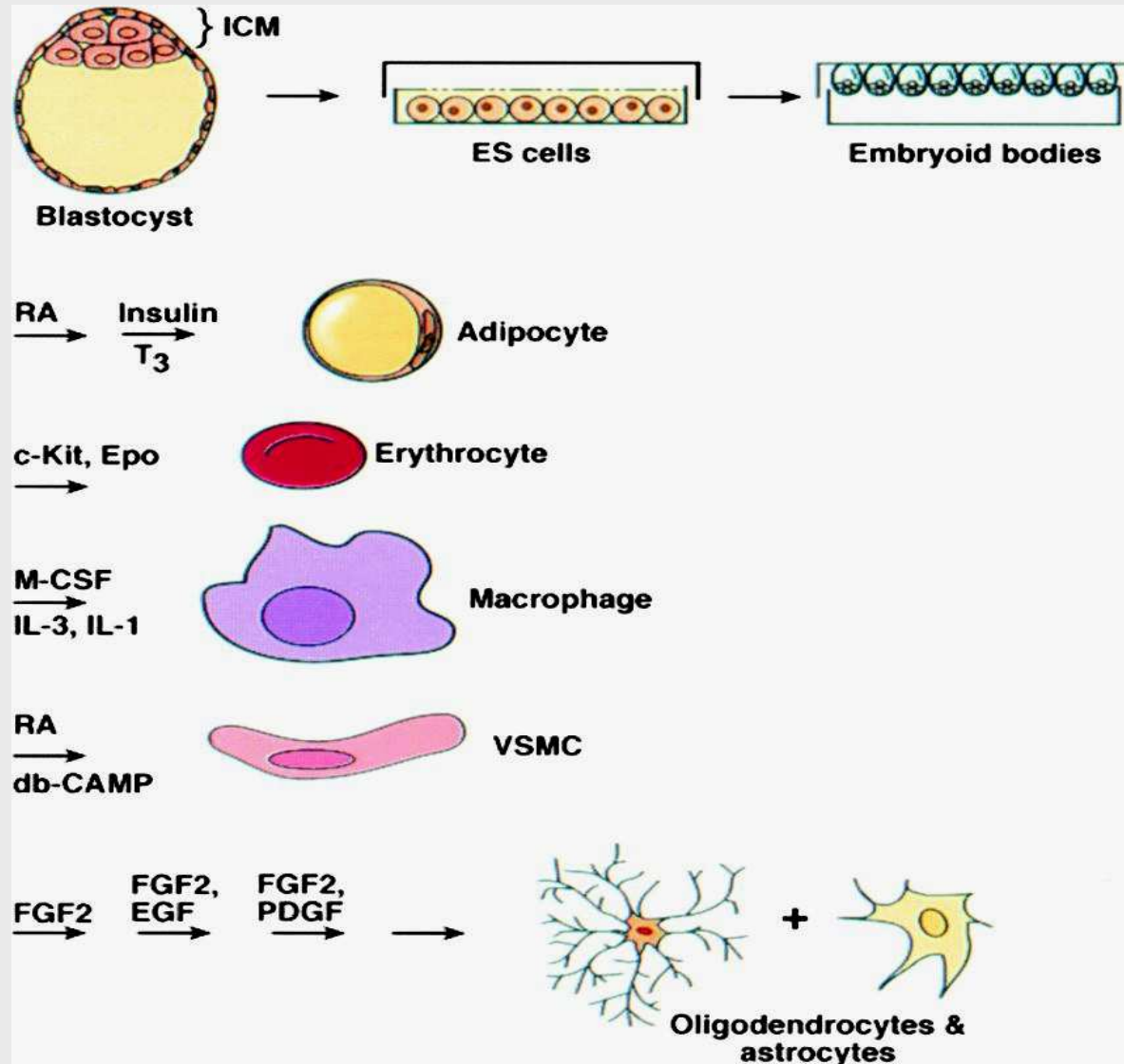
Regolazione del differenziamento

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

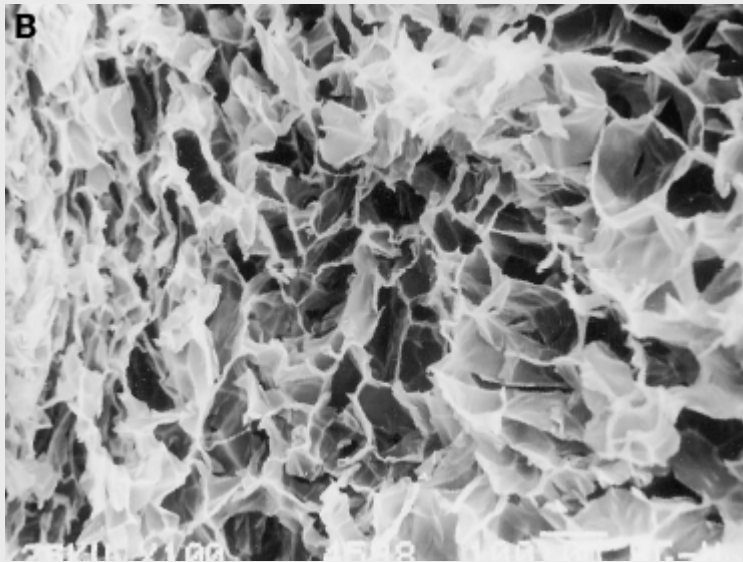
Strategia

- 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.

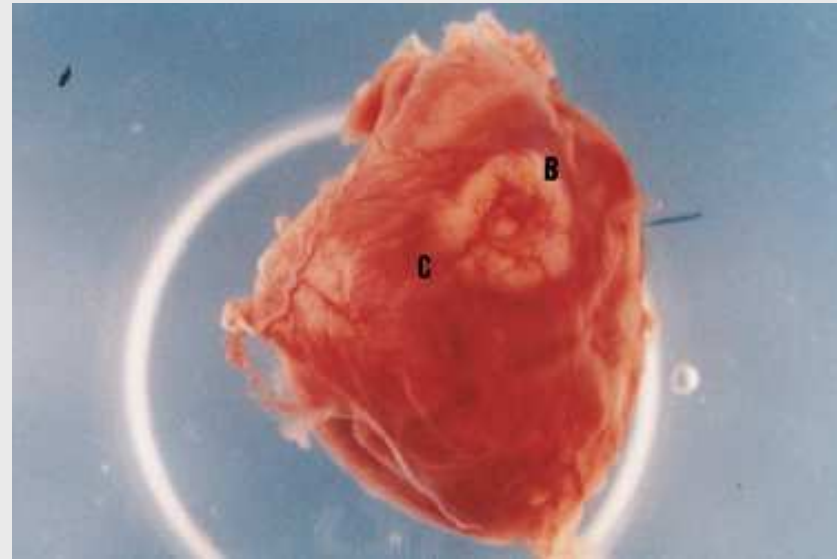
Differenziamento delle cellule staminali



Ingegneria tessutale è il futuro



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



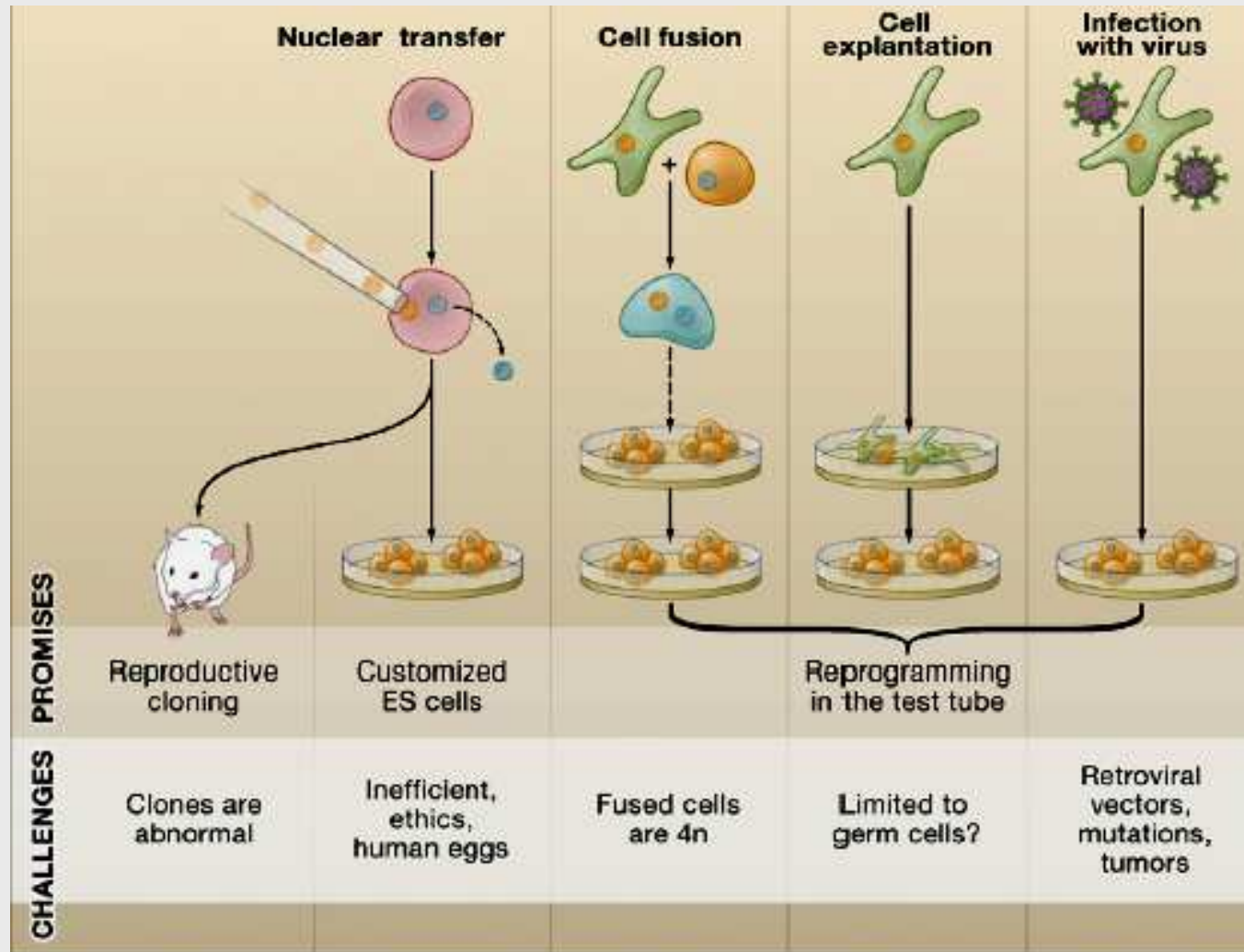
Trapianto di tessuto bioingegnerizzato

Leor et al., Circulation, 2000

Cellule iPS

Induced Pluripotent Stem

Quattro strategie per riprogrammare le cellule somatiche



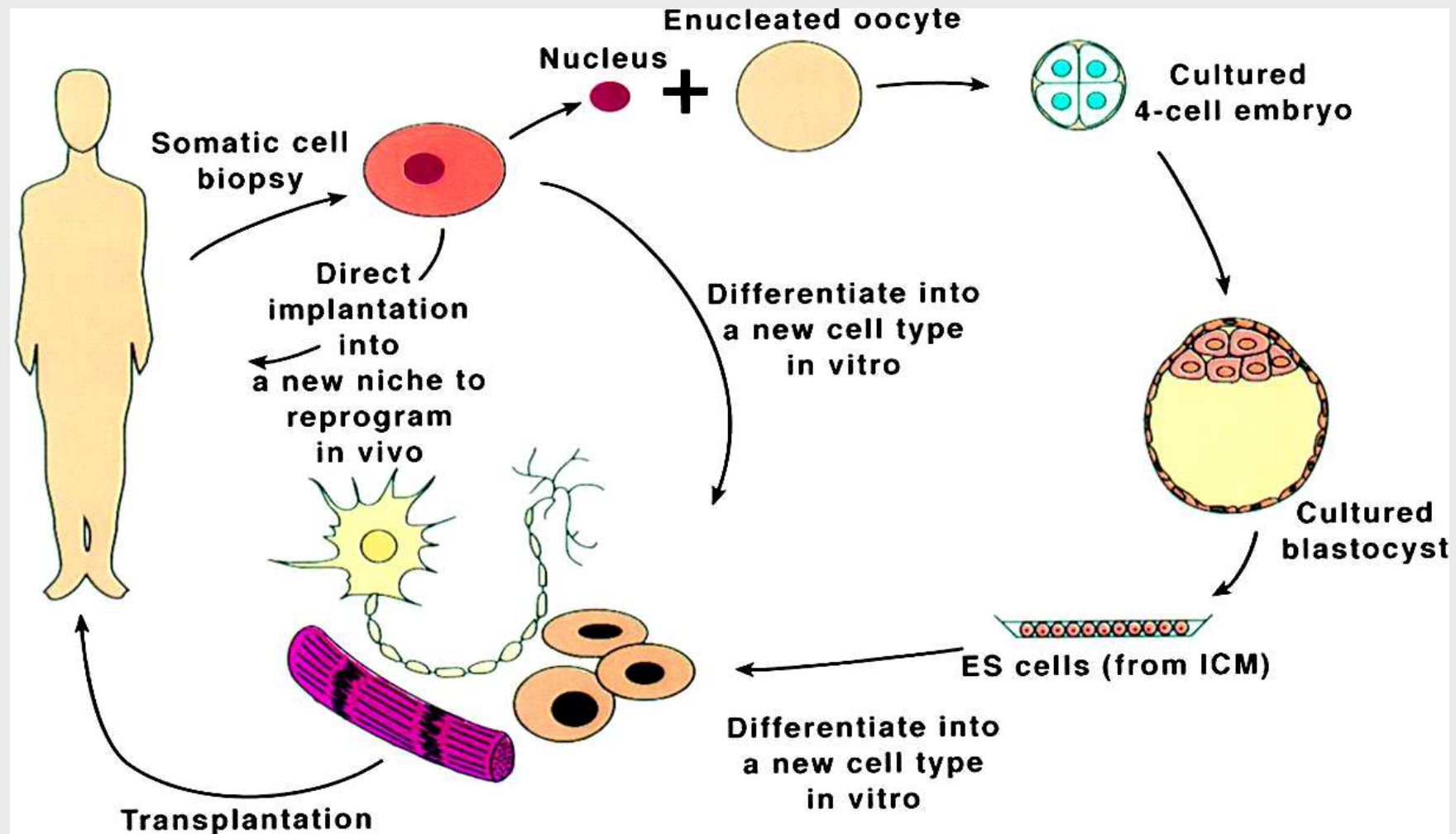
Cellule staminali (problemi)

- 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 (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, ..



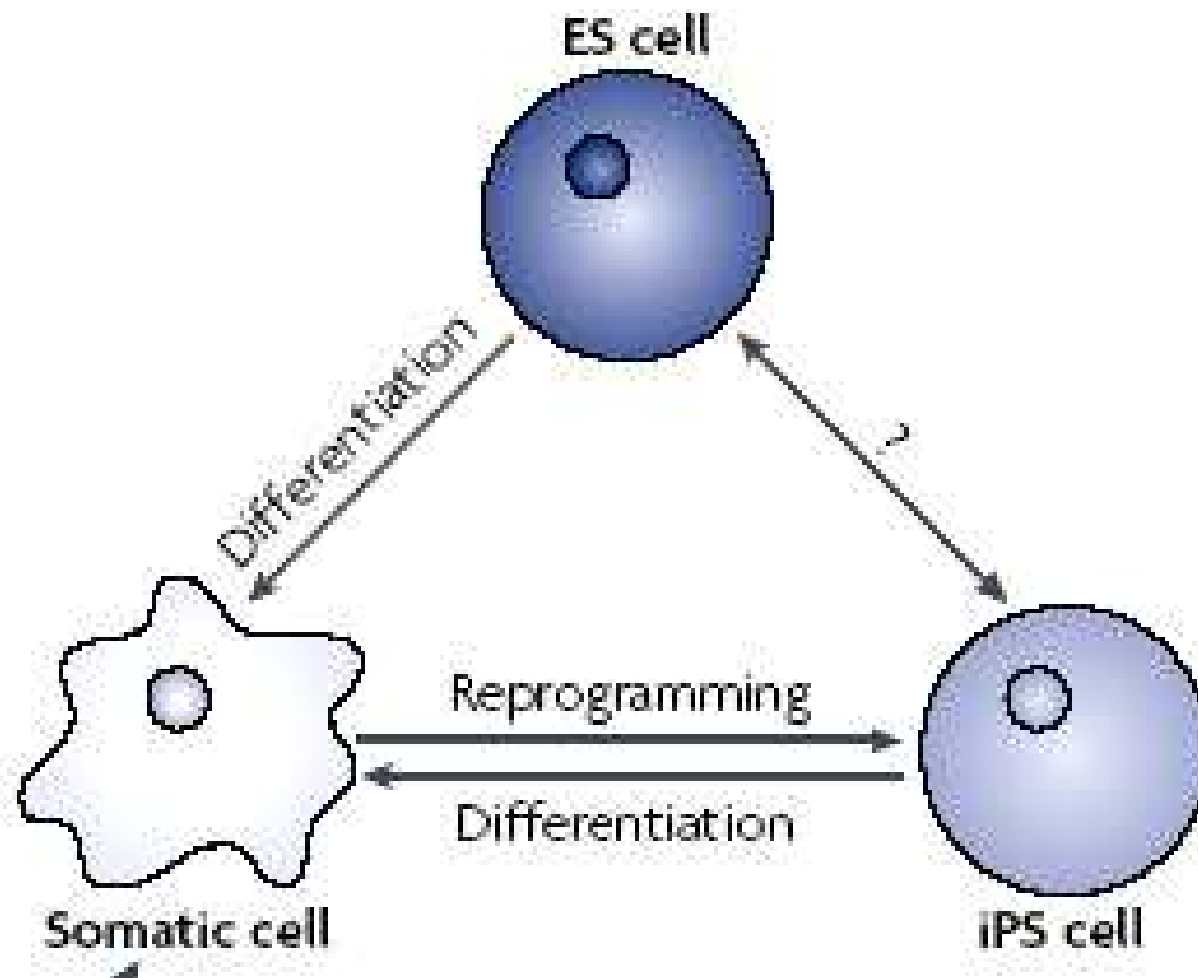
Nature, 23 luglio 1998

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 TRANSDIFFERENZIAZIONE
concetto di RIPROGRAMMAZIONE

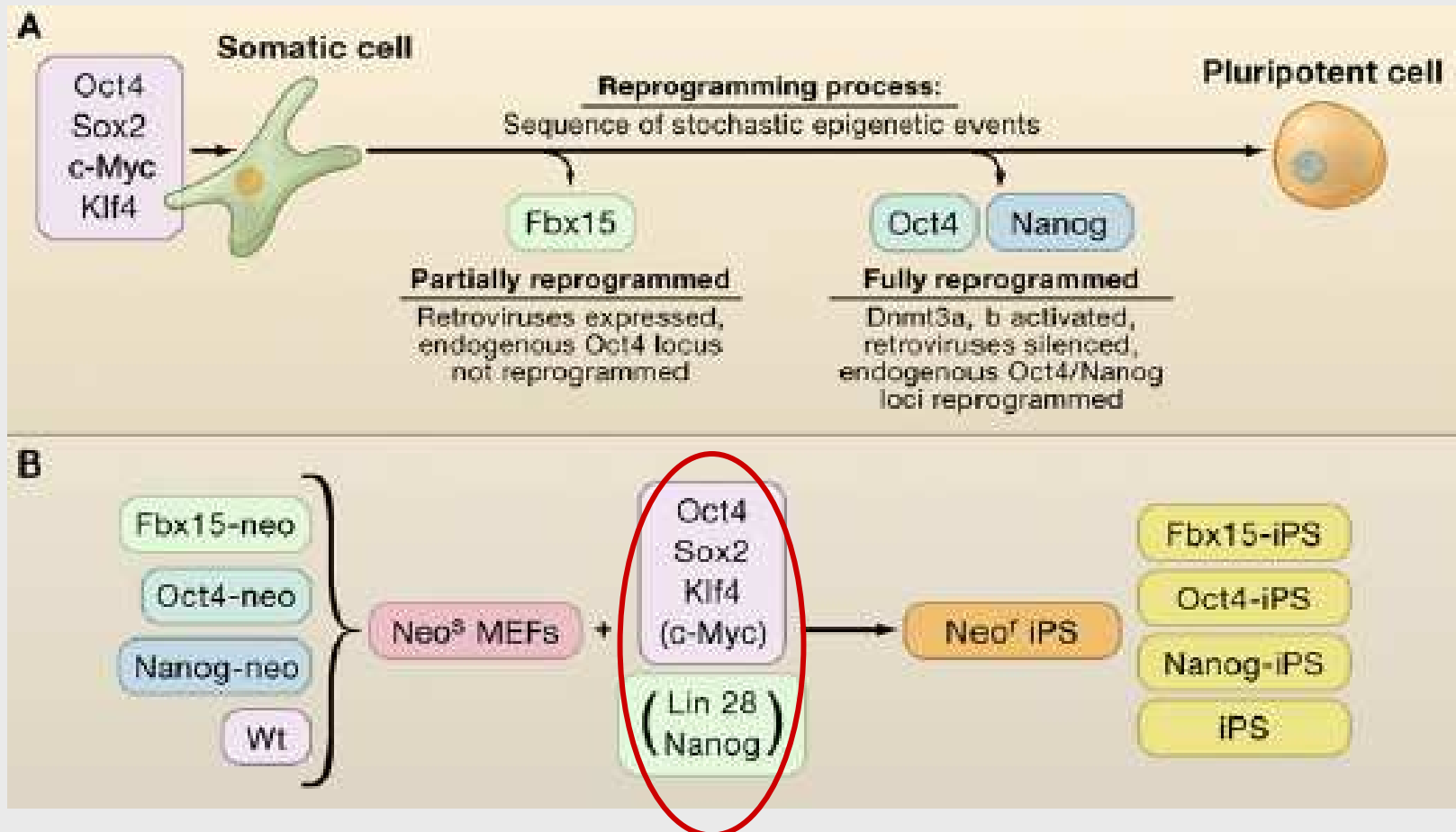
Induzione di cellule staminali pluripotenti (iPS)



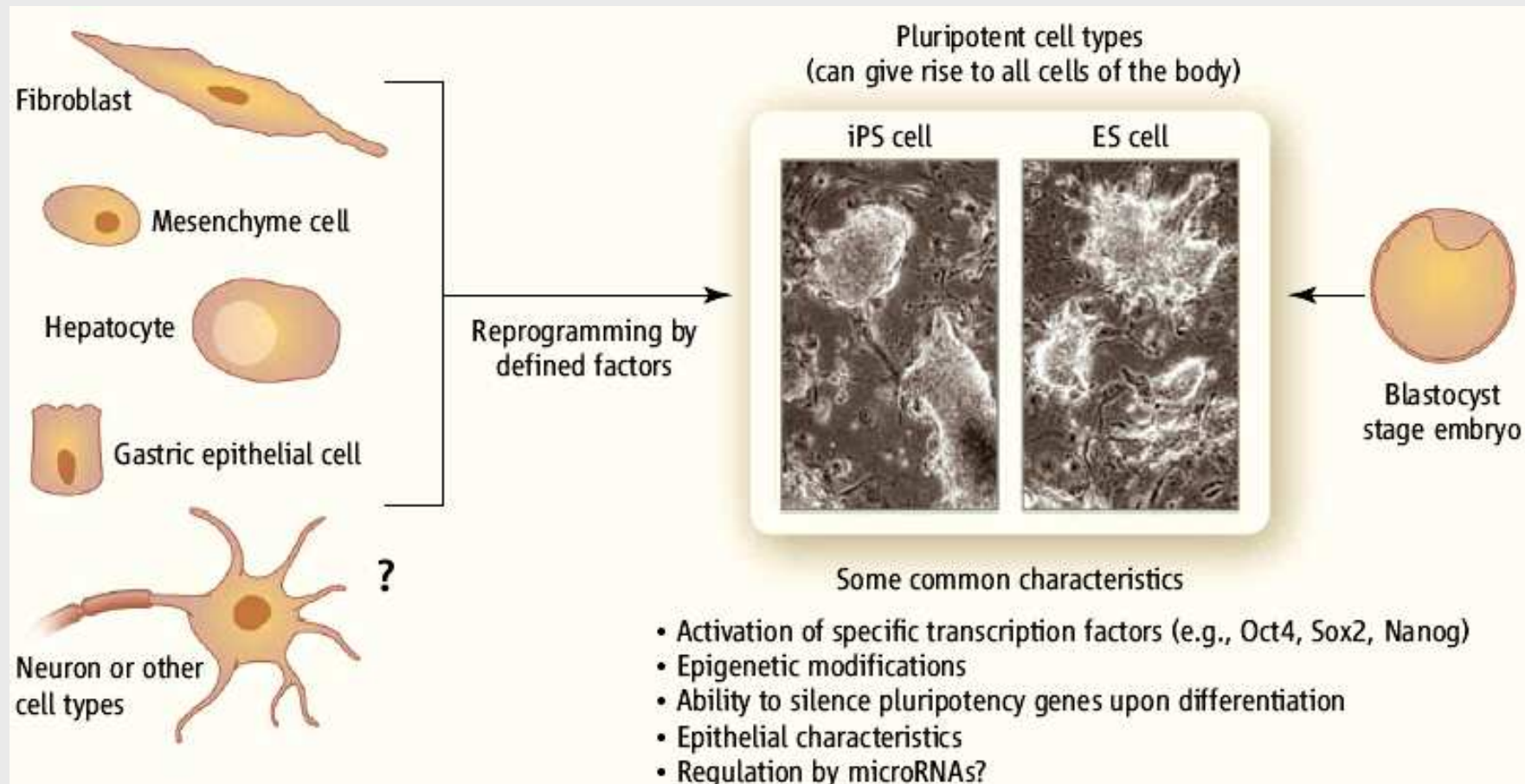
Basi teoriche

- 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**

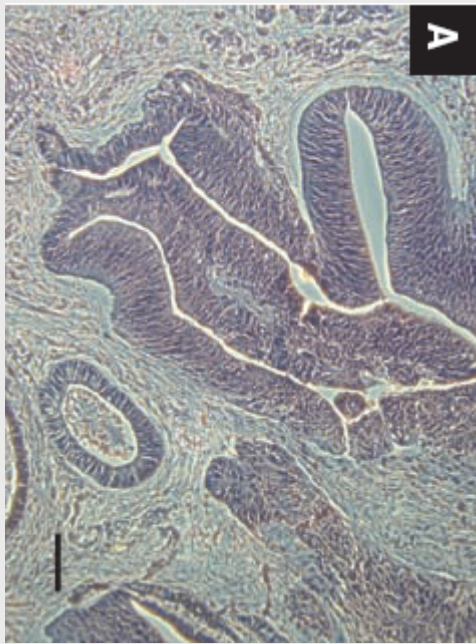
Riprogrammazione di cellule somatiche a uno stato pluripotente (2-4 fattori necessari e sufficienti)



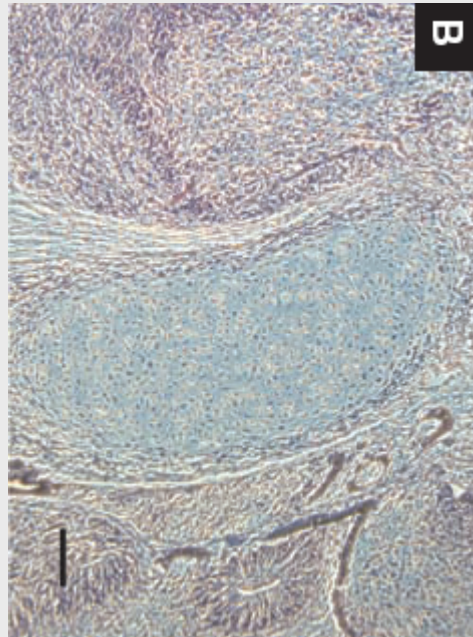
Induced-Pluripotent Stem Cells (iPSC)



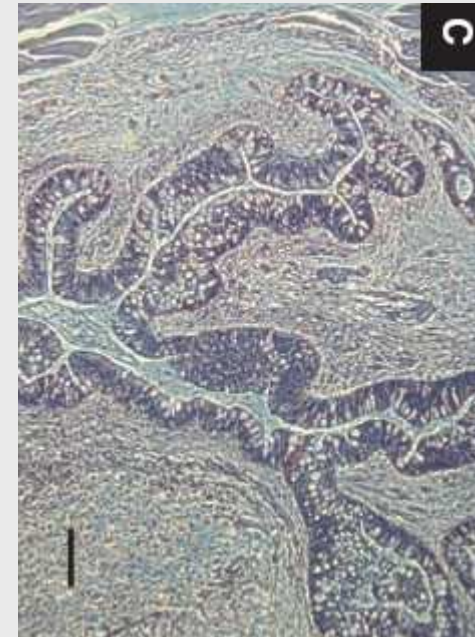
Pluripotenza delle cellule iPS umane (IMR90)



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

Generation of eX vivo-vascularized Muscle Engineered Tissue (X-MET)

Silvia Carosio^{1*}, Laura Barberi^{1*}, Emanuele Rizzuto², Carmine Nicoletti¹, Zaccaria Del Prete^{2,3}
& Antonio Musarò^{1,3}

Received
3 December 2012

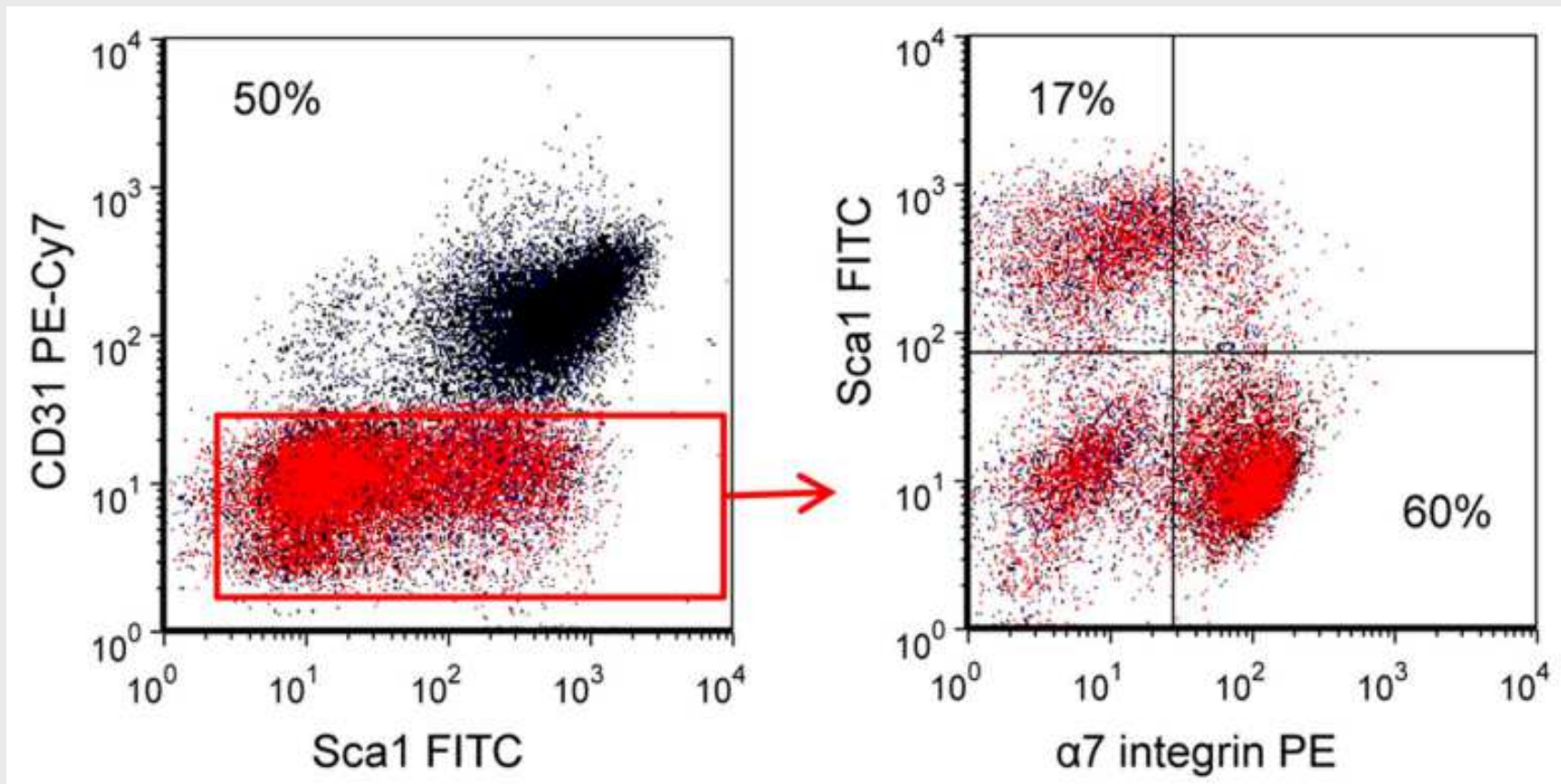
Accepted
25 February 2013

Published
12 March 2013

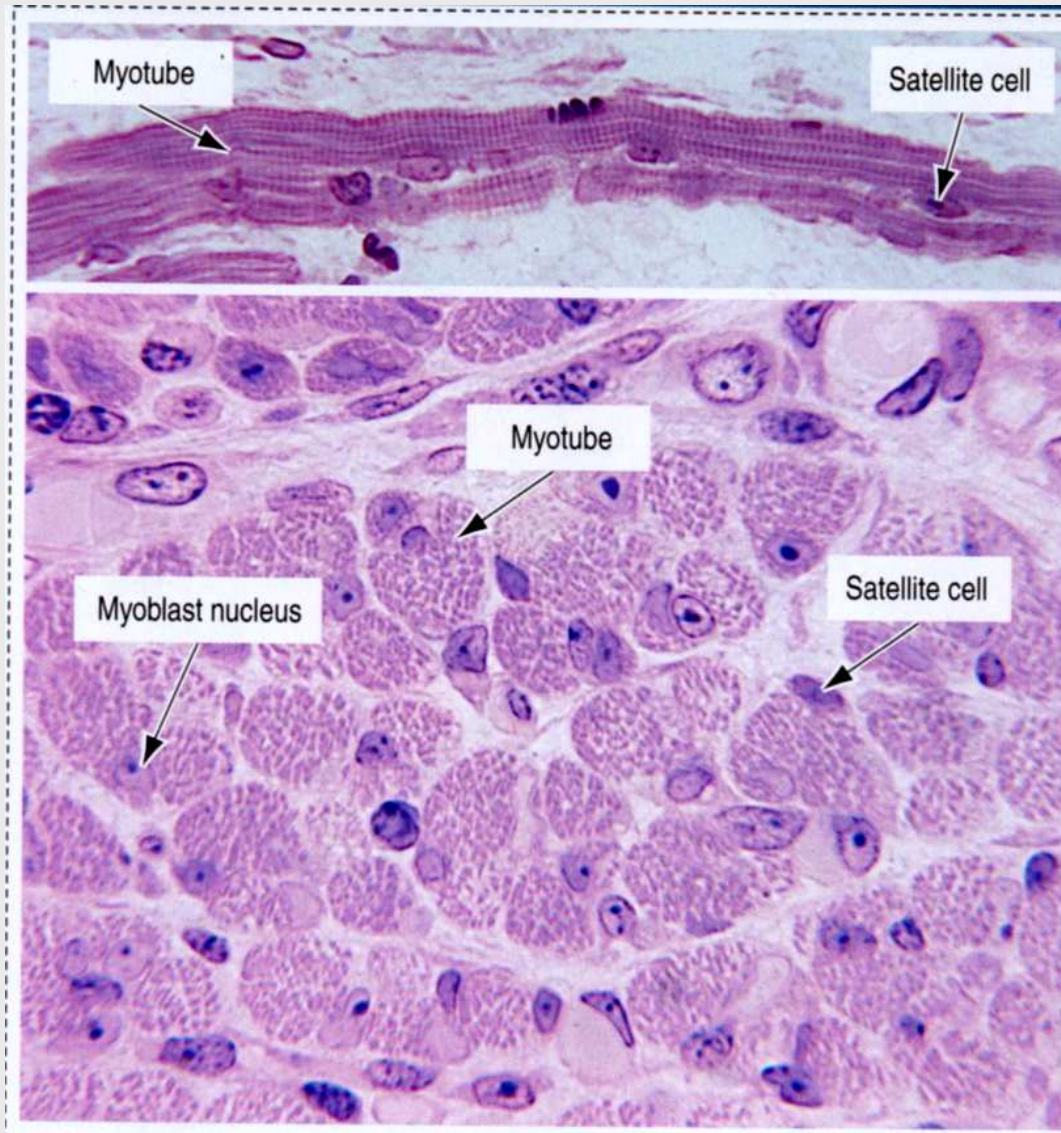


The object of this study was to develop an *in vitro* bioengineered three-dimensional vascularized skeletal muscle tissue, named eX-vivo Muscle Engineered Tissue (X-MET). This new tissue contains cells that exhibit the characteristics of differentiated myotubes, with organized contractile machinery, undifferentiated cells, and vascular cells capable of forming "vessel-like" networks. X-MET showed biomechanical properties comparable with that of adult skeletal muscles; thus it more closely mimics the cellular complexity typical of *in vivo* muscle tissue than myogenic cells cultured in standard monolayer conditions. Transplanted X-MET was able to mimic the activity of the excised EDL muscle, restoring the functionality of the damaged muscle. Our results suggest that X-MET is an ideal *in vitro* 3D muscle model that can be employed to repair muscle defects *in vivo* and to perform *in vitro* studies, limiting the use of live animals.

Analisi delle popolazioni cellulari



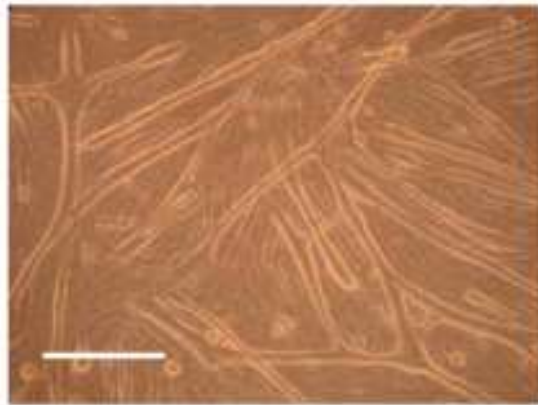
La cellula
satellite
è
la cellula
staminale
del muscolo
scheletrico



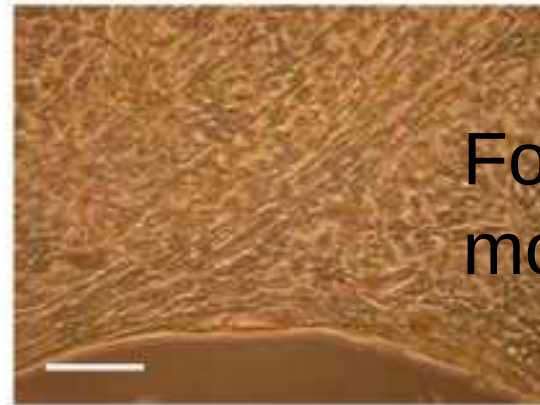
Formazione di X-MET e caratterizzazione delle popolazioni cellulari coinvolte

Cellule satelliti + fibroblasti su feeder fibroblasti

b

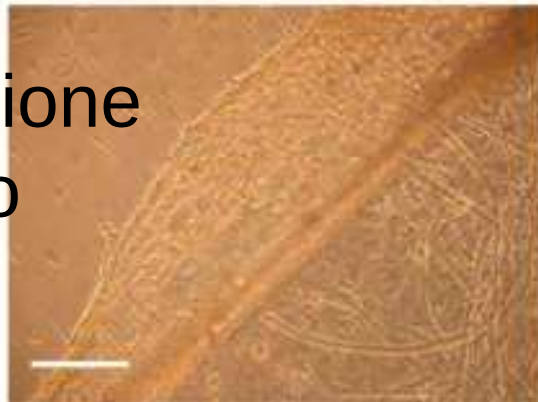


c



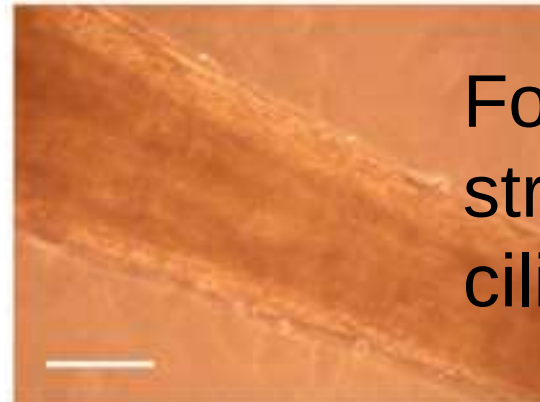
Formazione monostrato

d



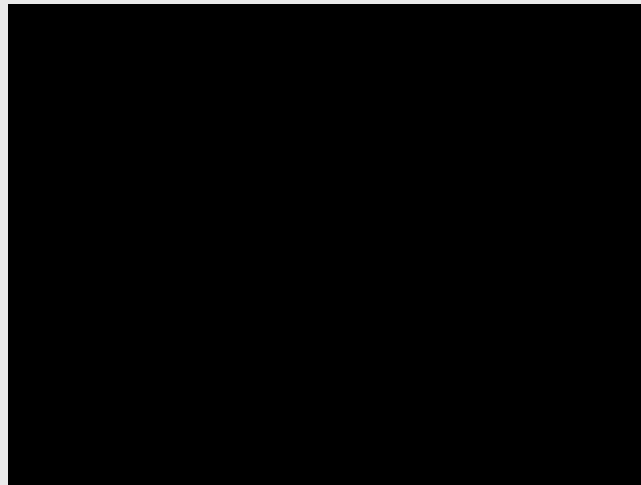
Delaminazione monostrato

e

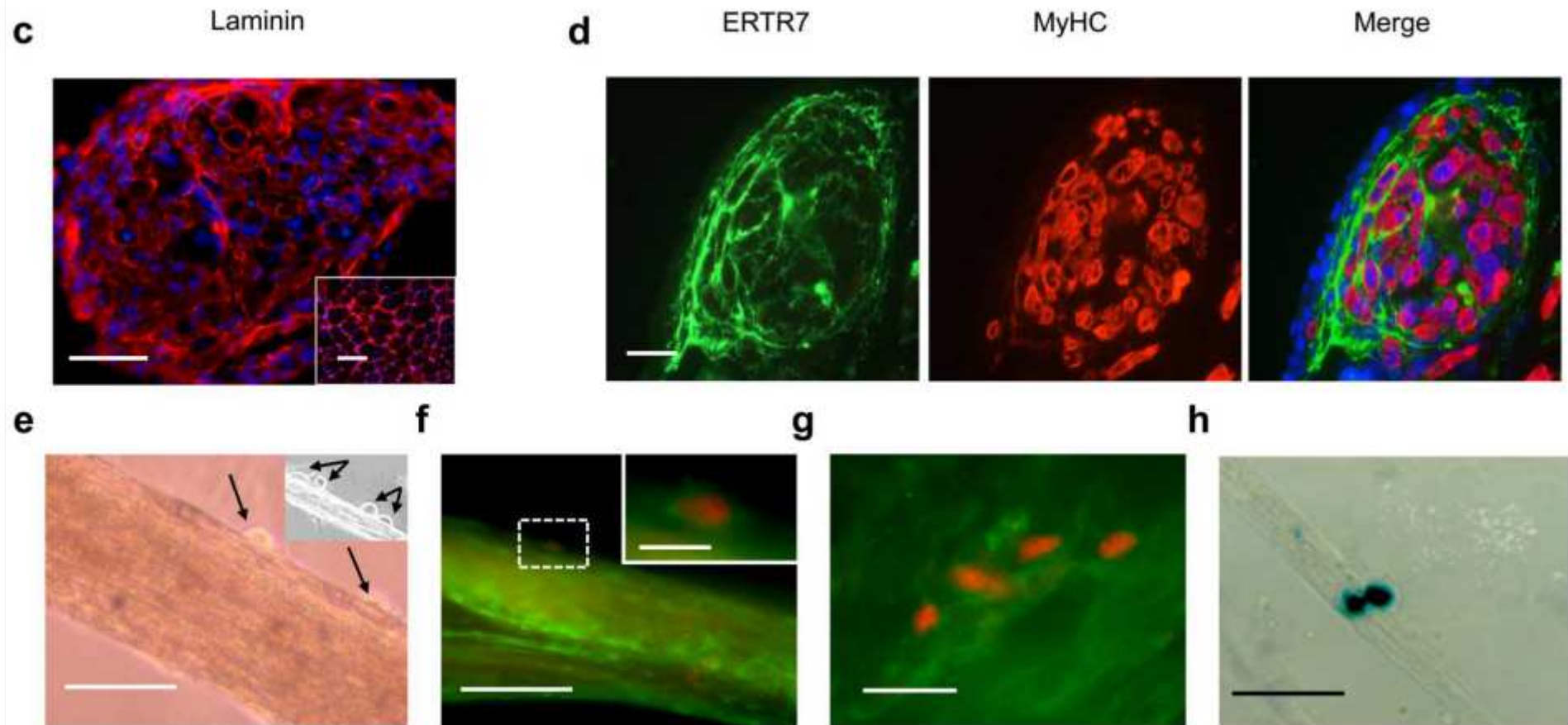


Formazione struttura cilindrica

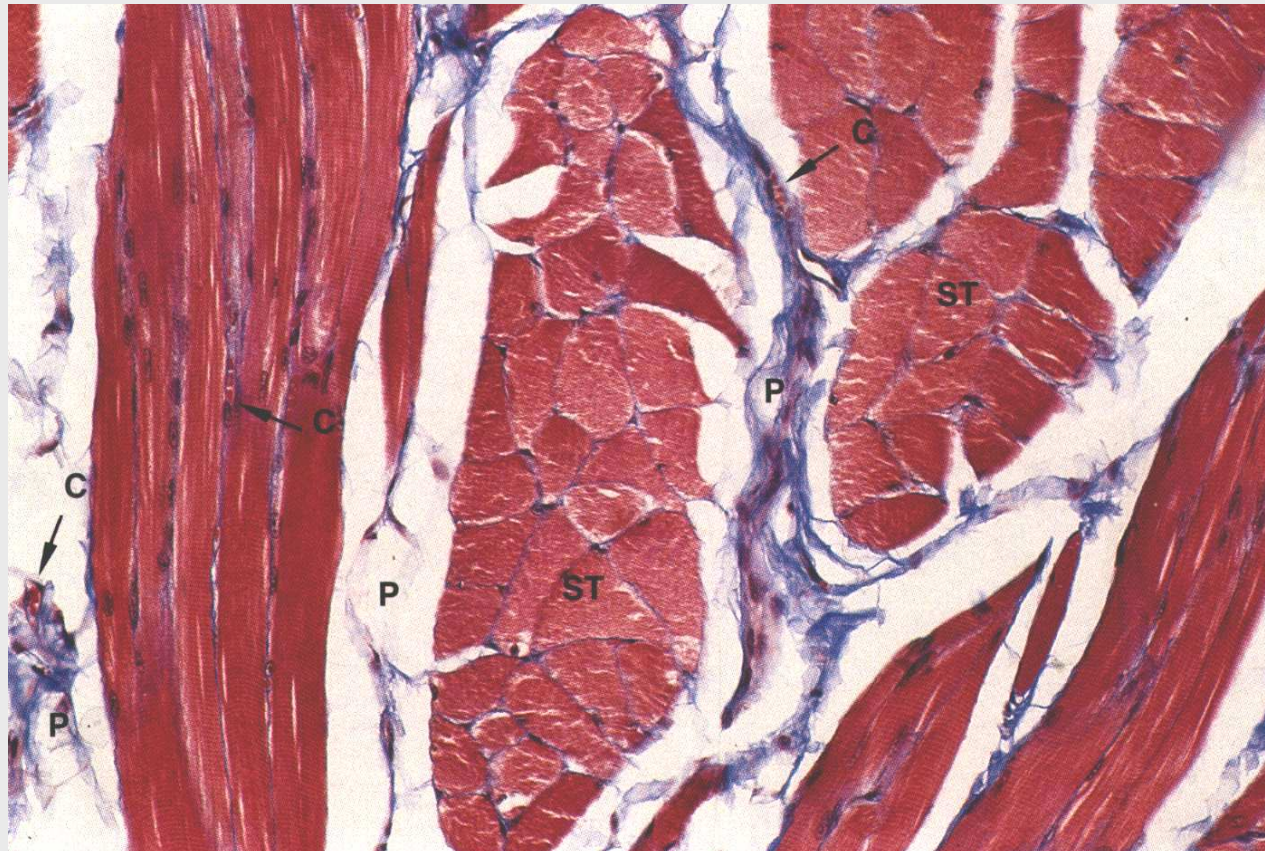
La struttura cilindrica batte (video)



Caratterizzazione di X-MET a 10 gg

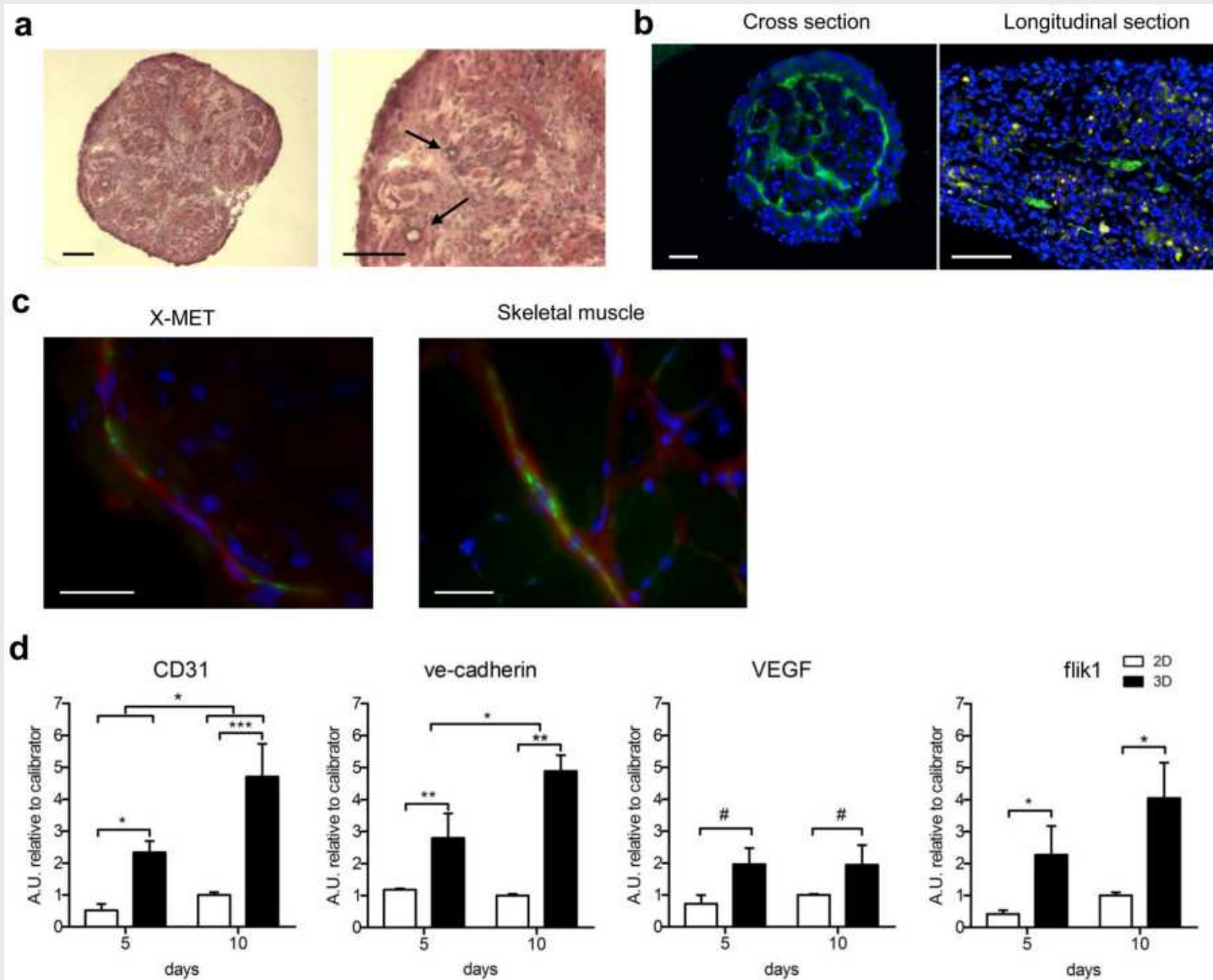


Tessuto muscolare scheletrico

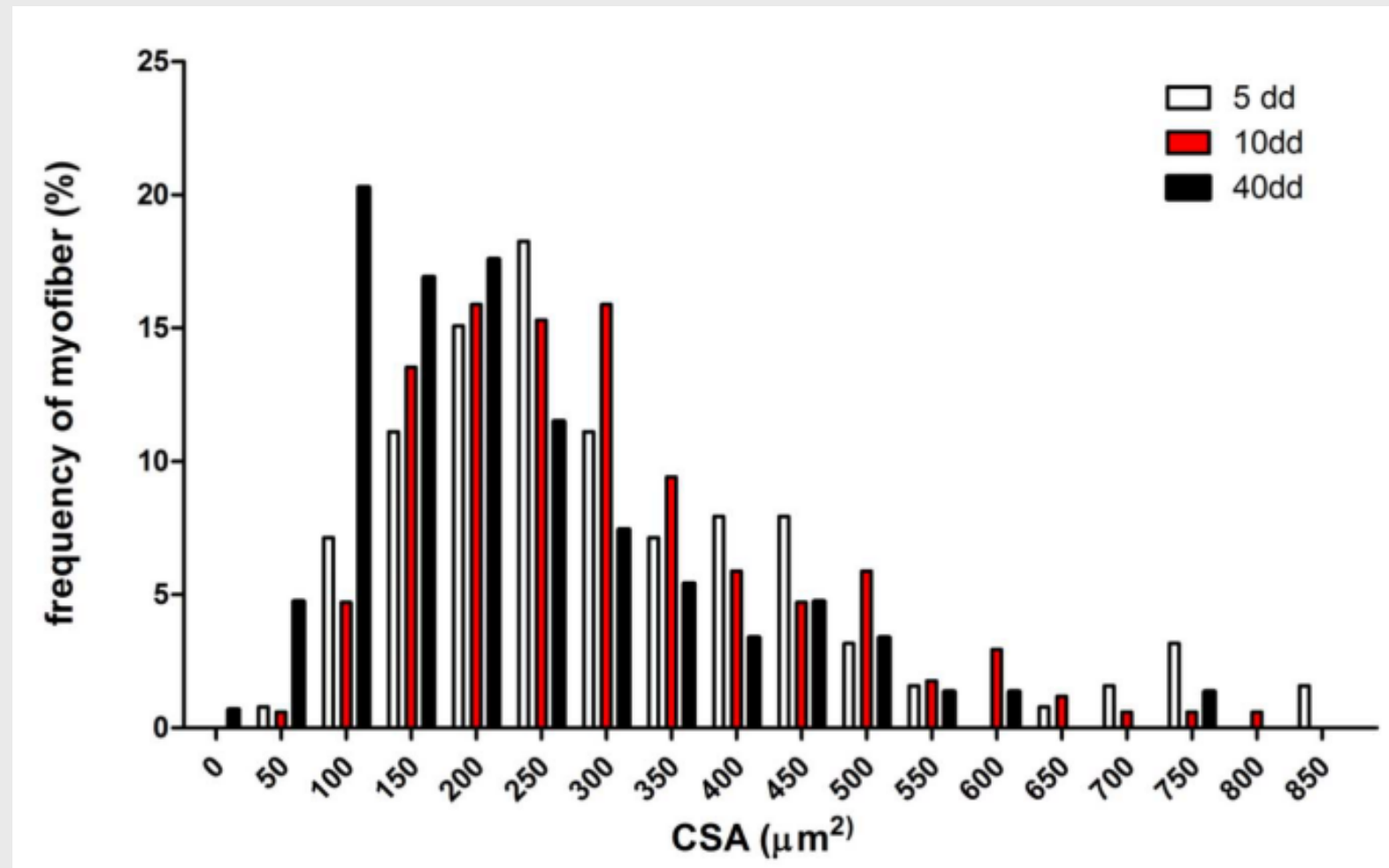


Diversi tipi cellulari: fibre muscolari, cellule dei vasi sanguigni, cellule del tessuto connettivo di supporto

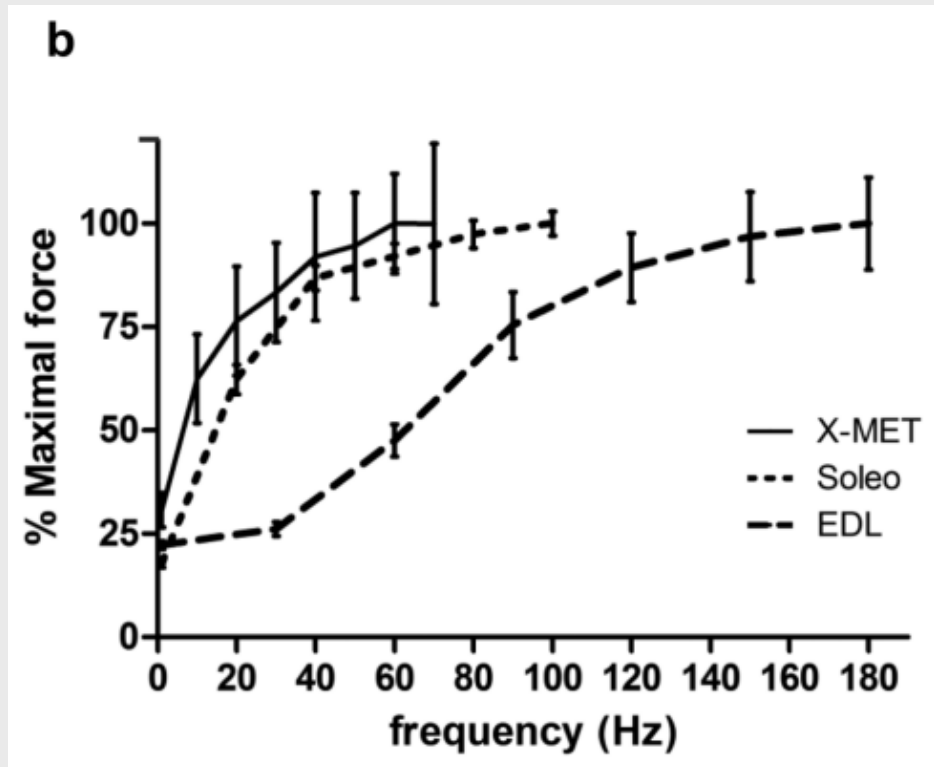
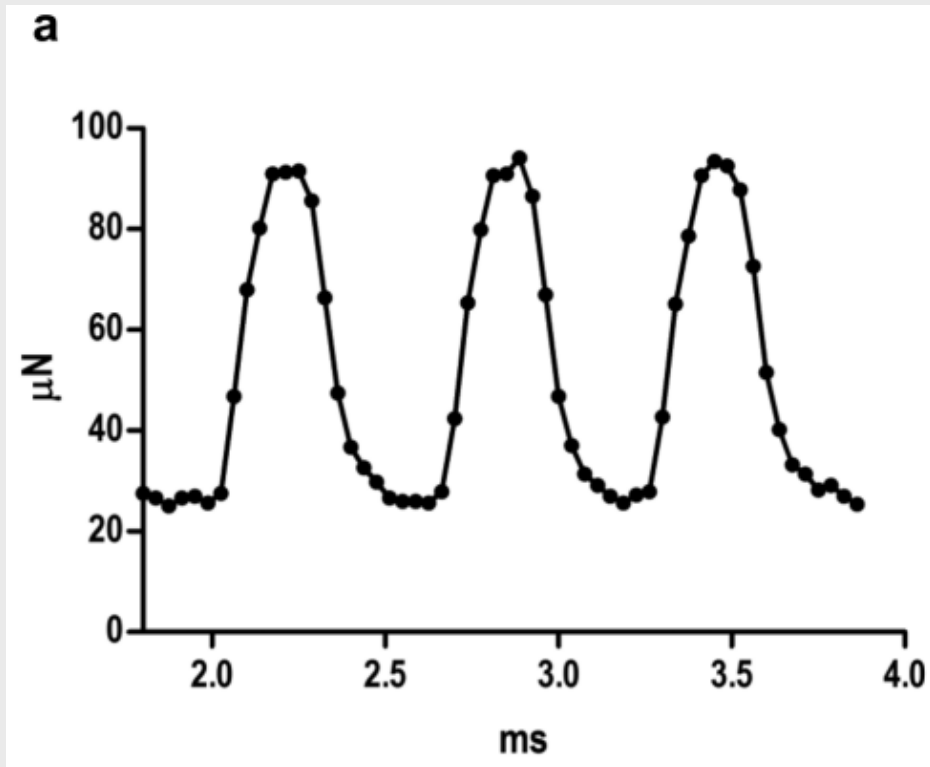
X-MET è vascolarizzato



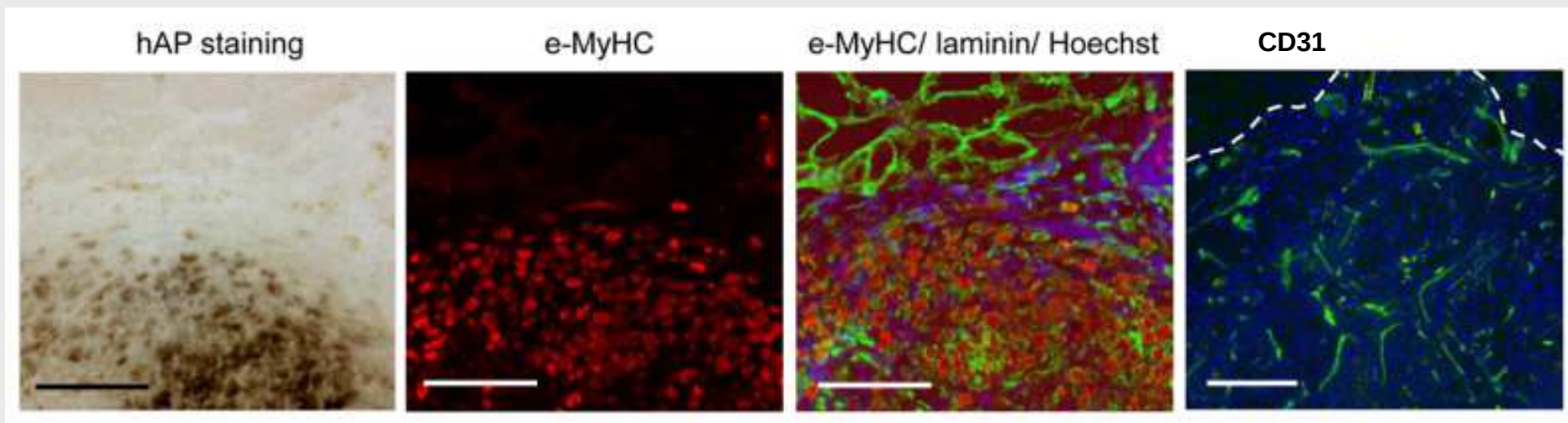
Analisi morfometrica



Funzionalità di X-MET



Analisi di X-MET trapiantato in vivo (m tibiale ant)



Espiantato ed analizzato dopo 2 settimane:
marcatori di staminalità, di muscolo, di vaso

X-MET trapiantato ridà funzionalità

