



Università Politecnica delle Marche - Facoltà di Medicina e Chirurgia
Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche

**STEM CELLS IN GYNECOLOGY:
FROM THE BASIS OF PATHOLOGY TO
ITS THERAPEUTIC APPROACH**

Dottorando:

Dott.ssa Alessandra Biagini

Relatore:

Chiar.mo Prof. Andrea Ciavattini

Correlatore:

Dott.ssa Monia Orciani

XV Ciclo

A.A. 2013/2016

INDICE

ABSTRACT.....	5
INTRODUZIONE.....	8
CELLULE STAMINALI.....	8
<u>Differenziamento cellulare.....</u>	9
<u>Fonti di cellule staminali totipotenti / pluripotenti.....</u>	12
Cellule Staminali Embrionali	
Cellule Staminali Fetali	
Cellule Staminali da tessuti Fetali Extraembrionari	
Cellule Staminali da linee cellulari disponibili commercialmente in vitro	
Cellule staminali ottenute da teratomi, teratocarcinomi, mole idatiformi e coriocarcinomi	
Induzione di Partenogenesi e/o Trasferimento di nucleo di cellule differenziate di adulto in un ovocito enucleato	
Trasferimento di nucleo di cellule differenziate di adulto in ovocito enucleato di altra specie	
Fusione di cellule embrionali ed adulte (cellule chimeriche)	
<u>Fonti di cellule staminali multipotenti/unipotenti.....</u>	20
Cellule Staminali Adulte	
Cellule Staminali Mesenchimali	
Cellule Staminali Ematopoietiche	
Cellule Staminali da cordone ombelicale	
Sangue periferico	
<u>Caratterizzazione.....</u>	26
Caratterizzazione immunofenotipica	

Caratterizzazione genotipica: principali geni coinvolti nel mantenimento della pluripotenza	
UTILIZZI DELLE CELLULE STAMINALI.....	31
<u>Attuali applicazioni.....</u>	32
Trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche	
Trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche	
Trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche del cordone ombelicale	
Trapianto di cellule staminali cutanee	
Autotrapianto	
Terapia genica	
<u>Problemi tecnici e rischi delle cellule staminali.....</u>	35
<u>Metodiche di conservazione.....</u>	36
<u>Le speranze della ricerca.....</u>	37
LIQUIDO AMNIOTICO.....	39
<u>Cellule staminali nel liquido amniotico.....</u>	41
APPROCCI DI MEDICINA RIGENERATIVA PER IL TRATTAMENTO DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE.....	44
<u>Malattie neurodegenerative.....</u>	44
MORBO DI PARKINSON.....	45
Epidemiologia	
Eziopatogenesi	
Fisiologia	
Neuropatologia	
Clinica	
Terapia	
Terapia farmacologica	
Terapia chirurgica: stimolazione cerebrale profonda	
MALATTIA DI ALZHEIMER.....	53
Epidemiologia	

Eziopatogenesi	
Neuropatologia	
Clinica	
Terapia	
MSC NELLA CURA DELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE.....	60
<u>Potenziali problemi.....</u>	62
OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	64
MATERIALI E METODI.....	65
<u>Amniocentesi.....</u>	65
Amniocentesi precocissima	
Amniocentesi precoce	
Amniocentesi tardiva	
Procedura d’esecuzione	
Precauzioni	
Problematiche	
<u>Isolamento e coltura di cellule staminali da liquido amniotico.....</u>	69
Terreno di coltura utilizzato	
Caratterizzazione della staminalità	
Analisi citofluorimetrica	
Funzionamento	
<u>Differenziamento adipogenico, osteogenico e condrogenico.....</u>	75
Differenziamento adipogenico	
Differenziamento osteogenico	
Differenziamento condrogenico	
<u>Differenziamento in senso neuronale.....</u>	77
Ottimizzazione delle condizioni dell’esperimento di co-coltura	
Co-coltura di AFMSC con cellule astrocitarie	
Isolamento mRNA e retrotrascrizione in cDNA	

<u>Caratterizzazione genotipica mediante Polymerase Chain Reaction Array (RT-PCR)</u>	80
PCR Array	
<u>Array Layout STEM CELLS</u>	85
<u>Array Layout NEUROGENESIS</u>	86
<u>Western Blot</u>	87
RISULTATI	90
<u>Isolamento e coltura di AFMSC</u>	90
<u>Caratterizzazione</u>	91
Analisi Citofluorimetrica	
Differenziamento osteogenico e condrogenico	
Differenziamento neuronale	
Differenziamento in senso neuronale e caratterizzazione genotipica mediante RT-PCR (PCR array)	
PCR array - staminalità	
Geni regolatori del ciclo cellulare	
Geni regolatori della divisione simmetrica e asimmetrica	
Markers di autorinnovamento	
Citochine e fattori di crescita	
Markers di differenziazione cellulare	
NOTCH e WNT pathway	
PCR Array – neurogenesi	
Differenziazione neuronale	
Funzione sinaptica	
Fattori di crescita e citochine	
Western Blot	
CONCLUSIONI	109
BIBLIOGRAFIA	114

ABSTRACT

Le cellule staminali mesenchimali derivate da liquido amniotico (AFMSC) sono ottime candidate per la terapia rigenerativa di patologie neurodegenerative grazie alle loro caratteristiche di facile isolabilità, staminalità e potenzialità immunomodulatrice.

In questo studio sono state analizzate e indotte a differenziamento in senso neuronale AFMSC isolate da 9 campioni di liquido amniotico raccolto nel secondo trimestre di gravidanza.

Le AFMSC sono state caratterizzate immunofenotipicamente e genotipicamente ed è stato valutato il loro potenziale differenziativo in senso osteogenico, condrogenico e adipogenico per definirne il carattere di staminalità. Le cellule isolate hanno soddisfatto tutti i criteri, dimostrando di essere cellule realmente staminali. Successivamente, è stato indotto il loro differenziamento in senso neuronale tramite co-coltura indiretta con cellule astrocitarie umane.

Durante la co-coltura, le AFMSC hanno avuto un progressivo rallentamento del tasso di proliferazione cellulare e comparsa di morfologia neurite-like, significativa di una risposta ai fattori secreti dalle cellule gliali della co-coltura.

L'analisi con RT-PCR (PCR Array) di AFMSC dopo co-coltura ha dimostrato notevoli variazioni di espressione dei geni regolatori del ciclo cellulare, della divisione simmetrica e asimmetrica, nei markers di autorinnovamento e di differenziazione cellulare, nelle citochine e nei fattori di crescita. Anche l'espressione dei geni coinvolti nella neurogenesi ha dimostrato notevoli variazioni dopo co-coltura con cellule della glia. I geni correlati all'autorinnovamento, invece, sono risultati inibiti.

Le AFMSC dopo co-coltura presentano infine un aumento dell'espressione proteica di Nestina e β -Tubulina III, markers dei progenitori neurali, mentre non è stata riscontrata l'espressione dei markers di espressione gliale GFAP e S100.

È possibile concludere che le AFMSCs sembrano rispondere al differenziamento neuronale, anche se ulteriori analisi di tipo elettrofisiologico saranno necessarie, ponendosi quindi come ottimi candidati per la terapia di patologie neurodegenerative.

ABSTRACT

Amniotic fluid mesenchymal stem cells (AFMSC) are great candidates for regenerative therapy of neurodegenerative diseases due to their extensive capability of self-renewal, differentiation in specialized cells, lack of ethical restriction and immunogenic potential.

In this study, we analyzed and induced to neuronal differentiation AFMSC isolated from 9 samples of amniotic fluid collected in the second trimester of pregnancy.

AFMSC have been characterized immunophenotypically and genotypically; to define AFMSC stemness characteristic osteogenic chondrogenic and adipogenic differentiative potential was assessed.

The cells isolated from amniotic fluid matched all the stemness criteria, proving to be stem cells. Subsequently, their neuronal differentiation was induced with an indirect co-culture with human astrocyte cells.

Co-cultured AFMSC had a gradual slowdown in cell proliferation rate and differentiate into neuron-like cells as a response to factors secreted by glial cells in co-culture.

RT-PCR (PCR Array) analysis of co-cultured AFMSC showed significant changes in expression of cell cycle regulators genes, in symmetric and asymmetric division, in self-renewal and cell differentiation markers, in cytokines and growth factors. The expression of neurogenesis-involved genes after co-culture with glial cells showed considerable variations too. The self-renewal related genes were reduced.

Co-cultured AFMSC showed an increased protein expression of Nestin and β -tubulin III, markers of neural progenitors and no expression of glial expression markers GFAP and S100.

In conclusion, AFMSC seem to respond to neuronal differentiation, although further electrophysiological analysis will be necessary; therefore, AFMSC are excellent candidates for neurodegenerative diseases therapy.

INTRODUZIONE

CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali (SC) sono precursori cellulari immaturi, non specializzati, dotati della capacità di auto rinnovamento e della grande potenzialità di differenziazione multilineare.

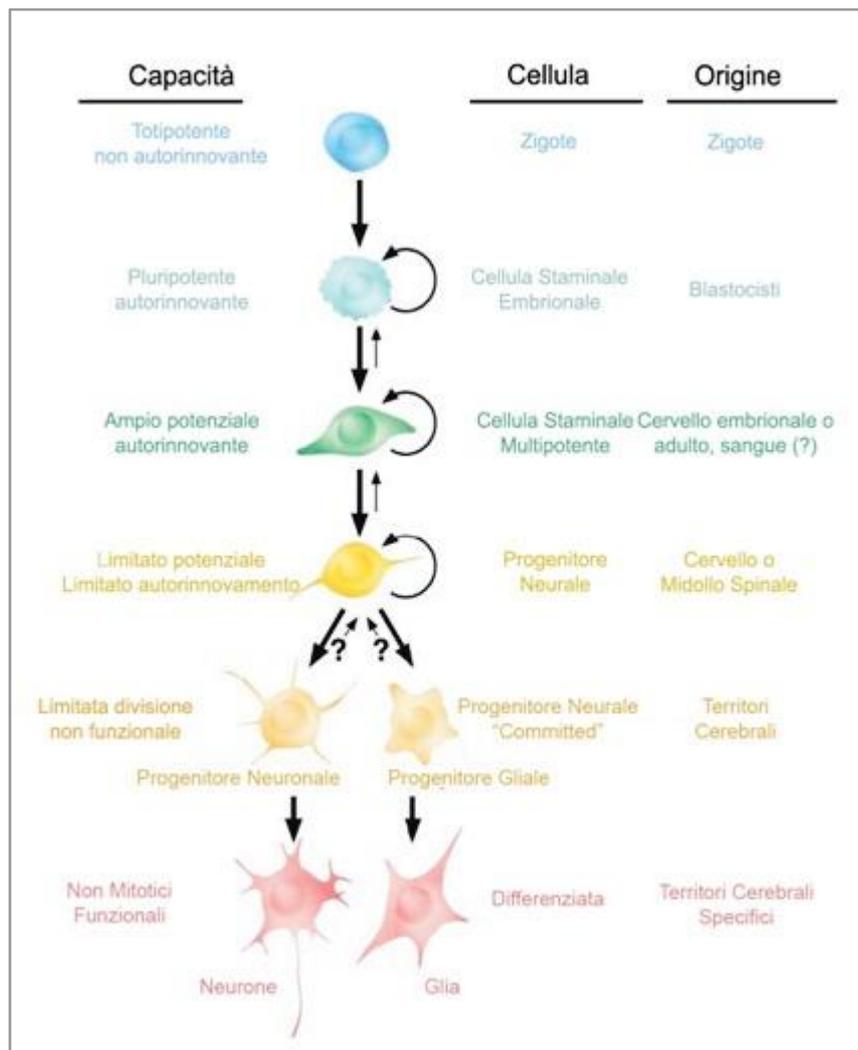
Ogni SC deve essere in grado di replicarsi in maniera asimmetrica generando ad ogni divisione due cellule: una che prosegue un percorso di differenziamento fino a maturare completamente perdendo la capacità replicativa e una che va a costituire una linea cellulare geneticamente uguale a se stessa, chiamata clone, che mantiene la capacità di rinnovamento.

Le SC, quale che sia la loro provenienza, possiedono identiche proprietà principali:

- Sono cellule indifferenziate, non specializzate, ma tramite replicazione asimmetrica possono dare origine a una progenie cellulare specifica destinata a differenziarsi;
- Sono in grado di replicarsi indefinitamente. Le SC sono dotate di long-term self renewal, sono cioè in grado di replicarsi per periodi indefiniti mantenendo lo stato indifferenziato;
- Possono differenziarsi irreversibilmente generando diversi tipi di cellule specializzate. Le SC, in seguito a particolari stimoli, sono in grado di originare uno o più tipi cellulari diversi. Quando danno origine a cellule non specializzate come le cellule progenitrici, si dice che queste possiedono la capacità di auto-rinnovamento o auto-mantenimento a lungo termine.

Differenziamento cellulare

Il differenziamento cellulare è il processo per cui le cellule di un organismo divengono diverse tra loro per aspetto e funzioni (1). Tale processo porta a una progressiva diminuzione delle potenzialità differenziative delle SC tramite un cambiamento stabile nell'attività dei geni, per dare origine a cellule con caratteristiche specifiche, come ad esempio la contrattilità per quelle cardiache o l'attività elettrica per quelle nervose (2).



L'acquisizione del differenziamento è di norma un processo a più passaggi ed è irreversibile, anche se vi sono delle eccezioni. Le cellule cancerose, infatti, perdono

alcuni aspetti terminali del differenziamento diventando morfologicamente poco riconoscibili; tali cellule perdono così funzionalità, mentre acquisiscono nuove capacità illimitate di proliferazione.

Le SC in base alla loro potenzialità differenziativa sono classicamente suddivise in **Cellule Staminali Totipotenti, Pluripotenti, Multipotenti e Unipotenti**

Le **SC totipotenti** sono in grado di differenziare in tessuti sia embrionali che extraembrionali. Queste cellule derivano da embrioni allo stadio di blastocisti.

Dopo 1-3 giorni dalla fecondazione lo zigote si divide ripetutamente per mitosi, dando origine a cellule sempre più piccole, chiamate blastomeri.

Nelle fasi successive dello sviluppo circa 4-14 giorni dopo la fecondazione, i blastomeri si segmentano ripetutamente formando la morula, struttura cellulare composta da 8-16 cellule. Allo stadio di 16-32 cellule nella morula si forma una cavità, detta blastocele: da questo momento l'embrione viene chiamato blastocisti ed è formato da 32-64 cellule.

Successivamente allo stadio di blastocisti, le cellule sono **SC Pluripotenti**.

In queste fasi le cellule totipotenti si differenziano nei tre foglietti embrionali: l'ectoderma, che darà origine all'epidermide con i suoi annessi (capelli, peli, unghie, ghiandole sebacee e sudoripare), ad alcune mucose, al sistema nervoso, all'orecchio e all'occhio; il mesoderma, da cui si formeranno il tessuto connettivo, il tessuto muscolo-scheletrico e cardiaco, il sangue, i vasi linfatici, i reni, le ghiandole sessuali, e le vie genitali, etc e l'endoderma da cui si sviluppano intestino, polmoni e parte delle vie urinarie.

Sono cellule staminali pluripotenti anche le **SC Germinali**. Nell'embrione post-impianto e poi nel feto, infatti, 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 alla 3° settimana di sviluppo. Se isolate,

queste cellule sono in grado di replicarsi illimitatamente in vitro mantenendo capacità differenziative pluripotenti al pari delle cellule staminali embrionali

Dal 2006, inoltre, sono state sviluppate in laboratorio le **SC Pluripotenti Indotte** (iPS). In natura solo le cellule staminali embrionali sono pluripotenti, le iPS sono cellule cresciute in laboratorio e catalogabili come “cellule staminali embrionali surrogate” in quanto simili, ma non identiche, alle cellule embrionali e come loro dotate di pluripotenza pur essendo generate da cellule specializzate adulte che fisiologicamente non contengono elementi cellulari pluripotenti. Le iPS sono generate artificialmente a partire da una cellula somatica adulta mediante l'introduzione di quattro geni specifici codificanti determinati fattori di trascrizione che ne inducono la conversione.

Cellule con la capacità di moltiplicarsi e di mantenersi in coltura, ma non di rinnovarsi in modo illimitato sono invece classificate come **SC Multipotenti**. Tali cellule differenziano in tessuti diversi, ma appartenenti allo stesso foglietto embrionale. Appartengono a tale categoria le cellule staminali adulte. La loro funzione è quella di sostituire le cellule differenziate che vengono perse attraverso fenomeni di deplezione o a causa di danneggiamenti cellulari.

Nella fase terminale della differenziazione, le cellule pluripotenti si differenziano in cellule unipotenti completamente differenziate.

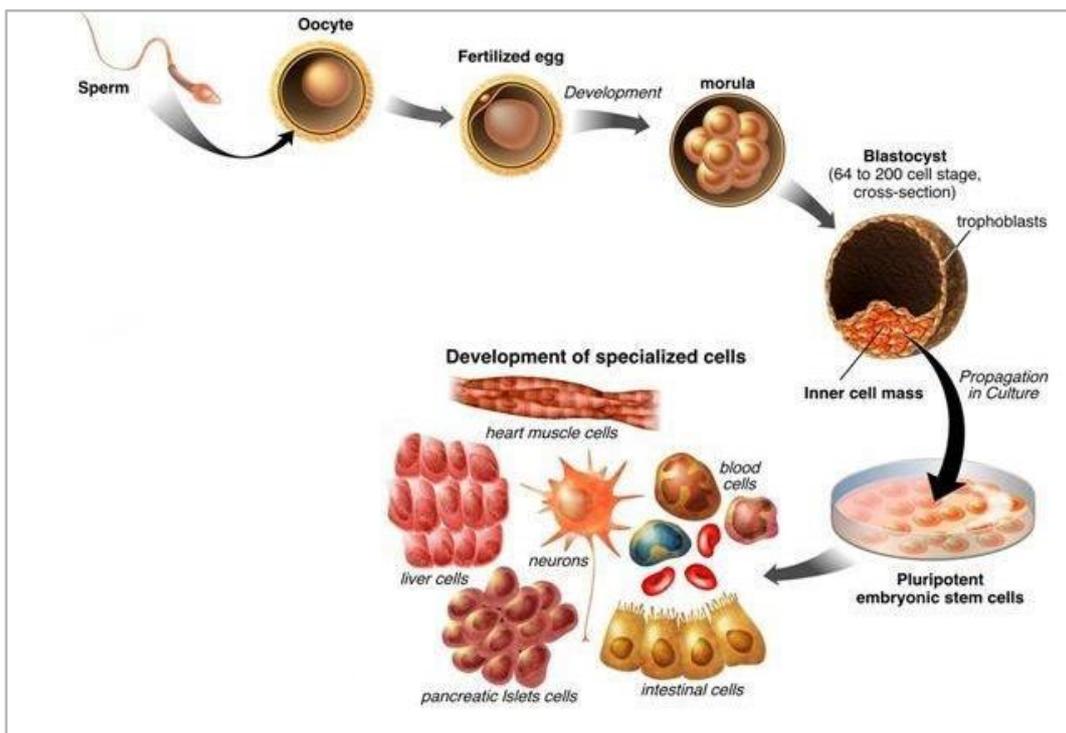
Le **SC Unipotenti** sono presenti nei tessuti adulti e sono potenzialmente più limitate nonché organo-specifiche. Tali cellule hanno la capacità di auto-rinnovarsi e di differenziare unicamente nel tipo cellulare del tessuto di appartenenza, assicurandone la riparazione ed il mantenimento.

La multipotenzialità dei compartimenti rigenerativi intratissutali viene conservata nell'individuo adulto dalle cellule staminali adulte con un potenziale di staminalità che assicura il rinnovamento dei vari tessuti specializzati.

Fonti di cellule staminali totipotenti/pluripotenti

Cellule Staminali Embrionali

Al termine dello sviluppo embrionale, per il breve tempo che precede la gastrulazione, le cellule della massa cellulare interna (IMS) dalle quali originerà l'embrione, sono totipotenti e sotto stimoli adeguati possono moltiplicarsi sino a formare delle colonie di cellule staminali embrionali (ESC).



Per molti anni le difficoltà incontrate nel prelievo di embrioni in fase di peri-impianto hanno limitato lo studio delle interazioni cellulari che intercorrono durante gli stadi iniziali di sviluppo nei mammiferi. Le tecniche in vitro, perciò, furono sviluppate per aggirare questo problema.

Le proprietà delle ESC le identificano come altamente adatte per generare specifiche linee cellulari in vitro (3). Tali cellule, infatti, possono propagare indefinitamente in uno stato indifferenziato, mantenendo la capacità di differenziarsi in fenotipi somatici qualora indotte da appropriati segnali. Le ESC hanno inoltre dimostrato di poter

contribuire a tutte le linee cellulari, inclusa la linea germinale, se incorporate in chimere con embrioni di topo intatti (4; 5). Da poco più di una decina di cellule isolate e poste in coltura, in pochi giorni se ne possono ottenere migliaia. Queste cellule, se mantenute in condizioni ottimali, continuano a proliferare rimanendo indifferenziate e conservando inalterate le loro caratteristiche di plasticità e totipotenza; se invece le condizioni di coltura verranno modificate, tenderanno a differenziarsi spontaneamente.

La capacità delle ESC di differenziarsi in numerosi tipi cellulari, se sottoposte a specifiche condizioni di coltura, è la loro proprietà più interessante ai fini di possibili sviluppi terapeutici.

ESC murine vennero inizialmente isolate più di 30 anni fa da cellule della IMS di una blastocisti e cresciute in vitro (6; 7). Negli anni sono stati messi a punto particolari metodiche in vitro che guidano il differenziamento delle cellule ESC in specifici tipi cellulari per generare cellule epiteliali, muscolari, nervose, epatiche, pancreatiche, cardiache, osteoblasti, adipociti e progenitori ematopoietici (8; 9; 10).

Cellule totipotenti umane possono essere ottenute da blastocisti di embrioni congelati in vari stadi di sviluppo, provenienti da tecniche di concepimento in vitro (11). Tali cellule sono ottenute a mezzo di coltura e ricavate dalla IMC di una blastocisti, tra il 5° ed il 14° giorno dalla fecondazione, prima del loro impianto in utero.

Individualmente queste cellule sono in grado di dare origine a cellule germinali e a tipi cellulari appartenenti ai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma, endoderma), sia *in vivo* che in vitro mediante appropriate condizioni di coltura.

La principale applicazione potenziale della tecnologia delle cellule staminali ES umane è rivolta allo studio dello sviluppo embrionale ed a quello della scoperta di nuovi farmaci.

Oltre alle difficoltà tecniche relative alla raccolta delle ESC, uno dei problemi di più difficile risoluzione è legato alla straordinaria capacità proliferativa di queste cellule che *in vivo* possono formare tumori o differenziarsi in tipi cellulari non desiderati,

mentre in vitro è possibile dirigere la differenziazione delle ES verso uno specifico tipo cellulare. Altra principale limitazione al loro utilizzo è l'immunità nell'allograft. Gli allograft (trapianti di tessuti provenienti da un altro organismo) possono essere rigettati attraverso una reazione immunitaria cellulo-mediata o umorale del ricevente contro gli antigeni di istocompatibilità presenti sulle membrane delle cellule ES donate. Non da ultimo annoveriamo tra le difficoltà maggiormente riscontrate in corso di utilizzo di ES gli aspetti etico-giuridici che riguardano questo ramo della ricerca scientifica in quanto ad oggi l'ottenimento di una cellula staminale embrionale comporta la distruzione dell'embrione stesso (12; 13).

Cellule Staminali Fetali

Le cellule staminali fetali (FSC) sono derivate da aborti spontanei o volontari. Si tratta di materiale cadaverico e il suo utilizzo equivale all'utilizzo di organi da cadaveri; non si pone pertanto il problema etico. Le FSC si trovano negli stadi tardivi dell'embrione e nel feto, sono generalmente pluripotenti e deputate all'accrescimento perinatale dei tessuti. Dal punto di vista biologico, le FSC possiedono caratteristiche intermedie tra quelle embrionali e quelle adulte: hanno una proliferazione elevata come le staminali embrionali ma presentano un minore potenziale tumorigenico (14).

Cellule Staminali da tessuti Fetali Extraembrionari

Le cellule staminali da tessuti fetali extraembrionari (EFSC) comprendono l'ectoderma extraembrionario, il liquido amniotico ed il sangue fetale e sono recuperabili dal trofoblasto fetale post impianto ed ottenibili da aborti spontanei precoci o nel post partum.

Queste SC offrono molti vantaggi rispetto ad entrambe le fonti di cellule staminali embrionali e adulte; infatti i tessuti extraembrionari vengono scartati al momento del

parto, rendendo la raccolta delle EFSC scevra da qualsivoglia problematica etica. Inoltre, la natura extracorporea di queste fonti di EFSC ne facilita l'isolamento, eliminando il rischio per il paziente come nel caso delle cellule staminali adulte; anche il volume relativamente grande di tessuti extraembrionali a disposizione ne facilita la manipolazione e aumenta teoricamente il numero di SC che possono essere isolate (15).

Il prototipo del tessuto extraembrionario da cui isolare EFSC è il sangue cordonale. Le ESCF di sangue del cordone ombelicale sono state ampiamente studiate dimostrando la loro utilità clinica.

Negli anni è stato anche dimostrato che le ESCF possono essere individuate nel sangue materno già nel primo trimestre di gravidanza (16; 17; 18). La trasfusione feto-materna di tali cellule è incrementata da patologie quali preeclampsia, idrope fetale ed altre anomalie citogenetiche fetali in cui si formano trombi intervillosi (19). Tali cellule staminali inoltre rimangono in circolo nelle madri anche dopo l'interruzione della gravidanza o dopo il normale parto (20).

Le ESCF hanno livelli di espressione elevati e stabili e il loro recupero può essere ottenuto tra l'8° e la 14° settimana gestazionale, diventando potenzialmente utilizzabili per la terapia genica fetale (21). Questo isolamento di cellule fetali dal sangue materno rappresenta una fonte di cromosomi fetali o di DNA ottenuti in modo non invasivo per via venosa materna. Tale test può essere utilizzato come screening primario, screening secondario per ridurre il tasso di falsi-positivi di test primari e quindi rappresentare un'alternativa alle diagnosi prenatali invasive, oppure può essere utilizzato come test diagnostico (22; 23).

Le ESCF sono state isolate anche dal liquido amniotico umano (24) e nell'epitelio delle membrane amniotiche (25; 26) aprendo nuove strade nel campo della ricerca sulle cellule staminali. Le cellule staminali del liquido amniotico, infatti, hanno dimostrato di potersi differenziare in cellule di tutti e tre i foglietti germinativi embrionali. Queste

SC non formano tumori *in vivo* e non sollevano le preoccupazioni etiche connesse con le cellule staminali embrionali umane (27).

Cellule Staminali da linee cellulari disponibili commercialmente in vitro

Le cellule staminali embrionali possono essere coltivate in laboratorio, riuscendo a moltiplicarsi e a creare così una linea cellulare in grado di produrre un numero verosimilmente infinito di cellule staminali embrionali con lo stesso patrimonio genetico.

In commercio sono disponibili banche di linee cellulari tramite le quali è possibile ottenere cloni di cellule isolate precedentemente in altri laboratori.

Tenendo conto dei costi e delle licenze d'uso, uno dei problemi principali di tali cellule staminali sono le possibili contaminazioni in vitro: dato che queste cellule vengono coltivate in maniera ininterrotta potrebbero subire manipolazioni ed inquinamenti chimici e biologici.

Cellule staminali ottenute da teratomi, teratocarcinomi, mole idatiformi e coriocarcinomi

L'impiego terapeutico di SC derivanti da questi rari tumori di provenienza dalle cellule germinali deve essere ancora dimostrato.

I principali problemi riscontrabili nel loro utilizzo sono l'espressione di antigeni tumorali, la possibile poliploidia (cellule con un numero multiplo di cromosomi) e l'aneuploidia (anomalie numeriche dei cromosomi).

Induzione di Partenogenesi e/o Trasferimento di nucleo di cellule differenziate di adulto in un ovocito enucleato

Nel trasferimento di nucleo di cellule differenziate di adulto in ovocito enucleato (TNSA) le ESC sono isolate da cellule dell'embrioblasto derivato dal trasferimento del nucleo di una cellula somatica adulta del paziente in una cellula uovo enucleata. Queste ESC posseggono quindi lo stesso genoma nucleare dell'individuo donatore della cellula somatica.

Le metodiche per ottenere cellule staminali embrionali umane con le stesse caratteristiche genetiche dell'individuo donatore del nucleo (i.e. cellule clonali, in quanto cloni cellulari originati dalla stessa cellula da cui è stato preso il nucleo del donatore) sono due:

- Tramite **partenogenesi**, ovvero stimolando una cellula uovo a dividersi senza fertilizzazione, cioè senza l'impiego di uno spermatozoo. Tale processo biologico avviene spontaneamente, anche se raramente; in questo caso, un uovo ottenuto da una paziente viene chimicamente stimolato a dividersi fino a produrre un pre-embione in vitro e quindi ESC che possono essere propagate e indotte a differenziarsi in differenti tipi cellulari. Il corredo genetico inizialmente aploide (23 cromosomi) successivamente si diploidizza (46 cromosomi) per soppressione di una divisione cellulare ripristinando il corredo genetico somatico proprio della donatrice.

La partenogenesi nell'uomo è realizzabile in laboratorio e può essere utilizzata per produrre cellule embrionali staminali proprie della donatrice. Questa tecnica, potrebbe anche essere utilizzata per clonare cellule staminali embrionali umane da donatore maschile, attraverso la sostituzione del pronucleo dell'uovo con due pronuclei maschili ottenibili dagli spermatozoi (28).

- Tramite **Trasferimento nucleare di cellule differenziate di adulto in un ovocito enucleato** (Commissione Dulbecco, 2001). Si tratta della produzione in vitro di SC autologhe ottenute con la riprogrammazione del nucleo di cellule somatiche. Il nucleo viene dapprima trasferito in una cellula uovo umana non fecondata, per dare origine a cloni cellulari propri del donatore, poi il materiale genetico di tale ovocita è rimosso e sostituito con il DNA di una cellula adulta. Un ovocita ricostituito con il nucleo di una cellula adulta, ma privo del suo nucleo, non è uno zigote da cui può avere origine un embrione, quindi grazie a questo processo non si ottiene un altro individuo, ma cellule staminali compatibili con il donatore della cellula adulta di partenza. Queste cellule vengono indotte verso lo sviluppo di specifiche tipologie cellulari e quindi trapiantate senza rischio di rigetto nel donatore, in quanto aventi lo stesso patrimonio immunologico, fornendo così nuove possibilità terapeutiche (29; 30).

In entrambi i casi (partenogenesi e TNSA) la capacità di creare embrioni autologhi rappresenta il primo passo verso la creazione di SC immuno-compatibili che potrebbero essere usate per ovviare il problema del rigetto immunomediato della medicina rigenerativa, presente con gli altri tipi di cellule totipotenti descritti sopra.

Con questa metodica i problemi relativi all'utilizzo delle SC sono la possibile espansione di cloni cellulari mutanti dato che il nucleo della cellula somatica utilizzata per il trasferimento potrebbe contenere una o più mutazioni accumulate nel corso della vita dell'individuo-donatore e che in questo modo verrebbe amplificato e diffuso in altri organi; problemi di regolazione genica che avvengono durante la formazione degli spermatozoi e degli ovociti che invece verrebbero totalmente eliminati dal trasferimento di nucleo con conseguenze ignote; scarsa disponibilità di ovociti umani ottenuti da tecniche di superovulazione indotte con somministrazione di ormoni a dosi elevate; problemi etico-giuridici in quanto nonostante l'uso della TNSA sembri essere un processo innocuo per creare linee di cellule staminali, l'impianto intra-uterino di

blastocisti create con il metodo TNSA perché questa possa nascere e vivere, è un processo noto con il nome di clonazione riproduttiva.

Trasferimento di nucleo di cellule differenziate di adulto in ovocito enucleato di altra specie

Per superare il problema dell'ottenimento di ovociti da donne si può utilizzare una cellula uovo di un'altra specie (e.g. maiale, pecora) per consentire la produzione di cellule umane del donatore. Le chimere verrebbero create inserendo materiale genetico umano dentro l'ovulo animale privato del suo DNA che quindi effettuerebbe soltanto la riprogrammazione del nucleo del donatore. Si risolverebbe così il problema della scarsa disponibilità di ovuli umani da utilizzare a scopo di ricerca, che normalmente provengono dai trattamenti di fecondazione in vitro.

Questa metodica, però, non è scevra delle problematiche etico-giuridiche e di problemi genetici ed epigenetici, dato che non sono noti gli effetti genetici dovuti al citoplasma di una specie nel nucleo di un'altra.

Fusione di cellule embrionali ed adulte (cellule chimeriche)

La fusione di cellule embrionali e di adulto viene fatta allo scopo di riportare la cellula somatica dell'adulto indietro per renderla totipotente. Nelle chimere con embrione intatto le ESC possono formare numerosi range di tessuti differenziati.

I principali problemi di questa tecnica sono la formazione di mosaicismi somatici (cellule diverse nella stessa linea staminale) e il possibile sviluppo di poliploidia.

Fonti di cellule staminali multipotenti/unipotenti

Cellule Staminali Adulte

Le cellule staminali adulte (ASC) sono cellule indifferenziate presenti nei tessuti di un organismo adulto in grado di autorinnovarsi e di differenziare anche se in maniera minore rispetto alle cellule staminali embrionali. Queste cellule sono note fin dagli anni sessanta quando si scoprì la presenza di due diversi tipi di cellule staminali all'interno del midollo osseo: le cellule staminali ematopoietiche (HSC) che danno origine ai vari tipi di cellule del sangue e le cellule staminali mesenchimali (MSC) che danno origine a osteociti, condrociti, adipociti e altre cellule del tessuto connettivo.

Ad oggi le ASC vengono isolate da numerosi 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. Queste SC persistono durante tutta la vita e svolgono generalmente funzioni di riparazione tissutale, in risposta ad eventi traumatici o al naturale turnover cellulare (31). Ciascun tessuto sembra possedere una popolazione staminale residente che contribuisce al suo mantenimento, il numero e l'attività delle ASC variano però in relazione ai tessuti: in generale si può affermare che le ASC sono tanto più abbondanti in un determinato tessuto, quanto maggiore è la sua capacità e necessità rigenerativa.

Fonti di SC adulte sono in realtà localizzabili in tutti gli organi del corpo (32), e sono dotate di una rilevante plasticità (33).

Sono state individuate ed isolate ASC dalla cute (34) e dai follicoli piliferi del cuoio capelluto (35), dai vasi sanguigni, dalla polpa dentaria (36), dall'epitelio del tratto gastro-intestinale (37), dal tessuto muscolo-scheletrico (38), dal tessuto osseo (39), dal tessuto adiposo (40), dalla retina, dal fegato (41), dal cervello (42; 43), dal testicolo (44), dalla placenta, dal cordone ombelicale e dal sangue cordonale (45) e dal liquido amniotico (46).

Queste cellule, utili per la rigenerazione degli stessi tessuti in cui risiedono (47), sono una minima parte di quelle residenti in un tessuto; l'ipotesi è quindi quella che esse possano risiedere in un sito specifico dei vari tessuti dove restano quiescenti finché non vengono riattivate da traumi o patologie.

I problemi riscontrabili con questa metodica sono dati dalla limitata capacità differenziativa, soprattutto *in vivo*, inoltre non sono stati isolati ancora tutti i tipi di cellule staminali. Queste popolazioni cellulari, inoltre, sono gravate da una limitata o assente transdifferenziazione e dalla tendenza a formare cellule ibride poliploidi. Ulteriore problematica è ovviamente la presenza di mutazioni somatiche e genomiche conseguenti sia all'esposizione a tossine legate all'ambiente in cui sono reperibili sia dovute all'effetto dell'invecchiamento che possono vanificare le colture.

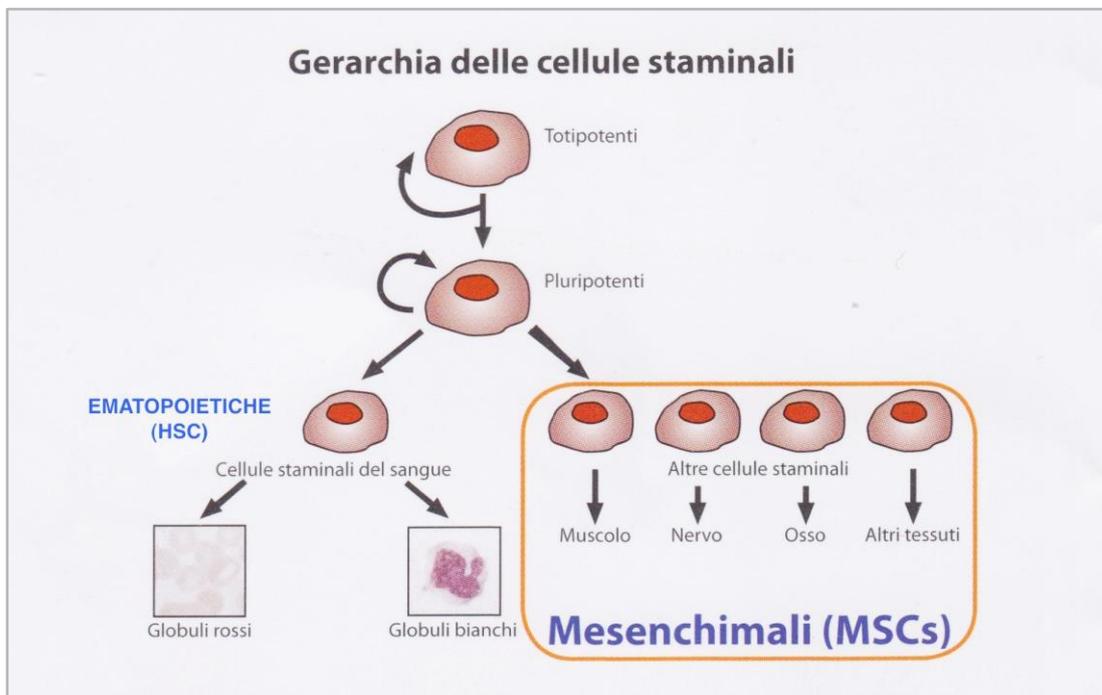
Cellule Staminali Mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono precursori multipotenti non ematopoietici capaci di differenziarsi e di contribuire alla rigenerazione di tessuti mesenchimali come ossa, cartilagini, tendini, legamenti e tessuto adiposo. Sebbene non immortali, le MSC possono proliferare in numerose colture, pur mantenendo il loro potenziale di crescita e di multi-linearità (58).

Il tessuto mesenchimale si ritrova in tutti gli organi, per garantire supporto strutturale e per regolare il traffico di cellule attraverso i tessuti. Il mesenchima è privo di forma propria e riempie gli spazi degli organi in via di differenziamento; la sua funzione è trofica di sostegno e formativa.

Le MSC derivano principalmente dal mesoderma, foglietto embrionale all'origine dei tessuti connettivi di tutto l'organismo, ma possono originare anche da alcune porzioni degli altri due foglietti embrionali: l'ectoderma della cresta neurale e l'endoderma

della placca precordale (49), tuttavia poco si conosce ancora sul loro sviluppo durante la vita fetale e post-natale.



Sulla loro superficie le MSC non possiedono antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I né CD40, CD80 e CD86 ed esprimono moderatamente gli antigeni MHC di classe II risultando così non immunogene.

Inoltre è stato dimostrato che hanno un'attività immunoregolatoria ed anti-infiammatoria attraverso l'inibizione di diverse vie dell'immunità cellulo-mediata. Le MSC prevengono la risposta T-cellulare nella reazione mista linfocitaria allogenica, bloccano la differenziazione e la maturazione delle cellule dendritiche indotte da alloantigeni, inibiscono la proliferazione di linfociti e cellule NK, inducono la differenziazione in cellule T regolatorie e, infine, favoriscono la risposta mediata dai linfociti T helper 2 rispetto ai T helper 1.

Tali SC, inoltre, deprimono l'immunità umorale, sopprimendo la proliferazione, la chemiotassi e la produzione di anticorpi da parte delle cellule B.

In altri studi si parla di effetto neuroprotettivo delle MSC che potrebbe essere mediato dalla loro capacità di produrre diversi fattori trofici che contribuiscono al recupero funzionale, alla sopravvivenza delle cellule neuronali ed alla stimolazione della rigenerazione endogena.

Le MSC vengono isolate inizialmente dal midollo osseo grazie alla loro capacità di aderire al substrato di plastica, a differenza delle cellule staminali ematopoietiche, con lo svantaggio di ottenere eterogeneità cellulare nei primi passaggi in coltura (50). Un metodo alternativo per isolare le MSC è l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale Stro1 (51). Le MSC formano colonie aderenti fibroblast-like quando vengono coltivate in siero fetale di vitello e possono essere espanse in presenza di vari fattori di crescita. Studi dettagliati hanno mostrato che la coltura *in vitro* delle MSC è un processo che consiste di tre fasi: una fase lag di adattamento iniziale (3- 4 giorni) seguita da una rapida espansione (fase log) e quindi una successiva fase stazionaria (52; 53). Dal punto di vista immunofenotipico le MSC sono state caratterizzate e definite dall'International Society for Cell Therapy come cellule negative per i markers di superficie ematopoietici quali CD34, CD45, CD14, CD31,CD33 e HLA-DR e positive per CD105, CD73 e CD90 (54; 55)

Cellule Staminali Ematopoietiche

Le cellule staminali ematopoietiche (HSC) sono cellule multipotenti, prima della nascita risiedono nel sacco vitellino, nel fegato e nella milza, poi nel midollo osseo e nelle ossa lunghe e piatte (femore, tibia, sterno, costole...).

Le HSC sono relativamente rare nel midollo osseo ($1/10^5$ delle cellule nucleate), la loro funzione è quella di rinnovare continuamente le cellule ematopoietiche e quando inizia il loro percorso differenziativo sono in grado di maturare in senso mieloide e dare

origine a globuli rossi, piastrine e granulociti, oppure in una cellula della linea linfoide, originando i linfociti.

Le HSC sono dotate di elevata capacità proliferativa priva di trasformazione neoplastica, conservando le proprietà staminali (56, 57); 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 mobilitazione dal midollo delle cellule staminali emopoietiche.

Le fasi di quiescenza e maturazione sono regolate dal microambiente del midollo osseo, sul quale intervengono complessi meccanismi, e dall'azione bilanciata di numerosi fattori di crescita che stimolano o inibiscono la maturazione cellulare. Fino a poco tempo fa le HSC erano prelevate ad uso terapeutico tramite l'espianto di midollo per rendere possibile la rigenerazione del midollo in fase post-chemioterapica. Attualmente la gran parte dei trapianti avviene prelevando le SC emopoietiche dal sangue, non dal midollo osseo.

Quando stimulate opportunamente, è stato dimostrato che le HSC sono in grado di differenziare in numerosi tessuti: oltre che in osteoblasti e adipociti anche in condrociti, cellule muscolari, cellule di origine endodermica (epatociti, pneumociti) ed ectodermica (cellule nervose, cellule gliali) (58; 59).

Cellule Staminali da cordone ombelicale

Il sangue residuo della placenta e del cordone ombelicale costituisce una fonte di SC emopoietiche adulte la cui conservazione è rapida, non invasiva ed è una procedura indolore che non comporta alcun rischio (60).

Il sangue di cordone si è rivelato un'eccellente risorsa di cellule staminali emopoietiche per il trapianto allogenico. Rispetto al midollo osseo, presenta una maggiore percentuale di cellule CD34+ CD38-, suggerendo che nel sangue neonatale possano essere presenti progenitori dotati di potenziale proliferativo e differenziativo; dal sangue cordonale è possibile isolare elementi simili alle HSC (HSC-like cells) con un'efficienza maggiore del 60% rispetto al midollo osseo. Tali cellule hanno una frequenza molto più bassa nel cordone rispetto che nel midollo, ma mostrano una maggiore capacità proliferativa. Il sangue viene raccolto dal cordone ombelicale, sia in caso di parto spontaneo che di taglio cesareo, facendo un prelievo dalla vena ombelicale in circuito chiuso sterile. Ne viene calcolato il volume e la quantità di globuli bianchi, che non devono essere inferiori, rispettivamente, a 60 ml e 800 milioni (tali valori sono spesso diversi tra le varie banche, è però comunemente accettato il fatto che ad unità congelata non debbano essere inferiori a 800 milioni).

In Italia non è possibile gestire il cordone ombelicale in forma privata; è però possibile donarlo ad apposite banche pubbliche che lo mettono a disposizione a livello internazionale. La conservazione per uso personale o per uso intrafamiliare è consentita solo nel caso in cui, al momento del parto, siano presenti nel neonato, nella fratria o nei genitori del neonato stesso, delle patologie che abbiano l'indicazione al trapianto di cellule staminali e da sangue placentare. In questo caso si parla di donazione dedicata (o più propriamente di uso autologo e uso allogenico correlato) ed è sufficiente presentare un certificato medico degli specialisti della persona malata. Le cellule staminali ombelicali hanno una compatibilità del 25% tra consanguinei. In caso diverso è comunque consentito, previa autorizzazione delle autorità competenti (61), raccogliere il sangue placentare e spedirlo all'estero per la criopreservazione presso laboratori privati.

Sangue periferico

Il prelievo diretto di cellule ematopoietiche per trattamenti medici dal midollo osseo è una pratica che sta lentamente scomparendo. Attualmente si preferisce prelevare le cellule del donatore dal sangue periferico circolante mediante aferesi. La quota di SC circolanti nel sangue periferico, identificate come CD34+ è però esigua in condizioni di omeostasi (0,1-0,4%); la produzione di HSC emopoietiche residenti nel midollo viene quindi stimolata tramite protocolli chemioterapici tramite cui le SC vengono indotte a migrare da questa sede verso il sangue circolante tramite specifici fattori di crescita (GM-CSF o G-CSF) (54).

L'aferesi, oltre a garantire risultati migliori rispetto al prelievo del midollo osseo, è preferibile anche per il donatore: non prevede anestesia né ricovero ospedaliero. Inoltre i pazienti che subiscono un trapianto di SC prelevate con questo sistema hanno un tasso di sopravvivenza maggiore rispetto a quelli sottoposti a trapianto di midollo osseo.

Caratterizzazione

Affinché una popolazione cellulare possa essere definita staminale, necessita di una approfondita caratterizzazione.

Sebbene non si sia stato ancora raggiunto un totale accordo tra i diversi laboratori per quale sia la serie di analisi da utilizzare nella caratterizzazione, in genere si cerca di:

- crescere e coltivare le cellule staminali per molti mesi, assicurandosi che le cellule siano capaci di autorinnovarsi, siano sane e rimangano indifferenziate;
- evidenziare la presenza di marker di superficie, che possano essere trovati solo in cellule indifferenziate;

- esaminare la composizione cromosomica al microscopio, per valutare sia la presenza di aberrazioni cromosomiche che di aneuploidia. Questo metodo però non permette di valutare la presenza di mutazioni;
- Valutare se le cellule sono in grado di crescere in coltura dopo essere state congelate e scongelate;
- Valutare le potenzialità delle SC permettendo loro di differenziarsi spontaneamente in coltura, o manipolando le cellule in maniera tale che esse si differenzino in specifici tipi cellulari, oppure iniettandole in topi immunosoppressi per valutare la formazione di eventuali teratomi.

Caratterizzazione immunofenotipica

L'analisi immunofenotipica di una cellula è la caratterizzazione degli antigeni che tale cellula esprime a livello di membrana. Gli antigeni, detti anche cluster of differentiation (CD), sono espressi in modo selettivo dalle popolazioni cellulari nelle varie fasi del loro sviluppo. I CD sono identificabili mediante anticorpi monoclonali coniugati a sostanze in grado di emettere luce se colpite da un fascio di luce incidente a una particolare lunghezza d'onda (fluorocromi). Gli anticorpi monoclonali si legano specificamente alle molecole nelle cellule che li esprimono e vengono così quantificati mediante citofluorimetria.

Caratterizzazione genotipica: principali geni coinvolti nel mantenimento della pluripotenza

Sono stati identificati alcuni geni che sembrano associati alle prime fasi dello sviluppo dell'embrione per il mantenimento della popolazione cellulare dell'epiblasto e per il mantenimento della pluripotenza delle cellule embrionali *in vitro*.

Octamer 4 (OCT4), noto anche come POU5F1, è una proteina che nell'uomo viene codificata dal gene POU5F1. OCT4 è fortemente implicato nell'autorinnovamento delle cellule staminali indifferenziate embrionali e ha il ruolo di indirizzare le cellule staminali al loro destino nei primissimi stadi dello sviluppo dell'embrione. È inizialmente implicato come fattore materno nella differenziazione oocitaria, poi resta attivo nell'embrione durante tutto il periodo del preimpianto, quando si forma l'epiblasto e l'ectoderma primitivo. Il ruolo di OCT4 sembra quindi essere necessario sia per decidere il destino delle cellule allo stadio di morula e di formazione delle cellule del trofoblasto, sia successivamente allo stadio di preimpianto. Questo gene è espresso nella massa cellulare interna (ICM) e down regolato nelle cellule del trofoblasto. È stato dimostrato che embrioni privi di OCT4 non riescono a formare la massa cellulare interna ed al suo posto si formano solo cellule del trofoblasto; embrioni privi di OCT4 non riescono a crescere in coltura.

L'espressione di OCT4 è associata con un fenotipo indifferenziato e con i tumori: questa proteina sembra essere coinvolta nella trasformazione neoplastica di cellule germinali adulte, inoltre l'espressione ectopiche di questo fattore in topi adulti ha causato la formazione di lesioni displastiche nella cute e nell'intestino. Tale displasia intestinale è il risultato di un aumento nella popolazione delle cellule progenitrici e della upregulation della trascrizione delle beta catenine attraverso l'inibizione della differenziazione cellulare (62; 63).

Cellule differenziate mostrano una ridotta espressione di OCT4 e quindi questo marcatore è stato spesso usato come marker della staminalità negli esperimenti *in vitro* sulle cellule staminali embrionali murine.

OCT4 regola la trascrizione di numerosi geni interagendo con fattori di trascrizione presenti in cellule pluripotenti (SOX2 e NANOg). OCT4 è presente nelle cellule pluripotenti ed è necessario per la pluripotenza stessa.

A seconda del tessuto embrionale, è presente in concentrazioni differenti, per permetterne il diverso differenziamento:

- Livelli elevati → ipoblasto
- Livelli intermedi → ICM
- Non presente → trofoectoderma

SOX2, è l'abbreviazione di "SRY-Related HMG-Box", dove HMG sta per High Mobility Group (Gruppo ad Alta Mobilità) che è il nome dato alla regione di Sox che lega il DNA; SRY sta per Sex Determining Region Y in quanto il primo fattore di trascrizione SOX scoperto si era mostrato importante nel determinare il sesso nello sviluppo delle gonadi.

SOX2 come OCT4 è espresso nell' ICM, nell' epiblasto e nelle linee germinali; è presente nelle linee cellulari embrionali umani, allo stadio di morula e nelle blastocisti nelle ICM. SOX2 è richiesto per il mantenimento delle cellule dell'epiblasto in uno stadio indifferenziato.

Sembra che SOX2 e OCT4 funzionino insieme sia per mantenere lo stato pluripotente durante i primi stadi dello sviluppo sia nella regolazione di FGF4 (64).

NANOG è un fattore di trascrizione che mantiene la pluripotenza in cellule embrionali staminali. NANOG è stato trovato all'interno delle cellule a livello di morula e nell'ICM della blastocisti; continua ad essere espresso nelle cellule embrionali dell'epiblasto ma dopo l'impianto inizia ad essere down-regolato. Questo gene sembra essere cruciale per il mantenimento della capacità staminale delle cellule embrionali e dell'epiblasto e sembra essere la chiave della pluripotenza (65).

NANOG gioca un ruolo cruciale nella seconda fase dello stadio di preimpianto; quando viene eliminato la pluripotenza non può essere mantenuta e da tali colture si sviluppano i primitivi derivati cellulari endodermici. La perdita della funzione di NANOG provoca la differenziazione di cellule staminali embrionali in altri tipi (66). Quando iperespresso, invece, si assiste ad una proliferazione delle cellule embrionali che restano multipotenti per multiple generazioni.

Nelle cellule embrionali staminali OCT4 e NANOG sono essenziali per il self-renewal (67).

FOXD3 è un gene espresso in linee cellulari embrionali murine e nei loro equivalenti tumorali; la sua presenza in quelle umane è controversa. È richiesto per il mantenimento della pluripotenza durante il preimpianto ed è fondamentale per l'embriogenesi (68).

Anche **FGF4** (fibroblast growth factor 4) è richiesto per l'impianto dell'embrione e per la proliferazione della massa cellulare interna *in vitro* (69); è un gene importante di OCT4 e la sua trascrizione richiede anche SOX2.

UTILIZZI DELLE CELLULE STAMINALI

La morte cellulare è la base della maggior parte delle patologie conosciute. Questo evento porta alla distruzione dell'architettura tissutale dell'organo colpito.

Un approccio terapeutico risolutivo è volto alla ricostruzione del tessuto danneggiato tramite il trapianto di nuove cellule che possano sostituire quelle distrutte o alterate dalla malattia. La medicina rigenerativa si propone di rigenerare permanentemente i tessuti e gli organi danneggiati sfruttando le potenzialità rigenerative delle cellule staminali.

A livello clinico le SC hanno l'incredibile potenzialità di espandersi *in vitro* fino a quantità elevatissime ovviando il problema che si pone con i trapianti da donatore per cui si dispone di materiali biologici quantitativamente limitati.

Sussiste però un ulteriore ostacolo all'utilizzo di queste terapie rigenerative: il problema della compatibilità con il sistema immune del ricevente. La necessità di una immunosoppressione cronica per evitare il rigetto di trapianto verrebbe risolta soltanto con l'utilizzo di cellule staminali derivate dal paziente stesso, ma mentre questo è possibile nel caso degli epitelii, in altri casi il materiale biologico utilizzato potrebbe contenere cellule staminali già compromesse dalla patologia in atto o non possedere alcuna cellula staminale (e.g. al momento non esistono solide evidenze che il tessuto cardiaco e quello pancreatico contengano cellule staminali).

Ad oggi si è dimostrato che anche tessuti che precedentemente si ritenevano privi di capacità rigenerativa in realtà la possiedono (70) e questa scoperta ha permesso di utilizzare le SC per trattare tessuti danneggiati (71) tramite transdifferenziazione (la trasformazione di cellule appartenenti ad uno dei tre foglietti embrionali in cellule di un altro foglietto embrionale). È stato dimostrato, ad esempio, che cellule staminali di origine emopoietica sono in grado di diventare epatociti (72; 73), cellule muscolari satelliti possiedono un potenziale emopoietico (74) e cellule staminali mesenchimali

ematopoietiche migrano in caso di necessità nei tessuti muscolo-scheletrici (75), possono differenziare in tessuto nervoso (76) e dare origine a cardiomiociti *in vitro*.

Cellule staminali prelevate dal tessuto di un paziente potrebbero quindi essere usate per trattare una patologia che sta colpendo un diverso tessuto dello stesso individuo. In questi casi si rende necessario esplorare tutte le possibili alternative sperimentali teoricamente e praticamente perseguibili quali la trans-determinazione di cellule staminali di diversi tessuti, grazie alla quale cellule di un tessuto possono venire riconvertite in cellule di un altro tessuto anche di diversa origine embriologica, o l'uso di cellule totipotenti staminali embrionali a partire dal nucleo di cellule somatiche del paziente trasferite in una cellula uovo enucleata.

Attuali applicazioni

Trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche

Il trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche consente di ristabilire l'emopoiesi dopo terapie con dosi mieloablativa di chemioterapia e radioterapia.

Indicazioni: K (cancro) mammario, Neuroblastoma, K germinali, Sarcoma di Ewing, Microcitoma, K ovaio, altri K solidi, Linfoma di Hodgkin, Leucemia linfatica cronica, Leucemia linfatica acuta, Leucemia mieloide cronica, Leucemia mieloide cronica, Sindromi mielodisplastiche, Mieloma multiplo, Linfoma non Hodgkin.

Trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche

L'infusione di cellule staminali allogeniche per ripristinare l'emopoiesi in pazienti trattati con chemioterapia e radioterapia in regime di condizionamento al trapianto offre il potenziale curativo dell'effetto Graft versus Leucemia effect (effetto del

trapianto verso la Leucemia). Questo effetto si basa su un'azione immunomediata del sistema immunitario del donatore nei confronti della neoplasia del paziente (77).

Indicazioni: K renale, K mammario, altri K solidi, Linfoma di Hodgkin, Leucemia linfatica cronica, Leucemia linfatica acuta, Leucemia mieloide cronica, Leucemia mieloide acuta, Sindromi mielodisplastiche, Mieloma Multiplo, Anemia aplastica, Talassemie, Linfoma non Hodgkin, altri K ematologici.

Trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche del cordone ombelicale

In Italia è possibile effettuare la donazione del cordone ombelicale esclusivamente a fini solidaristici gratuitamente ed in strutture pubbliche. È possibile conservare le SC cordonali per uso dedicato (uso autologo o uso allogenico correlato) e per uso personale (autologo) all'estero. Tale servizio viene effettuato a spese proprie, dietro rilascio di un nulla osta all'esportazione da parte del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche sociali.

La conservazione delle HSC da cordone ombelicale per uso dedicato può essere effettuata in Italia soltanto nel caso in cui il neonato o un consanguineo (fratrina, genitori) siano affetti da patologie identificate come curabili tramite cellule staminali.

Indicazioni cliniche: sono sovrapponibili a quelle previste per il trapianto di cellule staminali da altre sorgenti.

Trapianto di cellule staminali cutanee

Ad oggi uno degli ambiti con sicure applicazioni cliniche è quello della riparazione degli epitelii squamosi che includono l'epidermide e la cornea. In questi casi, già da diversi anni è possibile effettuare dei trapianti di pelle autologa; il nuovo tessuto cutaneo

viene generato *in vitro* a partire da progenitori e staminali cutanee derivanti da piccole biopsie della cute del paziente.

La letteratura purtroppo è ancora priva di informazioni circa i meccanismi alla base dell'integrazione del nuovo tessuto. Già a partire dal 1987 uno studio di Yann Barrandon ha proposto una metodologia efficiente per la crescita di cellule staminali della pelle *in vitro* e la produzione di cheratinociti a partire da esse, anche se i costi elevati e la necessità di diversi mesi per ricostruire lembi di pelle estesi, di fatto ne limitano la piena diffusione in clinica. In aggiunta, sebbene questo oggi rappresenti uno straordinario trattamento salvavita, i malati trapiantati chiedono una vita migliore. La pelle così rigenerata, infatti, non è ottimale in quanto priva di ghiandole sudoripare e di bulbi piliferi. La pelle inoltre è secca, provocando anomalie nella termoregolazione e nella fisiologia di questo importante tessuto. Sono quindi necessarie ulteriori ricerche per capire la normale fisiologia di sviluppo e rigenerazione della pelle e capire la biologia delle staminali della pelle.

Un altro epitelio che è possibile rigenerare completamente *in vitro* è l'epitelio corneale. In caso di lesioni alla cornea, l'epitelio congiuntivale, che costituisce la parte visibile bianca dell'occhio, prende il sopravvento portando alla formazione di quello che in termini clinici si chiama "pannus" e che copre tutto il bulbo, causando cecità.

In molti casi, è possibile ricostruire la cornea partendo da staminali presenti a livello del limbus dell'occhio, una striscia di cellule di cui circa il 10% con caratteristiche staminali, che circonda la cornea. Sebbene il prelievo non possa essere mirato al prelievo delle sole staminali limbari, è presumibile che il sistema di espansione *in vitro* selezioni per le staminali corrette le quali, una volta messe in coltura, sono in grado di ricostruire in circa 3-4 settimane un lembo di epitelio corneale che viene impiantato al posto di quello compromesso.

Indicazioni: patologie cutanee gravi ed ustioni per coprire permanentemente lesioni estese della cute e della mucosa, lesioni da fistole diabetiche, o da epidermolisi bollosa . L'uso di questa tecnica è prevedibile in altri tipi di patologie cutanee quali terapia genica nelle neoplasie ed infezioni cutanee ed in mosaicismi somatici e funzionali.

Autotrapianto

Utilizzo del trapianto nucleare con cellule del paziente stesso evitando i problemi e i rischi di rigetto e di incompatibilità tessutale.

Terapia genica

Con le tecniche d'ingegneria genetica si può correggere l'effetto prodotto da geni difettosi; le SC infatti tollerano meglio l'inserimento di geni dall'esterno. Questa tecnica permette la correzione di difetti genetici nelle prime fasi di sviluppo embrionale e la terapia delle malattie causate dall'alterazione del DNA mitocondriale.

Problemi tecnici e rischi delle cellule staminali

L'impiego delle cellule staminali per generare tessuti solleva molti problemi: in primis poco si sa sul tessuto formato a partire dalle SC: quanto è normale, che velocità di invecchiamento ha, se sussistono mutazioni dannose, contaminazioni di tessuti diversi o se può dare problemi di tolleranza immunologica.

Si ignora ancora se le cellule prodotte mediante trapianto nucleare da tessuti adulti diano luogo rispettivamente ad uno spettro di tessuti differenziati ampio quanto quello derivato dalle SC di un embrione prodotto dalla fusione di spermatozoi e uova. O ancora, non si sa se il trapianto di tessuto sano derivato da cellule staminali sia efficace

per riparare il tessuto danneggiato e sia possibile generare il numero di cellule necessario per un impiego terapeutico.

Metodiche di conservazione

Le metodiche di conservazione del materiale biologico giocano un ruolo essenziale per il mantenimento a breve e lungo termine delle cellule staminali.

La criopreservazione garantisce un'efficace sospensione dei processi di invecchiamento e deterioramento cellulare permettendo una buona sopravvivenza degli embrioni.

Questa tecnica necessita di una lenta procedura di raffreddamento ed una riduzione programmata della temperatura attuata da una costosa strumentazione computerizzata che, insieme all'ambiente di conservazione, garantisce l'efficacia della metodica.

Le tecniche di congelamento usate fino ad ora non sono però in grado di garantire il mantenimento della vitalità cellulare e delle caratteristiche molecolari ed antigeniche per un arco di tempo superiore ai 20 anni. La principale causa di danno cellulare da congelamento è la formazione di cristalli di ghiaccio nel compartimento extracellulare che aumentano la pressione osmotica portando a danno della membrana fino alla lisi cellulare. Tali danni possono essere limitati tramite l'impiego di agenti crioprotettivi, sostanze dotate di grande diffusibilità (penetrano facilmente all'interno delle cellule) in grado di legare le molecole d'acqua rallentandone l'incorporazione nei cristalli di ghiaccio in formazione.

Per la crioconservazione oggi viene utilizzato routinariamente il Dimetilsolfossido (DMSO). La concentrazione utilizzata (10%) risulta però tossica per le cellule (78); per ovviare a tale problema il congelamento ha luogo immediatamente dopo l'immissione del DMSO nel campione (79).

Anche lo scongelamento è delicato per le SC, in questa fase, infatti, si possono verificare gravi danni di tipo meccanico sia per lo shock da diluizione, sia a causa del fenomeno della ricristallizzazione che porta al rigonfiamento e alla lisi cellulare le SC. Questi danni possono essere scongiurati evitando lo scongelamento rapido (80).

Le speranze della ricerca

Nell'ultimo decennio sono stati compiuti passi decisivi nell'ambito della ricerca delle SC: lo studio di cellule di derivazione embrionale umana, lo sviluppo di tecniche di clonazione, l'individuazione di popolazioni di SC anche nei tessuti adulti. Studi più approfonditi sul differenziamento, sui geni coinvolti e i meccanismi di funzionamento e proliferazione cellulare sin dai primi stadi dello sviluppo, potrebbero aiutare nella comprensione dei processi tumorali e dello sviluppo del corpo umano, con ripercussioni positive in campo terapeutico.

La speranza attuale è che le cellule umane progenitrici e le cellule staminali possano essere ampiamente usate per rimpiazzare cellule non funzionanti di uno specifico tessuto. La loro pluripotenzialità le rende candidati ideali per un ampio raggio di terapie sostitutive e il loro numero illimitato rappresenta una soluzione all'attuale carenza di donatori d'organo: promettono infatti di saper curare una vasta gamma di patologie che derivano dall'alterazione di funzioni cellulari o dalla distruzione tessutale. Queste cellule, se stimolate a svilupparsi in differenziate, offrirebbero la possibilità di una fonte rinnovabile di cellule in un elevato numero di condizioni patologiche, anche multifattoriali: neuroni per malattie neurodegenerative, la terapia del morbo di Parkinson e dell'Alzheimer, epatociti per sostituire cellule di fegato cirrotico, cellule β per la cura del Diabete Mellito di tipo I, strutture nervose per lesioni al midollo spinale, cute per ustioni, cardiomiociti per il miocardio infartuato etc...

Lo scopo a lungo termine delle ricerche sulle cellule staminali a fini terapeutici sarebbe quello di riprogrammare cellule mature di individui adulti così da riconvertirle al loro stato indifferenziato e poi indurle a differenziarsi in un tipo specifico di tessuto diverso da quello da cui la cellula faceva parte prima della riprogrammazione.

Un altro campo importante è quello della sperimentazione farmaceutica preclinica, per l'applicazione su base cellulare di nuove molecole in campioni sperimentali non animali.

Un obiettivo ancora più ambito è quello di identificare nuove fonti di cellule staminali allo scopo di ovviare i problemi etici e i dibattiti politici e legislativi che spesso rappresentano un ostacolo alla ricerca rallentandola in molti paesi. In questo modo l'espansione *in vitro* delle cellule staminali potrà essere applicata più largamente nella terapia cellulare e nella terapia genica.

LIQUIDO AMNIOTICO

Il liquido amniotico (LA) è un liquido composto da acqua, elettroliti (98-99%), sostanze chimiche (glucosio, lipidi, proteine, ormoni ed enzimi) e cellule situato nella cavità amniotica con funzione protettiva e di veicolo per gli scambi materno-fetali.

Il LA si forma per trasporto attivo di soluti da parte dell'epitelio amniotico durante il primo trimestre di gravidanza, con conseguente movimento passivo dell'acqua. Compare all'inizio della seconda settimana di gestazione e aumenta in volume durante la gravidanza.

I meccanismi di formazione del LA sono diversi; nelle prime fasi della gravidanza il LA è scarso ed è costituito da un ultrafiltrato del plasma materno che si forma per trasporto attivo di soluti da parte dell'epitelio amniotico e conseguente movimento passivo dell'acqua. Dall'inizio del secondo trimestre fino a 20 settimane gestazionali (s.g.) il LA è costituito principalmente da liquido extracellulare che diffonde nel sacco amniotico attraverso la cute del feto ed ha la stessa composizione del plasma fetale. Dopo le 22-25 s.g. la cute fetale cheratinizza e quindi cessa questo equilibrio: l'osmolalità del LA diminuisce progressivamente per la crescente immissione di urina fetale e diventa ipotonica, viene quindi facilitato il passaggio dell'acqua per osmosi dal LA al sangue materno attraverso le membrane amnio-coriali.

Il LA è principalmente composto dall'urina fetale, in minor misura contribuiscono le vie digerenti, poiché il feto deglutisce il LA, e una minima quota di questo liquido è costituita anche dalla saliva fetale. L'ingestione di LA è continua da parte del feto e riveste una peculiare importanza nello sviluppo dell'apparato respiratorio e gastrointestinale. Anche le vie respiratorie concorrono alla formazione e al mantenimento del LA poiché si ha uno scambio bidirezionale con la cavità amniotica.

Durante la gravidanza l'osmolalità del LA diminuisce progressivamente a causa dell'immissione nel liquido stesso di urina, ipotonica. La quantità di LA è influenzata da numerosi fattori endocrini fetali (arginina, vasopressina, fattore natriuretico atriale,

angiotensina II, aldosterone, prostaglandine) che agiscono sia a livello renale, modificando flusso plasmatico renale, filtrazione glomerulare e diuresi, che a livello polmonare fetale. Il LA inoltre è modificato dallo stress fetale, dall'ipossia o da difetti di crescita fetali (IUGR, Intra-Uterine Growth Restriction).

Le vie d'uscita del LA dall'amnios, sono rappresentate principalmente dalla deglutizione e dal riassorbimento attraverso le membrane coriali.

Le funzioni del LA sono molteplici: esercita un'azione protettiva meccanica distribuendo su tutta la sua superficie le variazioni di pressione dovute ad urti, a traumi o alle contrazioni uterine, consente al feto una certa mobilità nella cavità uterina, garantisce un ambiente termico costante, partecipa direttamente o indirettamente a molti processi metabolici del feto, infine è verosimile che svolga anche numerose altre funzioni biochimiche e immunologiche che a tutt'oggi non siamo ancora in grado di precisare.

La valutazione del volume del liquido amniotico rispecchia il benessere fetale (81).

Oggi il LA viene usato in diagnosi prenatale per individuare un ampio raggio di anomalie causate da mutazioni genetiche. Il prelievo di liquido amniotico dalla cavità uterina tramite amniocentesi è la metodica più diffusa per ottenere campioni biologici utili al fine di effettuare una diagnosi prenatale. L'amniocentesi viene utilizzata da molti decenni come una procedura di routine per la determinazione del cariotipo fetale e la diagnosi prenatale, permettendo la rivelazione di una varietà di patologie genetiche. Dal LA prelevato tramite amniocentesi vengono isolati gli amniociti per l'esecuzione di analisi citogenetiche che permettano di determinare il cariotipo fetale. Su queste cellule si accerta la presenza di anomalie cromosomiche fetali numeriche e/o strutturali che possono essere associate a sindromi cromosomiche. La diagnosi può essere fatta attraverso la coltura delle cellule fetali presenti nel liquido amniotico e l'osservazione dei cromosomi al microscopio (tecnica tradizionale), oppure utilizzando la microarray-Comparative Genomic Hybridization (CMA o cariotipo molecolare), che

consente di identificare anche alcune patologie derivanti da alterazioni submicroscopiche non visibili con la tecnica tradizionale.

Tramite il dosaggio nel LA di specifiche sostanze si possono diagnosticare anche alcune malattie come i difetti del tubo neurale, le anomalie del metabolismo, etc... Nel LA possono essere ricercati anche frammenti di DNA di agenti infettivi, segno di possibile infezione fetale.

Con tecniche di biologia molecolare (PCR) può inoltre essere eseguita l'analisi diretta di frammenti di DNA per la diagnosi di svariate malattie genetiche quali la talassemia, la fibrosi cistica, la Sindrome del Cromosoma X fragile, la Sordità Congenita, la Distrofia Muscolare di Duchenne-Becker, etc

Cellule staminali nel liquido amniotico

Il LA si è dimostrato un'importante risorsa di SC e le MSC rappresentano lo 0,9-1,5% delle cellule totali presenti nel LA (82; 83). Queste SC mostrano una capacità proliferativa superiore alle HMSC dovuta probabilmente al minor tempo di duplicazione (25 ore contro le 30-90 ore delle MSC da midollo osseo), e alla presenza di telomeri più lunghi (sequenze aminoacidiche che proteggono le estremità dei cromosomi) (84), ma sono dotate di capacità rigenerative ridotte rispetto alle staminali embrionali.

Recentemente, però, è stato dimostrato che le SC del LA possono "riattivare" la caratteristica della pluripotenza come nelle cellule staminali embrionali (85). È stato osservato inoltre che un solo clone di cellule amniotiche C-KIT+ è in grado di generare cellule adipogeniche, osteogeniche, miogeniche, endoteliali, neurogeniche ed epatiche (86).

Non tutte le cellule del LA sono però dotate delle stesse caratteristiche, cioè non tutte sono capaci di aderire e proliferare se sottoposte alle stesse condizioni di coltura

cellulare. È possibile inoltre che tali cellule siano in grado di aderire ma non di proliferare o formare colonie a causa dell'arresto del ciclo cellulare, dello stadio differenziativo o del processo di invecchiamento. Anche in caso di anomalie cellulari, comprese le lesioni aperte (come il tubo neurale) o anomalie della parete addominale (come la gastroschisi), le proprietà morfologiche e di crescita di tali cellule nel LA risultano differenti.

La popolazione vitale di cellule amniotiche contiene quindi cellule che aderiscono in condizioni di routine, cellule in divisione, formanti colonie di diversi tipi cellulari, cellule non proliferanti nelle condizioni di routine e cellule che non aderiscono in condizioni di routine.

La presenza di cellule staminali nel LA è stata indagata anche mediante l'attività dell'enzima telomerasi, proteina che provvede al mantenimento dei telomeri e utilizzata come marker per le SC pluripotenti. Insieme ai telomeri, questo enzima è caratteristico di cellule in fase proliferativa nei tessuti embrionali e nelle cellule germinali (87).

Nel LA sono presenti cellule che esprimono la trascrittasi inversa della telomerasi umana, il recettore per la proteina morfogenetica ossea, nota per l'importanza legata alla differenziazione di cellule staminali e progenitrici in diversi tipi cellulari mesenchimali, nonché il LIF (il Fattore Inibente la Leucemia), fattore di crescita necessario per mantenere le SC in uno stato proliferativo ed indifferenziato.

Questi studi suggerirono che il LA può rappresentare una nuova fonte per l'isolamento di cellule staminali (OCT4+) esente dal dibattito etico riguardante la ricerca sulle cellule staminali embrionali; inoltre, a differenza delle cellule staminali embrionali, le colture di SC da LA non danno origine a teratomi (88).

È stato anche dimostrato che esse esprimono i marker delle cellule staminali neuronali (89) e sintetizzano e rilasciano Acetilcolina e Catecolamine (90) e che le SC del LA

umane indotte in senso neurogenico sono capaci di integrarsi nel parenchima cerebrale di topi affetti da degenerazione delle cellule cerebrali (91). Considerando il grande potenziale della terapia cellulare basata sull'uso di cellule staminali fetali e la flessibilità dell'ingegneria tissutale intrauterina, il LA può essere un'eccellente sorgente alternativa per lo studio di cellule staminali umane (92).

APPROCCI DI MEDICINA RIGENERATIVA PER IL TRATTAMENTO DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative costituiscono un'eterogenea famiglia di patologie a carico del sistema nervoso centrale (SNC) con eziopatogenesi e sintomatologie ben distinte tra loro, caratterizzate da un processo cronico e selettivo di morte cellulare neuronale e prive di cura.

Le cause della patogenesi di queste malattie neurodegenerative sono molteplici e includono le mutazioni genetiche (93), l'accumulo intracellulare di proteine tossiche (e.g. la β -amiloide nella malattia di Alzheimer) (94) o disfunzioni mitocondriali che portano alla morte cellulare (95), ma il maggiore fattore di rischio per queste patologie è rappresentato dai processi degenerativi legati all'età.

Oltre alla neurodegenerazione anche l'ischemia è un'altra condizione che può portare rapidamente a perdita delle funzioni cerebrali. L'ischemia può essere causata da eventi trombotici o emorragici e porta a un danno neurologico permanente (96).

Tale deterioramento neuronale è causa di un inevitabile danno delle funzioni cerebrali che si manifesta, a seconda del tipo di malattia, con deficit cognitivi, demenza, alterazioni motorie e disturbi comportamentali più o meno gravi.

Anche se la sintomatologia e alcune fasi della progressione patologica sono spesso sovrapponibili, si distinguono tuttavia patologie ben definite, tra cui si annoverano il morbo di Parkinson, la malattia di Alzheimer, la malattia di Huntington, la sclerosi laterale amiotrofica e la sclerosi multipla.

MORBO DI PARKINSON

Il morbo di Parkinson (MP) è una malattia neurodegenerativa, ad evoluzione lenta ma progressiva, che coinvolge principalmente alcune funzioni quali il controllo dei movimenti e dell'equilibrio. Questo disturbo progressivo è caratterizzato da tre sintomi motori cardinali: bradicinesia, tremore e rigidità, associati a vari disturbi non motori. Il MP ha una eziologia non definita ed è correlata ad una degenerazione neuronale a carico principalmente della pars compacta della sostanza nera, dove sono presenti caratteristiche inclusioni citoplasmatiche definite corpi di Lewy.

Epidemiologia

La malattia è presente in tutto il mondo ed in tutti i gruppi etnici; si riscontra in entrambi i sessi, con una lieve prevalenza, forse, in quello maschile. L'età media di esordio è intorno ai 58-60 anni, ma circa il 5% dei pazienti può presentare un esordio giovanile tra i 21 ed i 40 anni. Il MP prima dei 20 anni è estremamente raro, sopra i 60 anni colpisce 1-2% della popolazione, mentre la percentuale sale al 3-5% quando l'età è superiore agli 85 anni. Circa il 20% dei pazienti presenta una storia familiare positiva per la malattia e si stima che i familiari di persone affette da malattia di Parkinson presentino, rispetto alla popolazione generale, un rischio di sviluppare la patologia lievemente superiore.

Eziopatogenesi

il MP è un disturbo caratterizzato dalla progressiva degenerazione e dalla morte di neuroni selezionati, ma eterogenei, che includono i neuroni dopaminergici della pars compacta della substantia nigra, cosicché quando questi neuroni scendono sotto la soglia del 30%, compaiono i primi sintomi tipici della malattia. Normalmente la

quantità di cellule della sostanza nigra diminuisce progressivamente da 425.000 a 200.000 a 80 anni (102); viene meno così la protezione delle cellule contenenti dopamina ed il cervello delle persone anziane è inevitabilmente più predisposto alla malattia.

La perdita dei markers dopaminergici si verifica nel putamen dorsale in modo molto rapido ed è presumibilmente completa entro 4 anni dalla diagnosi (97).

Oltre che una marcata sostituzione delle cellule (<100.000) con deposito di gliosi sono stati rinvenuti nella substantia nigra di malati di Parkinson anche gliosi astrocitica, neuromelanina extracellulare, macrofagi neuromelanino-trasportatori e corpi pallidi. Tuttavia, la modalità di perdita di cellule nel MP differisce da quella dovuta al normale invecchiamento.

Il preciso meccanismo responsabile della morte delle cellule è ancora largamente sconosciuto e può essere innescato da vari fattori tra cui disfunzione mitocondriale, stress ossidativo, azioni di citotossine con conseguente eccessiva formazione di ossido nitrico, deficienza di supporto neurotrofico o meccanismi immunitari. Sebbene ancora controverso, il percorso finale comune sembra essere l'induzione di apoptosi nei neuroni dopaminergici nigrali.

L'eziologia del Parkinson, sebbene ancora sconosciuta, è multifattoriale e consta di componenti ambientali e genetici. La maggior parte dei casi della malattia sono sporadici nella popolazione e solo in rari casi di Parkinson avvengono mutazioni genetiche familiari di malattia (98). I fattori eziologici coinvolti sembrano essere l'ereditarietà, le lesioni cerebrali, possibili infezioni, neurotossine endogene, fattori ambientali e alterate espressioni geniche (99). I fattori di rischio sono vari, tra cui l'esposizione a sostanze tossiche (pesticidi), traumi cranici e l'arteriosclerosi, ma l'età costituisce sicuramente il fattore di rischio più consistente (100).

Una delle ipotesi patogenetiche descrive come alla base del MP ci siano alterazioni della funzione mitocondriale e del sistema ubiquitina-proteasoma. Questo porterebbe

ad un accumulo di proteine che si assemblano formando aggregati proteici citotossici (101).

Anche alcune mutazioni geniche sono associate alla malattia di Parkinson: è stato visto, infatti, che il gene PARK 1 codifica per la proteina α -sinucleina, ritrovata nei corpi di Lewy, e la cui presenza costituisce uno dei criteri di diagnosi anatomica essenziale del morbo di Parkinson.

A livello della substantia nigra di pazienti con MP è stata osservata anche un aumento della concentrazione di ferro (Fe) da cui può nascere un aumento delle specie reattive dell'ossigeno e l'aggregazione intracellulare di alfa-sinucleina, con il risultato di una distruzione neuronale ossidativa in quell'area cerebrale. Tutto ciò è probabilmente dovuto alla riduzione della capacità chelante del ferro, con la produzione di radicali liberi ossidanti.

Le forme precoci di morbo di Parkinson sono frequentemente associate ad una mutazione del gene PARK2 che codifica per una proteina chiamata parkina. La parkina, proteina ligasi di 465 aminoacidi, è dotata di un segmento iniziale simile a quello dell'ubiquitina; a seguito di questa similitudine si è perciò ipotizzato che anche PARK2 partecipi alla degradazione endocellulare delle proteine, svolgendo anche una funzione di ubiquitina-ligasi che media la rimozione dei mitocondri mal funzionanti. L'eventuale mancata rimozione di mitocondri mal funzionanti, quindi, potrebbe portare a danno cellulare e indurre il MP (102).

La malattia di Parkinson potrebbe inoltre risiedere in un aumentato turnover della dopamina ad opera di alterazioni della respirazione mitocondriale a livello cerebrale e della formazione del perossido di idrogeno (H_2O_2) da parte delle monoaminossidasi (MAO) (103). Le MAO cerebrali sono in grado di ossidare la dopamina producendo perossido di idrogeno il quale, se non adeguatamente neutralizzato, porta a morte cellulare tramite la perossidazione lipidica delle membrane. Probabilmente la mancanza del complesso I della catena respiratoria mitocondriale a livello del mesencefalo è responsabile della maggior parte delle apoptosi neurali nella MP, con

serio danno dei neuroni dopaminergici. Si ritiene che alla base ci sia la mutazione di proteine come PINK1 e LRRK2 con conseguente disfunzione mitocondriale e formazione di radicali liberi dell'ossigeno (104).

E' stata recentemente dimostrata, inoltre, l'implicazione della proteina Ambra1 nella malattia di Parkinson: Ambra1 interagisce con la proteina Parkina, portando ad una forma di mitofagia parkina-mediata (105).

Studi successivi hanno evidenziato anche che la mutazione in eterozigosi del gene codificante per l'enzima glucocerebrosidasi è legata ad una maggiore probabilità di sviluppare il MP (106).

Oltre a un'eziopatogenesi genetica, è stata ipotizzata anche una componente tossico-ambientale: sintomi parkinsoniani possono essere causati da sostanze chimiche presenti nell'ambiente (manganese, bacche di Cycas, ma anche insetticidi ed erbicidi) (107) e in droghe (MPTP, contaminante dell'eroina sintetica) (108). Anche alcuni farmaci come fenotiazine, butirrofenoli e metoclopramide possono indurre parkinsonismi interferendo con i meccanismi di accumulo presinaptico della dopamina o bloccando i recettori dopaminergici postsinaptici.

Il rischio di malattia aumenta inoltre in alcune professioni che espongono i lavoratori a metalli pesanti (ferro, zinco, rame). L'esposizione al fumo di sigaretta e la caffeina, invece, sembrano essere fattori protettivi (109; 110).

Fisiologia

I gangli della base rappresentano un gruppo di nuclei sottocorticali formati da 4 nuclei:

- nucleo striato: suddiviso in nucleo caudato, putamen e nucleo accumbens;
- globo pallido: formato da una porzione interna ed una esterna;
- nucleo subtalamico;
- substantia nigra.

Il nucleo striato è la regione afferente deputata alla ricezione degli impulsi inviati dalla corteccia cerebrale e dal talamo. A sua volta il nucleo striato è collegato strettamente al globo pallido e alla substantia nigra, da cui partono invece impulsi efferenti per la corteccia cerebrale.

I gangli della base sono coinvolti principalmente nel controllo del movimento; questa però non è la loro unica funzione. Infatti sono coinvolti anche in aspetti motivazionali, emozionali e attentivi che guidano i movimenti finalizzati (111).

Neuropatologia

Le due principali caratteristiche neuropatologiche del MP sono la progressiva e profonda perdita dei neuroni dopaminergici neuromelanina-positivi della substantia nigra pars compacta (SNpc) mesencefalica e la presenza dei corpi di Lewy (LB): inclusioni eosinofile intracitoplasmatiche neuronali costituite principalmente da aggregati proteici contenenti alfa-sinucleina ed ubiquitina (112).

Nel MP sono anche coinvolte altre aree cerebrali, seppur in minor modo; è possibile infatti riscontrare una perdita neuronale anche a livello del locus coeruleus, della sostanza innominata, dei nuclei viscerali del tronco e della corteccia cerebrale (113).

Clinica

I sintomi della malattia di Parkinson derivano dalla perdita selettiva dei neuroni dopaminergici del mesencefalo e delle loro sinapsi, che rilasciano dopamina all'interno delle regioni cerebrali del caudato e del putamen. Meccanismi fisiologici compensatori nel cervello possono rallentare lo sviluppo dei sintomi fino a quando viene perso approssimativamente il 60-80% dei neuroni dopaminergici (114). I sintomi principali di malattia di Parkinson sono tremori a riposo, rigidità, bradi/acinesia e instabilità posturale.

I sintomi non motori includono problemi urinari, costipazioni, problemi alla pelle, difficoltà nel dormire, ipotensione ortostatica, depressione e altri cambiamenti emozionali (115).

Nella maggior parte dei casi il sintomo d'esordio è il tremore, presente all'esordio della MP in circa il 70% dei casi; ma in una percentuale non indifferente l'esordio è caratterizzato da impaccio motorio, senso di rigidità o disturbi aspecifici. In genere, all'esordio la sintomatologia è unilaterale e può restare tale anche per anni.

Terapia

La terapia della MP è una terapia sintomatica; non è quindi possibile curare la malattia, ma si può migliorare la sintomatologia e quindi la qualità della vita del paziente.

Terapia farmacologica

Lo scopo della terapia farmacologica nel MP è quello di ripristinare la trasmissione dopaminergica a livello del corpo striato.

- **Levodopa:** ad oggi la levodopa (L-DOPA) è il farmaco più efficace e più utilizzato nel MP. La L-DOPA è utilizzata come profarmaco della dopamina, che non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, per ripristinare i livelli di dopamina in questa zona. La L-DOPA, grazie ad un sistema di trasporto di amminoacidi, riesce ad entrare nel sistema nervoso centrale; qui tramite l'enzima DOPA decarbossilasi viene metabolizzata in dopamina. La terapia con L-DOPA dà un ottimale miglioramento dei sintomi motori, ma purtroppo è efficace solo per alcuni anni. Questa fase viene definita "luna di miele". Negli anni successivi la somministrazione ulteriore di levodopa è correlata nella maggior parte dei pazienti all'insorgenza delle complicanze motorie (fase intermedia-avanzata di malattia) con frequenti

discinesie e fluttuazioni motorie, ed alternanza nel corso della giornata di fasi di blocco motorio a fasi di controllo dei movimenti (fase on-off) (116).

- **farmaci dopamino-agonisti (DA):** i DA si legano ai recettori dopaminergici e attivano i sistemi trasduzionali endocellulari che portano ad una immediata modulazione del potenziale d'azione a livello neuronale e, più tardivamente, alla trascrizione del DNA in RNA e all'induzione proteica. Questi farmaci provocano più frequentemente effetti collaterali rispetto alla levodopa; i disturbi riscontrati più di frequente sono nausea, ipotensione ortostatica, edemi degli arti inferiori, sonnolenza diurna e disturbi del controllo degli impulsi quali gioco d'azzardo patologico ed ipersessualità (117).
- **Inibitori della MAO B (I-MAO B):** questi farmaci riducono il catabolismo della dopamina aumentandone la biodisponibilità a livello cerebrale. Nonostante siano molto ben tollerati, non rappresentano la prima scelta terapeutica poiché la loro efficacia è minore dei DA.
- **inibitori della catecol-o-metil transferasi (COMT):** rallentano l'eliminazione plasmatica della levodopa aumentandone la biodisponibilità. Vengono utilizzati in associazione alla levodopa.
- **Amantadina:** farmaco antivirale con modesto effetto sintomatico antiparkinsoniano.
- **Anticolinergici:** il loro utilizzo si è molto ridotto a causa dei frequenti effetti collaterali periferici (tachicardia, ritenzione urinaria, stipsi, deficit dell'accomodazione e xerostomia).

Terapia chirurgica: stimolazione cerebrale profonda

La terapia chirurgica nella MP avanzata si avvale del posizionamento bilaterale di un elettrodo stimolante nel nucleo subtalamico o, più di rado, nel globo pallido interno. Gli elettrodi vengono collegati ad un generatore di impulsi posto in regione

sottoclaveare, il quale viene programmato dall'esterno in modo da erogare una stimolazione elettrica continua ad alta frequenza (130 Hz). La stimolazione ad alta frequenza, attraverso un meccanismo non ancora completamente noto, riporta i neuroni del nucleo target ad una modalità di funzionamento più fisiologica.

Questa terapia, sebbene non curativa, porta ad un miglior controllo dei sintomi ad essa associati, con riduzione delle fluttuazioni motorie (fenomeno on/off), riduzione della terapia farmacologica e quindi delle sue complicanze (118). L'indicazione alla stimolazione cerebrale profonda si pone per pazienti in fase intermedia-avanzata di malattia, responsivi alla levodopa e affetti da complicanze motorie non controllabili dalle terapie tradizionali (119).

MALATTIA DI ALZHEIMER

La malattia di Alzheimer (AD) è una patologia neurodegenerativa che oggi rappresenta la più comune forma di demenza nell'anziano.

Al giorno d'oggi, si possono distinguere due tipi diversi di AD in base all'età di insorgenza e alla familiarità: AD ad insorgenza tardiva (Late Onset AD - LOAD) e AD familiare (Familiar AD - FAD). La forma FAD è caratterizzata da un'insorgenza precoce (prima dei 60 anni) e una trasmissione autosomica dominante e rappresenta l'1% di tutti i casi di AD (120; 121; 122). Il LOAD invece è caratterizzato da un'insorgenza più tardiva (oltre i 60 anni) e un pattern molto complesso.

Epidemiologia

Al mondo ci sono circa 17 milioni di persone affette da AD e si prevede che nel 2030 il loro numero aumenterà fino a raggiungere i 70 milioni (123). In Italia si stima che ne siano affette circa 450000 persone, con un'incidenza annua di circa 120000 ed una prevalenza superiore al 20-25% nella popolazione oltre gli ottant'anni (124). L'AD sembra essere più frequente nel sesso femminile (125). Anche l'età e la familiarità per demenza sembrano essere fattori di rischio molto significativi, si è visto infatti che l'incidenza dell'AD aumenta progressivamente con l'età passando da valori dell'1% nella fascia di età compresa fra 60 e 70 anni al 6-8% ad 85 anni (126).

Eziopatogenesi

L'AD ha una eziologia multifattoriale in cui sono coinvolti sia fattori genetici sia fattori ambientali in gran parte sconosciuti.

Sono stati riscontrate alterazioni di tre geni in grado di condurre all'AD, strettamente legati alla β -amiloide, il principale componente proteico delle placche senili (127):

- il gene della proteina precursore dell'amiloide (APP, amyloid precursor protein) è una glicoproteina transmembrana da cui derivano i peptidi amiloidogenetici. Tale gene è situato sul cromosoma 21q ed è presente nel 10-15% delle forme familiari ed è responsabile di una forma della malattia ad esordio precoce (35-50 anni). Le mutazioni dell'APP possono aumentare la produzione di β -amiloide, oppure la quantità di frammenti più lunghi di questo peptide, o ancora modificarne il potenziale amiloidogenico.
- il gene per le presenilina 1 (PSEN1); la PS1 (presenilina-1) è una delle proteine responsabili dell'attività γ -secretasica. PSEN1 è localizzato sul cromosoma 14q e viene ritrovato nel 70% delle forme familiari. Le mutazioni a carico di questo gene risultano nell'aumentata sintesi di β -amiloide, nell'alterazione della regolazione del Ca^{2+} e forse nell'apoptosi mediata da proteine G.
- il gene per la presenilina 2 (PSEN2) si trova sul cromosoma 1q. Le sue mutazioni associate a forme familiari sono molto rare. La presenilina 2 (PS2) è la seconda proteina, omologa a PS1, che è stata ipotizzata avere una funzione γ -secretasica e che sembra agire in sinergia con PS1. Le mutazioni a carico di questo gene, inducono effetti analoghi a quelli di PS1, con l'unica differenza che l'esordio della malattia è più tardivo, tra i 40 e i 55 anni.

Mutazioni in APP, PS1 e PS2 spiegano il 40% dei casi di AD familiare. L'insorgenza della malattia di Alzheimer infatti è influenzata anche da altri fattori genetici, conosciuti come fattori di rischio. Tra questi il più importante è il gene dell'apolipoproteina-E (ApoE).

L'ApoE è una proteina plasmatica coinvolta nel trasporto del colesterolo capace di legarsi all'amiloide che è considerato finora il più importante fattore di rischio nello sviluppo della forma ad esordio tardivo (128).

L'ApoE è stata ritrovata a livello dei depositi intraparenchimali e vasali di β -amiloide ed è capace di interagire con essi favorendo la formazione delle placche. Inoltre, l'interazione fisica tra ApoE e β -amiloide sembra influenzare l'efficienza della clearance

della β -amiloide stessa (129). Esistono tre forme alleliche di tale proteina (E2, E3, E4) che codificano per altrettante isoforme della proteina.

È stato dimostrato che gli individui eterozigoti per l'allele E4 hanno un rischio circa tre volte maggiore di sviluppare la malattia nelle forme ad esordio tardivo, sporadiche e familiari, mentre quelli omozigoti hanno un rischio 15 volte maggiore rispetto a chi non possiede E4. Il genotipo ApoE2 svolgerebbe invece un effetto protettivo verso la malattia. Purtroppo però la genotipizzazione dell'ApoE non è sufficiente per effettuare la diagnosi dell'AD poiché quasi la metà dei soggetti affetti non possiede questo allele, che è invece presente in una piccola percentuale di soggetti sani (130).

Tra i fattori di rischio dell'AD potrebbe essere annoverato il trauma cranico, in particolare se colpisce soggetti con più di 50 anni di età (131).

Altri fattori di rischio collegati alla malattia di Alzheimer ad esordio tardivo sono il complesso I del mtDNA, che favorisce la produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno nei mitocondri dei neuroni, e polimorfismi del mtDNA (132).

Fattori protettivi per l'AD sembrano essere composti antiossidanti, in particolare il resveratrolo, che sembra essere capace di rallentare lo sviluppo delle placche di beta amiloide e di promuoverne la degradazione (133).

Nell'AD la conseguenza della degenerazione neuronale che comporta perdita di spine dendritiche, di sinapsi ed infine dei neuroni stessi è l'atrofia. La perdita neuronale viene accompagnata dalla proliferazione reattiva delle cellule della neuroglia, cioè le cellule dello stroma di sostegno del tessuto nervoso (gliosi).

A causa del coinvolgimento dell'ippocampo e dell'amigdala nelle fasi precoci della malattia è possibile riscontrare la cosiddetta "deafferentazione limbica": non si ha più l'integrazione delle informazioni sensoriali tra le aree primarie e le aree associative della corteccia, con conseguenti deficienze non solo in termini di memoria, ma anche di motivazioni e affetti (134).

Gli elementi istopatologici caratteristici dell'AD sono rappresentati dalle placche senili costituite principalmente dal peptide β -amiloide, dagli ammassi neurofibrillari intraneuronali (costituiti da proteina tau iperfosforilata) e l'angiopatia amiloidea. Alcuni di questi elementi si riscontrano anche nel cervello senescente normale, variando nella condizione patologica in termini di densità e distribuzione.

Le placche senili si ritrovano principalmente a livello delle aree cerebrali quali ippocampo, amigdala e neocorteccia. Si formano in seguito alla deposizione extracellulare di aggregati di β -amiloide; tale peptide deriva da un taglio proteolitico del precursore della APP ad opera di β -secretasi.

Le placche di β -amiloide sembrano essere capaci di generare gruppi ossidativi che vanno a danneggiare il citoplasma delle cellule cerebrali. La β -amiloide si aggrega in placche costituite da un nucleo centrale di amiloide circondato da neuriti distrofici, astrociti reattivi e microglia attivata (135) che ossidano la membrana cellulare rilasciando nel citoplasma ioni calcio portando a danno e morte cellulare (136). La β -amiloide, inoltre, depositandosi crea danni diretti ai neuroni inibendo in maniera diretta i contatti sinaptici (137).

Anche la deposizione di β -amiloide sulle pareti delle arteriole cerebrali e leptomeningee genera una risposta infiammatoria attivando le cellule gliali, le quali producono citochine e quindi infiammazione.

Le degenerazioni neurofibrillari sono costituite da inclusioni a livello del citoplasma dei neuroni composte da fasci compatti di filamenti; tali strutture sono costituite da filamenti a doppia elica e filamenti lineari. I filamenti a doppia elica sono maggiormente formati da proteina tau iperfosforilata (138) che sembra avere un ruolo chiave nella diffusione cerebrale dell'AD. Sembra infatti che tramite la proteina tau l'AD diffonda nel cervello come un'infezione, passando da una cellula all'altra (139).

Neuropatologia

Il dato neuropatologico più rilevante nei malati di Alzheimer è rappresentato da una perdita neuronale e sinaptica a livello di vari sistemi neurotrasmettitoriali, primo dei quali il sistema colinergico del prosencefalo basale, sebbene alterazioni importanti si osservano anche a livello dei sistemi neuronali che usano come neurotrasmettitore la noradrenalina, la serotonina, il glutammato, la sostanza P e la somatostatina.

Rimangono sostanzialmente inalterati il sistema dopaminergico e quelli utilizzando neuropeptidi (140).

Nei malati di AD l'encefalo risulta ridotto sia in peso che in volume ed è presente una importante e diffusa atrofia in tutti i lobi, maggiormente a livello delle circonvoluzioni temporali inferiori. Anche la corteccia cerebrale risulta assottigliata, in modo più evidente a livello dell'ippocampo e delle regioni paraippocampali ed in modo meno marcato a livello della corteccia visiva e delle aree pre e post rolandiche (141). Questa atrofia viene compensata da un allargamento delle cavità ventricolari secondario alla perdita di parenchima.

Le placche senili o placche amiloidi sono il segno patognomonico dell'AD; queste placche sono ammassi extracellulari composti da aggregati filamentosi di β amiloide.

Nelle placche amiloidi in particolare si ritrova il peptide $A\beta$ 1-42, il quale è molto più idrofobico particolarmente propenso a formare aggregati, rispetto alla forma $A\beta$ 1-40, fisiologicamente più abbondante e comunque presente all'interno delle placche (142).

Caratteristiche della malattia sono inoltre la presenza di placche senili extracellulari e di ammassi neurofibrillari intracellulari localizzate principalmente nell'amigdala, ippocampo e nella corteccia entorinale del lobo temporale, mentre sembrano meno coinvolte le zone parietali e frontali della corteccia associativa (143).

Clinica

La maggior parte dei pazienti sviluppa i primi sintomi della malattia dopo i 65 anni ma nel 5% dei casi si ha un esordio più precoce, in età presenile. La familiarità è particolarmente frequente proprio nei casi ad esordio precoce; nell'1% dei casi infatti l'Alzheimer può essere considerato una patologia ereditaria, a trasmissione

autosomica dominante e ad alta penetranza. Le forme di AD familiare possono essere a loro volta suddivise in forma tardiva familiare e forma precoce familiare.

Nonostante le diverse cause, entrambe le forme di AD sono definite dalle stesse caratteristiche patologiche: un progressivo declino delle funzioni cognitive, in particolare riguardo la memoria di eventi remoti o recenti, il linguaggio, la capacità di giudizio, l'attenzione e le funzioni esecutive come pianificazione e organizzazione (144). Questi disturbi comportamentali progrediscono durante il corso della malattia (145) e vengono accompagnati da modificazioni comportamentali e apatia già dai primi stadi della malattia seguiti, nelle fasi più tardive, da psicosi e agitazione (146). Alterazioni ai sistemi motori e sensoriali restano invece poco comuni fino agli ultimi stadi della malattia (147). L'esordio clinico della malattia è variabile da soggetto a soggetto ma di solito si rivela insidioso. Il primo sintomo evidenziabile è rappresentato da una significativa perdita della memoria, soprattutto per eventi recenti, che poi si aggrava progressivamente. Vengono individuate tre fasi di malattia:

- demenza lieve: dura in media 2-4 anni ed è caratterizzata da deficit della memoria a breve e medio termine che passano inosservati o vengono minimizzati dal paziente. La consapevolezza del deficit mnesico e soprattutto le difficoltà nella vita quotidiana che esso comporta possono determinare una sindrome depressiva che contribuisce alla difficoltà diagnostica della patologia. Vi è anche una diminuzione degli interessi ed un iniziale disorientamento nel tempo e nello spazio.
- demenza moderata: dura circa 2-10 anni; il deficit mnesico si aggrava maggiormente, così come il disorientamento topografico, spaziale e temporale. Compaiono turbe della personalità e il paziente tende a trascurare il proprio aspetto, la propria dieta e le attività quotidiane, con scadimento del rendimento lavorativo e diminuzione della partecipazione alla vita familiare. Diventano evidenti i disturbi del linguaggio e delle funzioni simboliche, con difficoltà a reperire le parole, a scrivere, ad eseguire calcoli.

- demenza grave: dura in media 3 anni e si assiste alla compromissione anche della componente mnesica remota. Le funzioni faciche, prassiche, gnosiche e l'orientamento spazio-temporale sono gravemente compromesse. Il soggetto spesso non è più in grado di riconoscere i propri familiari, di compiere gli atti quotidiani della vita, di riconoscere oggetti di uso comune e la propria casa. Possono essere presenti quadri di franca apatia o, viceversa, di "affaccendamento inoperoso". Si accentuano i disturbi del pensiero e, talora, possono comparire disturbi di tipo allucinatorio. Il movimento viene via via compromesso, fino all'allettamento e alla perdita di ogni riflesso sfinterico; il decesso avviene generalmente per complicanze infettive.

Terapia

Ad oggi, purtroppo, non esiste un farmaco in grado di influire sul decorso dell'AD, sebbene alcuni benefici possono essere ottenuti utilizzando gli inibitori centrali dell'acetilcolinesterasi che sono in grado di migliorare alcuni sintomi cognitivi, soprattutto nelle prime fasi di malattia. In fase di malattia avanzata-severa, invece, è possibile utilizzare la memantina, antagonista dei recettori NMDA.

Nell'AD, inoltre, vengono utilizzati gli antipsicotici atipici per controllare i sintomi come la depressione (presente nel 40% dei pazienti con AD), i disturbi del sonno ed i disturbi comportamentali quali alterazioni della personalità, disturbi psicotici ed agitazione psicomotoria.

MSC NELLA CURA DELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Negli attuali studi clinici vengono utilizzate principalmente tre fonti di cellule staminali: cellule staminali embrionali (ES), cellule staminali neurali (NSC) e cellule staminali mesenchimali (MSC) (148).

Le NSC sono state isolate più recentemente anche dal Sistema Nervoso Centrale (SNC) adulto e possiedono la capacità di autorigenerarsi e di differenziare nei tre principali fenotipi neuro-gliali: cellule neuronali, astrocitarie ed oligodendrocitarie. Nonostante la presenza di queste cellule staminali, però, il SNC presenta una ridotta capacità di autorigenerazione e ricostituzione dei circuiti neuronali funzionali danneggiati in seguito a lesione traumatica, cerebrovascolare (e.s. ictus ischemico), o neurodegenerativa (e.s. Malattia di Parkinson). Il trapianto di NSC nelle aree cerebrali danneggiate indurrebbe la proliferazione dei progenitori neuronali tramite secrezione paracrina di fattori stimolanti il differenziamento cellulare, ma con l'utilizzo terapeutico di tali cellule si sono riscontrati problemi nel controllo della crescita e della differenziazione cellulare (149).

La capacità delle ES di auto-rinnovarsi e di sostituire le cellule mature è fondamentale per l'ontogenesi e la rigenerazione dei tessuti, ma il fatto che, probabilmente, le cellule staminali più potenti possono essere derivate dalla massa cellulare interna durante lo sviluppo embrionale pone molti problemi etici. Di conseguenza, sono numerose le ricerche di fonti umane di cellule staminali eticamente utilizzabili, che abbiano il potenziale di differenziarsi in linee specifiche.

Le cellule staminali mesenchimali date le loro caratteristiche, rappresentano uno dei tipi di cellule staminali più adatti all'utilizzo nel trattamento di numerose malattie, in particolare per la cura delle malattie neurodegenerative e in pazienti con danno a livello cerebrale. La facile isolabilità, coltura e stabilità fenotipica, nonché la loro

multipotenzialità e ipoimmunogenicità conferiscono a queste cellule un enorme potenziale terapeutico.

Per le patologie neurodegenerative sembra indispensabile o il trapianto eterologo delle MSC o una aumentata mobilitazione di queste dal midollo osseo del paziente stesso mediante specifici protocolli clinici. Numerosi studi hanno dimostrato l'elevata capacità di homing delle MSC somministrate e il loro successivo differenziamento nei siti specifici di danno cellulare, o comunque il loro ruolo trofico e di promozione della rigenerazione nervosa.

Questi studi, accompagnati a studi *in vitro* in cui si dimostra l'elevata capacità differenziativa e di supporto delle MSC, le rendono estremamente interessanti per la cura di numerose patologie.

Per quanto riguarda il danno cerebrale, molti studi hanno dimostrato un miglioramento funzionale dopo somministrazione di MSC sia a livello sistemico che locale a seguito di danno cerebrale traumatico (150; 151; 152). Si è visto infatti che oltre alle capacità di rinnovamento e riparazione dei tessuti, le MSC hanno anche proprietà immunomodulatorie; sono infatti ipoimmunogeniche in quanto esprimono solo l'MHC I e non l'MHC II.

Le MSC sono in grado di svolgere una forte azione antinfiammatoria, con riduzione dell'attivazione della microglia, del TNF-alfa, dell'espressione dell'mRNA dell'ossido nitrico sintetasi inducibile. Tutto ciò si traduce in un effetto neuroprotettivo sui neuroni dopaminergici.

Le MSC sono inoltre in grado di indurre anergia nei linfociti T anche in condizioni di non compatibilità immunologica e possono inibire la maggior parte delle cellule coinvolte nella risposta immunitaria grazie alla loro azione immunosoppressiva sui linfociti T e B, sul differenziamento e sulle funzioni delle cellule dendritiche. Ancora non sono ben chiari i meccanismi alla base di questa attività immunosoppressiva, ma sembrano svolgere un ruolo chiave sia il contatto diretto tra MSC e cellule del sistema immunitario, sia il rilascio da parte delle MSC di fattori solubili come il transforming

growth factor (TGF β 1), l'hepatocyte growth factor (HGF), la prostaglandina E2 (PGE 2) e l'indoleamina 2,3 diossigenasi.

Queste caratteristiche possono costituire una possibile strategia di cura per malattie su base autoimmune quali la Sclerosi Multipla (153).

Potenziali problemi

La terapia cellulare prevede l'integrazione tra terapia farmacologica classica, volta a limitare il danno neurologico, e l'infusione di cellule neuronali immature ancora capaci di formare estese connessioni assonali per il ripristino della funzionalità.

Il SNC adulto, a causa delle lunghe connessioni sinaptiche tra le diverse aree, possiede scarsa capacità di recupero cellulare endogeno e di riorganizzazione dei circuiti. Il trapianto di NSC può aiutare il SNC a sostituire cellule perdute per un processo neurodegenerativo o lesionale. In questo modo le cellule danneggiate verrebbero sostituite da nuove cellule capaci successivamente di differenziarsi ed integrarsi nei circuiti neuronali pre-esistenti.

Il problema di maggior rilievo per l'utilizzo di cellule staminali neuronali, è che le cellule staminali trapiantate non devono dare luogo a proliferazioni anomale e quindi a tumori. Inoltre le cellule staminali devono essere differenziate in neuroni: dovranno quindi essere elettricamente eccitabili, rilasciare adeguatamente i neurotrasmettitori, essere dotati di strutture proprie dei neuroni (processi dendritici, sinapsi) e avere una corretta espressione genica e queste proprietà devono essere riproducibili in più laboratori.

I neuroni derivati da cellule staminali devono sopravvivere nell'animale nel quale sono state trapiantate ed apportare modifiche positive nell'animale stesso (154).

Negli ultimi anni, grazie alla possibilità di isolare ed espandere *in vitro* cellule staminali neurali umane ottenute da cervello fetale o adulto o da cellule pluripotenti (ES ed iPS), le speranze di raggiungere risultati più soddisfacenti si sono moltiplicate.

Probabilmente la malattia candidata al trapianto di staminali è il Parkinson.

Questo per la selettività della lesione e per il numero relativamente limitato e circoscritto di neuroni dopaminergici da sostituire. Diverse staminali sono state proposte, a partire dalle mesenchimali o dalle cordonali, ma le evidenze disponibili in ambito preclinico sono limitate e il meccanismo ignoto.

Alcune opzioni terapeutiche riguardano il trapianto di cellule staminali neuronali nelle aree cerebrali danneggiate, inducendo così la proliferazione dei progenitori neuronali tramite secrezione paracrina di fattori stimolanti il differenziamento cellulare. Tuttavia, ci sono problemi nel controllo della crescita e della differenziazione di tali cellule (155).

Gli unici risultati consolidati e via via migliorati nel tempo nel modello animale sono stati ottenuti con i progenitori dopaminergici ottenuti da ES dalle quali è stato possibile ottenere neuroni dopaminergici funzionalmente attivi. Alcuni trial clinici mostrano il successo dell'iniezione locale di cellule staminali mesenchimali autologhe espanse ex-vivo per il trattamento: le MSC iniettate per via endovenosa migrano alla verso la zona danneggiata .

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Le MSC possono essere utilizzate in generale in tutti gli ambiti di applicazione della medicina rigenerativa, secondo diversi protocolli e vie di somministrazione; la speranza che queste cellule staminali abbiano il potenziale per trattare o curare le malattie neurodegenerative, per le quali le terapie efficaci sono carenti, giustifica gran parte del recente entusiasmo che riguarda le cellule staminali umane.

Le patologie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer e il morbo di Parkinson, sono caratterizzate dalla perdita irreversibile, lenta e progressiva di una o più funzioni del sistema nervoso.

Ad oggi, purtroppo, non esistono terapie risolutive per la cura di queste malattie, che vengono finora trattate solo a livello sintomatico, con scarsi risultati.

La possibilità di ottenere nuove cellule neuronali guidando il differenziamento delle cellule staminali potrebbe consentire nuovi approcci terapeutici.

Le MSC più studiate e meglio conosciute sono quelle isolate dal midollo osseo (BM), ma recentemente sono state ottenute cellule da tessuti fetali extraembrionali, come il liquido amniotico con caratteristiche addirittura migliori per quanto riguarda la capacità di proliferazione e di differenziazione multilineare. Esse possono essere considerate come intermedie tra quelle embrionali e quelle adulte, costituendo di fatto un'importante risorsa per l'isolamento di cellule staminali a scopo terapeutico.

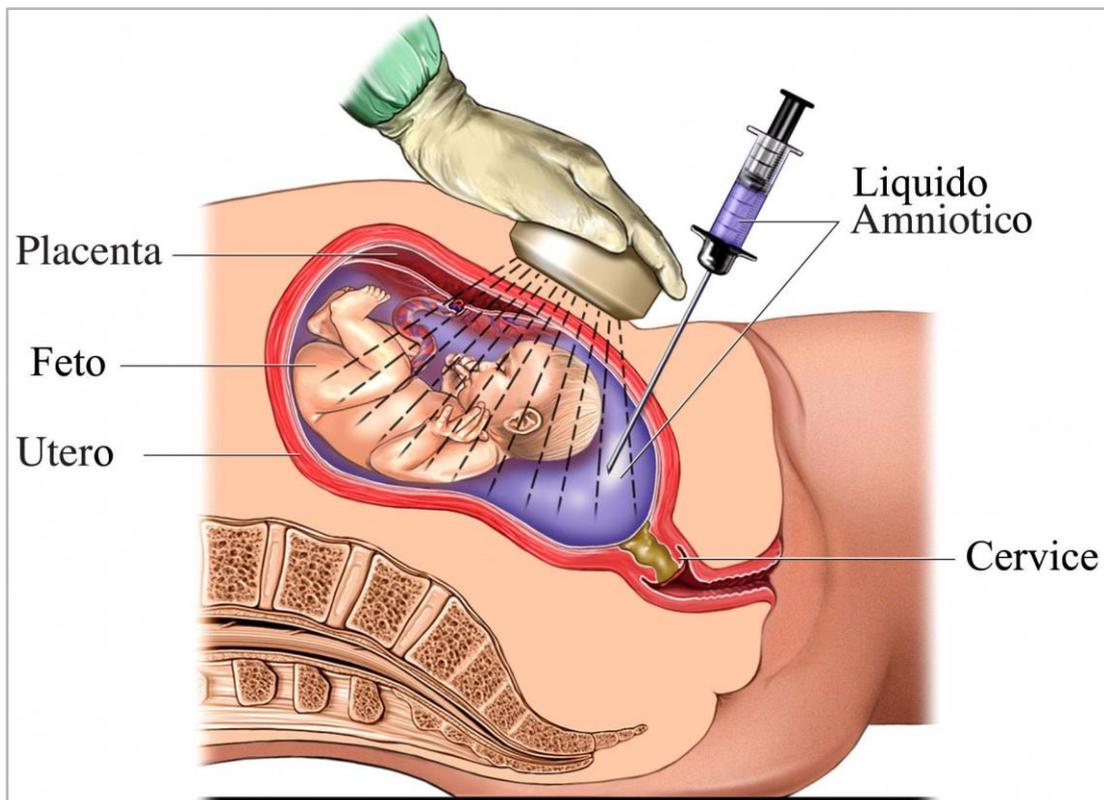
Scopo di tale tesi è l'analisi di cellule staminali ottenute da liquido amniotico e dell'induzione del loro differenziamento in cellule neuronali.

È stato quindi effettuato uno studio su cellule isolate da campioni di liquido amniotico prelevato tramite amniocentesi, quale fonte eticamente corretta di cellule staminali per la sperimentazione e per eventuali impieghi terapeutici.

MATERIALI E METODI

Amniocentesi

L'amniocentesi è una procedura che consente il prelievo transaddominale di liquido amniotico dalla cavità uterina per permettere di diagnosticare più precocemente, con elevata accuratezza e con rischi ridotti, tutte quelle affezioni per le quali si ha a disposizione la diagnosi molecolare.



L'esame del liquido amniotico serve a valutare il cariotipo fetale per valutare l'eventuale presenza di anomalie cromosomiche, consentendo quindi una diagnosi precoce di cromosomopatie o per la determinazione del sesso fetale nel sospetto di trasmissione ereditaria di malattie legate al cromosoma X. L'amniocentesi permette

anche il dosaggio enzimatico nelle cellule fetali per rivelare possibili malattie metaboliche del feto e il dosaggio di alfafetoproteina o di acetilcolinesterasi, sostanze presenti in quantità superiori alla norma nel liquido quando il feto presenta un'anomalia di sviluppo del tubo neurale (anencefalia, spina bifida, encefalocele, mielomeningocele). L'analisi del liquido amniotico, inoltre, consente la diagnosi di infezioni intrauterine tramite l'esecuzione di test molecolari, di corioamnionite mediante l'allestimento di colture e il dosaggio di marker biochimici di infezione e la valutazione della maturità polmonare fetale tramite il dosaggio del rapporto lecitina/sfingomielinina.

Il periodo ideale per eseguire l'amniocentesi è tra la 16^a e la 18^a settimana, quando l'amnios ha raggiunto dimensioni sufficienti perché la pratica non costituisca un rischio per il feto. Il rischio di aborto spontaneo connesso all'amniocentesi è di circa lo 0,5%, mentre quello di trauma fetale è ormai azzerato grazie alla guida ecografica in corso di amniocentesi (156).

Nel 1-2% delle procedure sussiste il rischio di perdita di liquido amniotico, ma nella quasi totalità dei casi tale evenienza la perdita si risolve spontaneamente. In pochi casi può verificarsi oligoidramnios (156). Altre potenziali problematiche sono le infezioni, che però incorrono solo se il prelievo non viene eseguito nella giusta modalità.

In Italia le indicazioni all'amniocentesi in regime di esenzione per l'amniocentesi ed in generale per la diagnostica prenatale invasiva sono:

- età materna superiore a 35 anni: il rischio di concepire un figlio con anomalie cromosomiche aumenta con l'età materna;
- precedente figlio con anomalia cromosomica;
- genitore portatore di anomalia cromosomica: le anomalie più frequenti in questo caso sono rappresentate dalle traslocazioni bilanciate;
- feto affetto con aumentato spessore della translucenza nucale allo screening ecografico e/o presenza di difetti fetali strutturali maggiori individuati con l'ecografia;

- test di screening biochimico e/o ecografico positivo (rischio > 1:250 calcolato su triplo test o test combinato);
- Infezione perinatale: ad esempio con Citomegalovirus o Parvovirus B19
- infiammazioni in utero (corionamnionite);
- valutazione della maturità polmonare fetale.

Amniocentesi precocissima

L'amniocentesi viene di norma eseguita durante il secondo trimestre di gestazione (16-18 settimane) per effettuare lo screening di anomalie genetiche e patologie cromosomiche o per ricercare agenti infettivi virali o protozoari.

L'indicazione per l'amniocentesi prima di tale settimana, in particolare all'undicesima settimana come alternativa alla villocentesi (prelievo dei villi coriali), risulta essere più rischiosa, sia in termini di aborti, sia per la minore quantità di cellule presenti nel liquido amniotico prelevato.

L'indicazione alla sua esecuzione è citogenetica.

Amniocentesi precoce

L'amniocentesi eseguita tra la 16^a e la 18^a settimana rappresenta attualmente la metodica più frequentemente utilizzata ai fini diagnostici di citogenetica prenatale, si può inoltre eseguire la ricerca di agenti infettivi virali o protozoari. Le metodiche più precoci sono caratterizzate da un maggior numero di riscontri patologici; ciò è dovuto ad una selezione naturale operante durante la gravidanza per i feti patologici. Inoltre la percentuale di anomalie riscontrate nelle procedure è sempre maggiore rispetto alla nascita.

Il rischio abortivo va comunque comparato con le percentuali di anomalie cromosomiche per l'età.

Amniocentesi tardiva

Il prelievo di liquido amniotico eseguito nell'ultimo trimestre di gravidanza può ovviamente comprendere tutte le indicazioni già esposte per le precedenti, ma solitamente si prefigge fini più specifici e mirati a diverse problematiche. Tra queste l'immunizzazione materno-fetale e la valutazione dello stato di maturità polmonare fetale.

Procedura d'esecuzione

La procedura deve essere eseguita in ambulatorio. Prima dell'esecuzione della procedura si effettua un esame ecografico per valutare numero e l'attività cardiaca dell'embrione o del feto, rilevarne la biometria e quindi l'effettiva epoca gestazionale. Ecograficamente viene localizzata la placenta e viene scelto il punto più idoneo per l'inserimento dell'ago.

Previa accurata disinfezione della cute dall'ombelico al pube con soluzione iodata si inserisce nel punto prescelto, sotto guida ecografica per via transombelicale, un ago per anestesia spinale di 20-22G con mandrino. Sempre tramite guida ecografica si segue l'avanzare dell'ago evitando placenta, feto e cordone ombelicale fino al raggiungimento della cavità amniotica. Si rimuove quindi il mandrino e con una piccola siringa si aspira un centilitro (cc) di liquido che verrà buttato via, per evitare di prelevare materiale proveniente dai tessuti materni attraversati. Si prelevano poi 20 cc di liquido amniotico. Il liquido prelevato viene suddiviso in 3 provette rispettando i criteri di sterilità (Linee Guida 2006 della Società Italiana per la diagnosi prenatale e medicina materno fetale). Al termine dell'intervento si ricerca la presenza del battito cardiaco fetale, monitorandone la frequenza per almeno 5-10 minuti.

Precauzioni

L'amniocentesi è un'indagine invasiva e presenta il rischio di trasmettere al feto malattie infettive in senso madre-feto nonché la possibilità di mettere in contatto dal punto di vista antigenico i due compartimenti. Si deve quindi evitare di eseguire esami invasivi in presenza di infezione materna in atto e gli esami preliminari devono escludere la presenza di agenti infettivi circolanti.

In caso di incompatibilità del sistema Rh tra madre e feto va effettuata la determinazione del gruppo sanguigno materno e in caso di pazienti Rh negative va effettuata la immunoprofilassi Anti-D.

Problematiche

Nelle amniocentesi l'insuccesso della coltura avviene in circa 1 caso su 300, inoltre è possibile una contaminazione del liquido amniotico con materiale materno ma con l'accortezza di gettare le prime gocce di liquido che fuoriescono dall'ago tale evenienza avviene molto raramente.

Nel liquido amniotico prelevato è possibile riscontrare aberrazioni cromosomiche generatesi *in vitro*, durante la coltura, note come pseudomosaicismi.

Le metodiche più precoci, inoltre, sono gravate da una maggior percentuale di feti patologici: ciò è dovuto ad una selezione naturale operante durante la gravidanza.

Isolamento e coltura di cellule staminali da liquido amniotico

9 campioni di liquido amniotico (3 ml) sono stati prelevati, previo consenso informato, da donne che si sottoponevano ad amniocentesi per diagnostica prenatale presso la Clinica Ostetrica e Ginecologica dell'Ospedale "G. Salesi" di Ancona.

Le amniocentesi sono state eseguite nel secondo trimestre di gravidanza, tra la 16^a e la 18^a settimana di gestazione.

Le donatrici avevano un'età compresa tra i 35 e i 40 anni e non erano portatrici di anomalie cromosomiche.

I campioni sono stati subito trasportati in provette sterili presso il laboratorio di Istologia, nel Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari della Facoltà di Medicina e Chirurgia di Ancona.

In laboratorio i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 1200 rpm; nei campioni è stato facilmente identificabile un pellet cellulare corrispondente agli amniociti che, dopo aver aspirato il liquido sovrastante, sono stati messi in coltura su pozzetti di una piastra per colture cellulari, in incubatore a 37° C con 5% di CO₂.

La morfologia cellulare è stata esaminata nel tempo mediante microscopia a contrasto di fase (Leica DMIL, Leica Microsystem gmbH, Wetzalan, Germania).

La vitalità e il tasso di proliferazione delle cellule in coltura sono stati valutati tramite contatore automatico di cellule (Invitrogen, Milano, Italia) e studio del tempo di duplicazione cellulare (Doubling Time, DT). L'analisi del DT è stata eseguita seminando le cellule in coltura ad una concentrazione di 5x10³ cell/cm² e il DT è stato calcolato tramite algoritmo dedicato:

$$DT = \frac{t \times \log 2}{\log N_t - \log N_0}$$

Dove t è il tempo di coltura espresso in ore, N_t è il numero di cellule finali e N₀ è il numero di cellule iniziali (157).

Ogni tre giorni il terreno nei pozzetti è stato sostituito con mezzo di coltura fresco, fino all'isolamento di cellule adese. Arrivate a confluenza, le cellule sono state staccate dal pozzetto con una soluzione Tripsina-EDTA, previo lavaggio in PBS e messe in coltura in fiasche prima da 25 cm², poi da 75 cm² per ottenere un numero sufficiente di cellule per poter effettuare le analisi successive.

Terreno di coltura utilizzato

Per l'isolamento delle MSCs è stato utilizzato il terreno di coltura MSCGM, ottenuto aggiungendo al terreno MSCBM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium; Lonza Group Ltd, Basilea, Svizzera), un supplemento di crescita per cellule mesenchimali MCGS (Mesenchymal Cell Growth Supplement; Lonza).

Caratterizzazione della staminalità

La staminalità delle cellule isolate da liquido amniotico (AFMSC) è stata valutata in base ai criteri minimi per l'identificazione delle MSC umane (158) per cui le cellule staminali devono essere dotate di:

- uno specifico profilo immunofenotipico, evidenziato mediante analisi citofluorimetrica;
- capacità di crescita su substrati di plastica;
- capacità di differenziare in senso adipogenico, osteogenico, condrogenico.

La caratterizzazione fenotipica delle MSC umane si basa sulla loro positività per alcuni antigeni non esclusivi delle MSC e sulla negatività per altri antigeni tipicamente espressi dalle cellule di derivazione emopoietica.

Le popolazioni cellulari isolate dalla messa in coltura dei liquidi amniotici sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica per la valutazione dell'espressione dei seguenti markers di superficie:

- **HLA-ABC** e **HLA-DR**: caratteristici dei complessi maggiori di istocompatibilità HLA, rispettivamente di classe I e di classe II
- **CD14**, marker delle cellule del sistema monocito macrofagico
- **CD19**, espresso dai linfociti B
- **CD34**, marker di differenziazione emopoietica
- **CD45**, antigene panleucocitario espresso anche dalle cellule della microglia
- **CD90**, marker delle cellule staminali mesenchimali

- **CD73** e **CD105**, marker di cellule mesenchimali e/o nervose ma non di cellule staminali embrionali.

È stata inoltre testata tramite RT-PCR l'espressione di geni correlati alla staminalità nelle cellule prelevate:

- **OCT4**: fortemente implicato nell'auto-rinnovamento delle cellule staminali indifferenziate embrionali, OCT4 è presente nelle cellule pluripotenti ed è necessario per la pluripotenza stessa.
- **SOX2**: assieme a OCT4 è indispensabile per il mantenimento delle cellule in uno stadio indifferenziato.
- **NANOG** è un fattore di trascrizione che mantiene la pluripotenza in cellule embrionali staminali. La sua espressione diminuisce dopo l'impianto con conseguente differenziazione delle cellule staminali
- **KLF4**: è un gene-chiave per la produzione di staminali pluripotenti e si è dimostrato essere un ottimo indicatore di staminalità sia per le ESC che per le MSC

Analisi citofluorimetrica

La citometria a flusso è una tecnica di misurazione multiparametrica di caratteristiche chimiche e fisiche delle cellule o, per estensione, di altre particelle biologiche, che possono essere marcate precedentemente con sonde fluorescenti. L'analisi citofluorimetrica permette pertanto di misurare le proprietà di una popolazione di cellule in un flusso di liquido.

In commercio esistono citofluorimetri a due, tre, quattro e fino a sei fluorescenze, che rilevano contemporaneamente il segnale emesso dai diversi fluorocromi con lunghezze d'onda diverse consentendo la misurazione simultanea di molteplici parametri, quali la dimensione cellulare, la granularità, il contenuto di pigmenti, di DNA, di RNA, l'organizzazione del citoscheletro, il potenziale di membrana, i recettori di superficie ed intracellulari, le attività enzimatiche e la fosforilazione di proteine.

Molte molecole dotate di attività recettoriale o antigenica sulla membrana, nel citoplasma o nel nucleo, possono essere identificate con ligandi fluorescenti o anticorpi marcati con fluorocromi.

Un ulteriore sviluppo tecnologico è rappresentato dal FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter). Esso associa alla capacità analitica di identificazione cellulare e caratterizzazione delle cellule marcate con anticorpi coniugati a composti fluorescenti come nel citofluorimetro, la possibilità di isolare e raccogliere in modo selettivo le cellule purificate, permettendo di separare popolazioni cellulari altamente selezionate (159).

Funzionamento

La tecnica della citofluorimetria consta di tre componenti principali:

- Sistema fluidico: il campione da analizzare (sospensione cellulare) viene convogliato da un sistema fluidico di trasporto fino al punto in cui avviene la misurazione, nella camera di flusso; le cellule passano cioè allineate attraverso un sistema di rilevazione ottico/elettronico.
- Sistema ottico: dato che i citofluorimetri sono dotati di sorgenti luminose (laser o lampade), ogni cellula incontra un fascio luminoso focalizzato di alcune decine di micron; quando il raggio luminoso intercetta il flusso cellulare (stream), il suo incontro con ogni singola cellula genera dei segnali. Una volta emessi, i segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi diecrici e filtri ottici, ed inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori).
- Sistema elettronico: il segnale viene così amplificato e trasformato in segnale elettronico analogico visualizzabile tramite un computer con una rappresentazione grafica ed analisi statistica.

Utilizzi della citofluorimetria:

- individuazione della dimensione delle cellule;
- studio del contenuto di DNA ed RNA e della sintesi e degradazione del DNA;
- struttura della cromatina e dei cromosomi;
- determinazione della ploidia;
- analisi del ciclo cellulare: determinazione della distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare;
- studio delle proteine totali e attività enzimatica;
- studio della proliferazione cellulare;
- analisi immunofenotipica multiparametrica (immunofenotipizzazione);
- identificazione e quantificazione dell'espressione dei potenziali bersagli terapeutici nei trattamenti con anticorpi monoclonali, e valutazione della risposta alla terapia delle leucemie, quantificando la malattia minima residua con elevata sensibilità;
- studio del sistema immunitario: risposta del sistema immunitario alla somministrazione di vaccini (cellule antigene specifiche, produzione di citochine, ecc); analisi delle diverse popolazioni delle cellule del sangue;
- analisi dei livelli di apoptosi in patologie associate a deplezione cellulare (es: AIDS) o accumulo cellulare (tumori) ecc.

I vantaggi di tale metodica sono la possibilità di eseguire un'analisi multiparametrica, la rapidità dei tempi di analisi (oltre 1000 cellule al secondo), l'obiettività, la riproducibilità e l'affidabilità statistica delle letture, la possibilità di analizzare un elevato numero di cellule esaminate e il fatto che i campioni possono essere processati senza perdere la vitalità cellulare.

Tale metodica, però, non è ottimale nell'analisi di popolazioni cellulari molto rare, che, a causa del loro ridotto numero in confronto agli eventi analizzati, potrebbero essere difficilmente separati dal "rumore di fondo". Inoltre la citofluorimetria permette di lavorare con campioni esclusivamente in fase monodispersa ed è gravata

dall'impossibilità di localizzare la sede di provenienza del segnale in caso di contemporanea presenza di marcatori nei diversi compartimenti cellulari.

Differenziamento adipogenico, osteogenico e condrogenico

Il potenziale di differenziamento in senso adipogenico, osteogenico e condrogenico è stato valutato mediante l'uso gli appositi kit commerciali STEMPRO® Osteogenesis, Chondrogenesis and Adipogenesis Kits (GIBCO, Invitrogen).

Differenziamento adipogenico

Colorazione Oil Red O

E' stato aspirato il terreno di differenziamento per adipociti, successivamente è stato effettuato un lavaggio delle cellule con PBS per rimuovere i residui di terreno.

È stato aggiunto metanolo (2 ml) e lasciato a incubare per cinque minuti a temperatura ambiente.

Il metanolo è stato poi completamente aspirato e sono stati effettuati due lavaggi con 2 ml di acqua deionizzata.

È stato aggiunto il reagente della colorazione Oil Red O (soluzione 0,5% Oil Red O stock in isopropanolo, diluita in acqua deionizzata) ad ogni pozzetto di coltura e lasciato su un plate shaker per 20 minuti a temperatura ambiente.

Il reagente è stato infine aspirato e sono stati effettuati due lavaggi dei pozzetti di coltura con 2 ml di acqua deionizzata.

Dopo la colorazione si è subito effettuata l'osservazione al microscopio; le cellule differenziate in adipociti hanno al loro interno vacuoli lipidici rossi.

Differenziamento osteogenico

Colorazione per la fosfatasi alcalina

Gli osteoblasti esprimono elevati livelli di fosfatasi alcalina (AP), enzima importante nella mineralizzazione ossea. La fosfatasi alcalina, al microscopio ottico, fa sì che le cellule si colorino dal blu scuro al viola.

Le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% per 15 minuti a temperatura ambiente e lavate per 10 minuti con un buffer contenente 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl e 10 mM MgCl₂.

In seguito le cellule sono state incubate con 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate ed il substrato per la fosfatasi alcalina nitroblue tetrazolium (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) per 10 minuti e mantenute in dH₂O.

La reazione avvenuta è stata osservata con un microscopio a luce (Nikon Eclipse 600, Nikon, Milano, Italia).

Colorazione Von Kossa

Le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% in PBS per 10-15 minuti a temperatura ambiente; è stato successivamente tolto il fissativo e le cellule sono state lavate 2 volte con acqua deionizzata ed incubate sotto luce diretta per un'ora con una soluzione di Nitrato d'Argento al 5%.

Le cellule sono state lavate più volte con acqua deionizzata per eliminare il Nitrato d'Argento; sono state poi coperte le cellule con una soluzione di Acido Pirogallico all'1% per 1-3'.

I depositi di calcio nelle cellule vengono evidenziati in nero.

Differenziamento condrogenico

Colorazione con Alcian Blue

Le cellule sono state coltivate come pellet, ottenuto centrifugando 1×10^6 cellule in 1 ml di terreno di differenziamento a 1200 rpm per 5 minuti.

I pellets sono stati mantenuti a 37°C al 5% di CO₂ per circa 14 giorni, cambiando il terreno ogni 4 giorni; successivamente sono stati fissati in paraformaldeide al 4%, inclusi in paraffina e tagliati al microtomo.

Le sezioni ottenute, adagiate su un vetrino, sono state sparaffinate in xilolo, reidratate in alcool etilico a concentrazioni decrescenti fino al 70% e colorate con una soluzione di Alcian Blue pH 1 (Bio-Optica) per 20 minuti. Una volta montato il vetrino coprioggetto, i campioni sono stati osservati al microscopio ottico (Nikon Eclipse 600). Le cellule che si sono differenziate in senso condrogenico presentano un'elevata attività di sintesi di proteoglicani e glicosaminoglicani che risulta evidenziata in blu con colorazione Alcian Blue.

Differenziamento in senso neuronale

Le cellule staminali da liquido amniotico (AFMSC) sono state coltivate in presenza di cellule astrocitarie umane (1321N1), affinché quest'ultime inducessero la differenziazione in senso neuronale delle AFMSC tramite i loro fattori di crescita.

Le cellule astrocitarie, infatti, esprimono molteplici fattori di crescita neurotrofici, quali FGF (fibroblast growth factor), BDNF (brain derived nervous factor), NT-3. Queste cellule possono quindi essere utilizzate per indurre la transdifferenziazione delle AFMSC in senso neuronale tramite un effetto paracrino (160).

Le cellule della glia sono parte integrante del sistema nervoso e svolgono moltissime attività ausiliarie al funzionamento e alla sopravvivenza dei neuroni, offrendo loro supporto meccanico e nutritivo. Inoltre sono deputate alla raccolta delle molecole di

neurotrasmettitori dal fluido extracellulare, compongono la barriera ematoencefalica e, durante lo sviluppo, guidano la migrazione di neuroni immaturi verso opportune sedi cerebrali.

Le cellule della glia possono essere:

- microglia: costituita da macrofagi specializzati;
- macroglia: nel Sistema nervoso centrale si trovano gli astrociti, gli oligodendrociti ed i loro precursori, le cellule ependimali, le glia radiali. Nel Sistema nervoso periferico si trovano invece le cellule di Schwann e le cellule satelliti.

Ottimizzazione delle condizioni dell'esperimento di co-coltura

Prima di procedere con l'esperimento definitivo di co-coltura, sono stati condotti degli esperimenti preliminari per valutare la concentrazione e la proporzione ottimale di cellule (1321N1 e AFMSC) da utilizzare.

Le cellule astrocitarie sono state contate con contatore automatico (Invitrogen), piastrate a cinque diverse concentrazioni (50000, 75000, 100000, 150000, 200000 per pozzetto) e mantenute in coltura per 10 giorni.

Al termine di tale periodo, dopo osservazione al microscopio, si è constatato che il pozzetto nel quale erano state seminate 200.000 cellule presentava una confluenza ottimale.

Successivamente, le AFMSC sono state contate e seminate a due diverse percentuali (60% e 80%) e co-coltivate con le cellule astrocitarie per 10 giorni. In questo periodo le AFMSC sono state giornalmente osservate al microscopio per valutare eventuali modificazioni morfologiche e l'indice di potenziale differenziamento.

Le maggiori modificazioni si osservavano nel pozzetto in cui erano state seminate 200.000 cellule astrocitarie e l'80% (160.000) di cellule derivanti da liquido amniotico. Tali condizioni sono state quindi utilizzate nei successivi esperimenti di co-coltura per il differenziamento delle AFMSC in senso neuronale.

Co-coltura di AFMSC con cellule astrocitarie

Dopo aver ottimizzato le condizioni sperimentali, sono state allestite le co-culture indirette con l'utilizzo di supporti "transweel" con pori del diametro di 0.4 micron. La presenza di queste membrane porose consente il passaggio di tutti i fattori eventualmente secreti dalle cellule astrocitarie nel mezzo di coltura, ma impedisce il contatto diretto tra i due tipi cellulari. Per questo motivo si parla di co-coltura indiretta, per distinguerla da quella diretta in cui i due tipi cellulari sono appunto in contatto "diretto" tra loro.

Questi supporti sono strutturati come dei canestri (basket) che si inseriscono perfettamente nei pozzetti delle piastre "six weels" (diametro 3.5 cm).

160.000 AFMSC sono state seminate direttamente su ciascun pozzetto, le cellule astrocitarie (200.000) sono state seminate sul basket. Le cellule sono state fatte aderire per tutta la notte; il giorno successivo i basket sono stati inseriti nei pozzetti contenenti le AFMSC e mantenuti in co-coltura per 10 giorni con terreno Neuro Basal Medium (NBM; Gibco) addizionato con B27 Supplementents (Gibco) e Glutamax 1X (Gibco) a 37 °C, 5% di CO₂.

Durante l'esperimento, le AFMSC sono state giornalmente osservate e fotografate al microscopio ottico, per valutare eventuali modificazioni morfologiche.

Al termine dei 10 giorni, le cellule sono state recuperate, dopo trattamento con tripsina/EDTA, e utilizzate per le successive analisi di biologia molecolare.

Isolamento mRNA e retrotrascrizione in cDNA

L'RNA totale è stato estratto dalle AFMSC prelevate tramite amniocentesi prima e dopo co-coltura con le cellule astrocitarie; l'estrazione è stata effettuata utilizzando il kit PerfectPure™ RNA cell Tissue (5 PRIME, Hamburg, Germany), seguendo il protocollo della ditta fornitrice.

L'RNA estratto è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica, la purezza del campione è stata valutata dal rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e quella a 280 nm. Per ogni campione analizzato 1µg di RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA con il kit "RT² First Strand cDNA", utilizzando gli oligodT come primers.

Caratterizzazione genotipica mediante Polymerase Chain Reaction Array (RT-PCR)

La Polymerase Chain Reaction (PCR) è una tecnica di biologia molecolare che consente l'amplificazione esponenziale di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere *in vitro* molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.

Per dare inizio alla reazione è necessaria la presenza dei nucleotidi da polimerizzare e le estremità della sequenza da amplificare devono essere note con sufficiente precisione per poter sintetizzare degli oligonucleotidi (primer o inneschi) che saranno ibridizzate ad esse.

Vengono effettuati circa 35-40 cicli di PCR ed ogni ciclo di amplificazione prevede tre step:

- **denaturazione** (10 secondi): la soluzione di DNA da replicare, desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, primer e DNA polimerasi viene portata alla temperatura di 94-99°C. Viene utilizzata una particolare DNA polimerasi, la TAQ (proveniente dal batterio termofilo *Thermus Aquaticus*) che, a differenza della polimerasi umana, è termoresistente.

Gli ioni magnesio sono necessari per il corretto funzionamento della DNA polimerasi. La doppia elica del DNA viene quindi completamente scissa ed i due filamenti di cui essa è composta sono liberi.

- **ibridazione** (annealing; 15 secondi): la temperatura viene abbassata fino a 60°C circa al fine di permettere il legame dei primer alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati così da avere l'appaiamento degli inneschi oligonucleotidici alle sequenze di DNA a singola elica ad essi complementari e localizzati alle estremità del frammento bersaglio.
- **allungamento** (extension; il tempo dipende dalla lunghezza del frammento): la temperatura viene rialzata, a 72°C circa così da massimizzare l'azione della DNA polimerasi che determina l'allungamento dei primer legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA.

Il numero di nuove molecole di DNA che si ottiene al succedersi di ogni ciclo è esponenziale: dal primo ciclo una singola molecola di DNA si raddoppia, ciascuna nuova molecola è quindi costituita da un'elica che ha fatto da stampo e dall'elica appena creata. Il processo di amplificazione procede in questo modo di ciclo in ciclo, in cui il numero di copie della sequenza bersaglio aumenta in modo esponenziale (reazione a catena) ed in maniera estremamente rapida.

La PCR real-time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), ed è un metodo che simultaneamente amplifica (reazione a catena della polimerasi o PCR) e quantifica il DNA.

Il DNA è amplificato dalla PCR e viene quantificato dopo ogni turno di amplificazione. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA doppio-filamento (ds) e gli oligonucleotidi modificati del DNA (denominati sonde) che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA.

Per consentire la sintesi di una molecola di DNA a doppio filamento a partire da uno stampo di RNA e quantificare così il livello di espressione di specifici RNA si utilizza invece la RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) che è una variante della tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR).

La RT-PCR si articola in due fasi:

- reazione first-strand: retrotrascrizione dell'RNA;
- reazione second-strand: amplificazione del cDNA ottenuto nella prima fase;

La molecola di DNA sintetizzata mediante il processo di retrotrascrizione è definita cDNA. La retrotrascrizione produce un cDNA complementare mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA. Mediante l'impiego della RT-PCR è possibile convertire in DNA un intero trascrittoma (insieme di tutto il trascritto di una cellula) di uno specifico tessuto di un individuo in una specifica fase del suo sviluppo. Per tale motivo, la RT-PCR è una tecnica che viene sfruttata in laboratorio per studiare l'espressione genica, perché consente di sottoporre ad ulteriori analisi il cDNA sintetizzato.

Il prodotto della retrotrascrizione dell'RNA poi può essere amplificato mediante PCR classica oppure essere quantificato mediante real-time PCR (qPCR).

La combinazione di queste due tecniche è spesso denominata RT-PCR quantitativa.

La metodica utilizzata per questo studio è la Real-Time PCR (PCR quantitativa), un metodo di amplificazione selettiva di sequenze geniche e quantificazione simultanea dell'mRNA presente in ciascun campione. Tale quantificazione è resa possibile dall'utilizzo del SYBR Green (Qiagen Laboratories Milano, Italia), un colorante fluorescente in grado di legarsi alla doppia elica del DNA. Il SYBR Green emette una fluorescenza maggiore quando intercalato al DNA a doppia elica, quindi con il procedere dei cicli di amplificazione si ha un continuo aumento della fluorescenza. Con il termine Ct (Cycle threshold) si indica il ciclo raggiunto il quale la fluorescenza supera il valore base (threshold).

La qualità dei prodotti di reazione è stata verificata grazie all'analisi delle curve di dissociazione (curve di melting), che permettono di discriminare l'amplificato di interesse dalla presenza di eventuali prodotti aspecifici o dimeri di primers.

I geni selezionati appartengono a due categorie: staminalità e differenziamento in senso neuronale.

La quantità del trascritto del gene di interesse è normalizzata rispetto alla quantità del trascritto di un gene housekeeping, GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi o RPLP0 (ribosomal protein, large, P0).

Al termine della reazione di Real Time PCR, cambiamenti nell'espressione relativa dei geni sono stati analizzati tramite l'equazione $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove $\Delta Ct = [Ct(\text{gene di interesse}) - Ct(\text{housekeeping})]$ e $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct[(\text{AFMSC pre co-coltura}) - \Delta Ct(\text{AFMSC post cocoltura})]$.

PCR Array

La Real-time RT-PCR è un metodo molto sensibile per l'analisi dell'espressione genica. In particolare, i PCR Arrays consentono di analizzare simultaneamente l'espressione di oltre 90 geni coinvolti in specifici processi cellulari.

Su ciascun pozzetto della piastra da 96 geni, sono presenti i primers specifici per un determinato gene del pathway di interesse.

Dopo aver retro trascritto l'mRNA in cDNA utilizzando "RT² First Strand Kit", esso viene aggiunto alla RT² qPCR Master Mixes, contenente tutti i reagenti necessari per la reazione di Real Time PCR: nucleotidi, tamponi, DNA polimerasi, SYBR Green.

Per valutare l'eventuale differenziamento delle cellule AFMSC in senso neuronale, sono stati utilizzati due differenti PCR-array:

- Human Stem Cell RT² Profiler™ PCR Array, Qiagen; specifico per i geni di staminalità. Questo array serve per l'analisi dell'espressione di 84 geni coinvolti nell'identificazione, crescita e differenziamento delle cellule staminali. Sono inoltre presenti markers specifici delle cellule staminali, del loro processo di differenziazione precoce e di signaling.
- Human Neurogenesis RT² Profiler™ PCR Array, Qiagen specifico per la neurogenesi. Questo secondo array consente l'analisi di 84 geni coinvolti nei processi chiave del controllo della neurogenesi e differenziamento neuronale. Sono inoltre presenti

geni implicati nella proliferazione, nella motilità e geni più specifici, come quelli per fattori di crescita e citochine e altri coinvolti nelle funzioni sinaptiche e apoptotiche.

Ciascun array contiene inoltre i primers per 5 diversi geni housekeeping, per la successiva normalizzazione dei dati ottenuti. Sono inoltre presenti i controlli per la presenza di DNA genomico contaminante (GDC), per la valutazione dell'efficienza della reazione di retrotrascrizione (RTC) e il controllo positivo per la valutazione dell'efficienza della reazione di PCR (PPC).

Array Layout STEM CELLS

ABCG2 A01	ACAN A02	ACTC1 A03	ADAR A04	ALDH1A1 A05	ALDH2 A06	ALPI A07	APC A08	ASCL2 A09	AXIN1 A10	BGLAP A11	BMP1 A12
BMP2 B01	BMP3 B02	BTRC B03	CCNA2 B04	CCND1 B05	CCND2 B06	CCNE1 B07	CD3D B08	CD4 B09	CD44 B10	CD8A B11	CD8B B12
CDC42 C01	CDH1 C02	CDH2 C03	CDK1 C04	COL1A1 C05	COL2A1 C06	COL9A1 C07	CTNNA1 C08	CXCL12 C09	DHH C10	DLL1 C11	DLL3 C12
DTX1 D01	DTX2 D02	DVL1 D03	EP300 D04	FGF1 D05	FGF2 D06	FGF3 D07	FGF4 D08	FGFR1 D09	FOXA2 D10	FRAT1 D11	FZD1 D12
GDF2 E01	GDF3 E02	GJA1 E03	GJB1 E04	GJB2 E05	HDAC2 E06	HSPA9 E07	IGF1 E08	ISL1 E09	JAG1 E10	KAT2A E11	KAT7 E12
KAT8 F01	KRT15 F02	MME F03	MSX1 F04	MYC F05	MYOD1 F06	NCAM1 F07	NEUROG2 F08	NOTCH1 F09	NOTCH2 F10	NUMB F11	PARD6A F12
PDX1 G01	PPARD G02	PPARG G03	RB1 G04	S100B G05	SIGMAR1 G06	SOX1 G07	SOX2 G08	T G09	TERT G10	TUBB3 G11	WNT1 G12
ACTB H01	B2M H02	GAPDH H03	HPRT1 H04	RPLP0 H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Tab. 1: da A01 a G12 profili di espressione di 84 geni correlate alla staminalità; da H01 a H05 geni housekeeping; da H06 a H12 controlli per la contaminazione di DNA genomico, qualità dell'RNA e performance generale della PCR.

Array Layout NEUROGENESIS

ABCG2 A01	ACAN A02	ACTC1 A03	ADAR A04	ALDH1A1 A05	ALDH2 A06	ALPI A07	APC A08	ASCL2 A09	AXIN1 A10	BGLAP A11	BMP1 A12
BMP2 B01	BMP3 B02	BTRC B03	CCNA2 B04	CCND1 B05	CCND2 B06	CCNE1 B07	CD3D B08	CD4 B09	CD44 B10	CD8A B11	CD8B B12
CDC42 C01	CDH1 C02	CDH2 C03	CDK1 C04	COL1A1 C05	COL2A1 C06	COL9A1 C07	CTNNA1 C08	CXCL12 C09	DHH C10	DLL1 C11	DLL3 C12
DTX1 D01	DTX2 D02	DVL1 D03	EP300 D04	FGF1 D05	FGF2 D06	FGF3 D07	FGF4 D08	FGFR1 D09	FOXA2 D10	FRAT1 D11	FZD1 D12
GDF2 E01	GDF3 E02	GJA1 E03	GJB1 E04	GJB2 E05	HDAC2 E06	HSPA9 E07	IGF1 E08	ISL1 E09	JAG1 E10	KAT2A E11	KAT7 E12
KAT8 F01	KRT15 F02	MME F03	MSX1 F04	MYC F05	MYOD1 F06	NCAM1 F07	NEUROG2 F08	NOTCH1 F09	NOTCH2 F10	NUMB F11	PARD6A F12
PDX1 G01	PPARD G02	PPARG G03	RB1 G04	S100B G05	SIGMAR1 G06	SOX1 G07	SOX2 G08	T G09	TERT G10	TUBB3 G11	WNT1 G12
ACTB H01	B2M H02	GAPDH H03	HPRT1 H04	RPLP0 H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Tab. 2: da A01 a G12 profili di espressione di 84 geni correlate alla neurogenesi; da H01 a H05 geni housekeeping; da H06 a H12 controlli per la contaminazione di DNA genomico, qualità dell'RNA e performance generale della PCR.

Western Blot

Il western blot (WB), o immunorivelazione, è una tecnica immunochimica che permette di identificare la presenza di una determinata proteina in una miscela di proteine separate elettroforeticamente, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici.

Le cellule vengono lisate attraverso procedimenti enzimatici e meccanici ottenendo un lisato contenente proteine purificate, delle quali è necessario quantificare la concentrazione attraverso il metodo Bradford.

Successivamente le proteine vengono quindi separate in base al loro peso molecolare attraverso corsa su gel di poliacrilammide, polimero che forma numerosi legami crociati agendo come un setaccio molecolare che rallenta le proteine. Questa procedura discrimina le proteine in base al loro peso molecolare. Tutte le mix dovranno contenere la stessa concentrazione di proteine, il "loading buffer", per facilitare il caricamento dei campioni e renderne possibile la visualizzazione a occhio nudo, e il sodio dodecilsolfato (SDS) al 4%, che si lega alle proteine conferendo loro una carica netta negativa e rendendo insignificante la loro carica intrinseca. In questo modo tutte le proteine hanno una carica netta negativa che riflette l'insieme degli aminoacidi che le costituisce: messe in un campo elettrico esse migreranno in modo differente. Le proteine così separate vengono quindi trasferite elettroforeticamente su una membrana, in genere nitrocellulosa o polivinilidenefluoruro (PVDF), e sottoposte a marcatura con anticorpi specifici in grado di identificare le diverse componenti proteiche. Nel WB si utilizzano due tipi di anticorpi: un anticorpo primario, specifico per la proteina da ricercare, e successivamente un anticorpo secondario coniugato ad un enzima; viene poi aggiunto un substrato che con l'enzima forma un precipitato cromogenico per la rivelazione colorimetrica.

I metodi di rilevamento più sensibili utilizzano un substrato chemiluminescente che, quando combinato con l'enzima, produce luce come sottoprodotto. L'emissione di luce viene catturata con un sistema di imaging di fluorescenza (e.g. la pellicola fotosensibile,

una camera CCD, uno scanner a fotoluminescenza..). L'intensità del segnale correla con la quantità dell'antigene sulla membrana.

Per questo studio è stata valutata mediante WB l'espressione delle proteine coinvolte nella neurogenesi.

Per valutare il differenziamento verso la linea neuronale sono state studiate:

- Nestina: proteina espressa soprattutto nel citoscheletro delle cellule nervose, dove risulta implicata nella crescita radiale dell'assone.
- β -Tubulina III: unità fondamentale dei microtubuli del citoscheletro ritrovata quasi esclusivamente a livello neuronale

Per escludere una eventuale differenziazione in senso gliale sono stati ricercati anche i marker delle cellule gliali:

- S100: proteine normalmente presenti in cellule derivate dalla cresta neurale (Cellule della glia, cellule di Schwann e melanociti)
- Proteina fibrillare acida della glia (GFAP): unità proteica da cui sono costituiti i filamenti intermedi di tipo III degli astrociti.

Dopo co-coltura con la linea di astrocitoma 1321N1, le proteine sono state estratte dagli AFMSC mediante radioimmunoprecipitazione utilizzando una soluzione tampone contenente diversi inibitori delle proteasi [150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,2), 0,1% sodio dodecil solfato, 1,0% Triton X-100, 5 mM acido etilendiamminotetraacetico (pH 8,0)] (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il reagente di Bradford (Sigma-Aldrich).

Gli estratti proteici totali (50 ug) sono stati ridotti in ditiotreitolo (DDT, 0,5 M) a 70 ° C per 10 min.

I campioni sono stati fatti correre su gel di poliacrilamide 4-12% NuPAGE Bis-Tris per 1 ora a 200 V; l'elettroblotting è stato effettuato utilizzando il sistema di blotting a secco iBlot (Invitrogen).

Le membrane sono state incubate overnight con anticorpi anti-nestina (Biorbyt, Cambridge, Inghilterra; la diluizione 1:1000), anti- β -Tubulina III (Thermo Fisher, Rockford, Stati Uniti d'America; la diluizione 1:1000), anti-GFAP (Thermo Fisher; 1, 5 ug / ml), anti-S100 (Thermo Fisher; diluizione 1: 500) come anticorpi primari.

Successivamente, le membrane sono state incubate con anticorpi secondari di tipo anti-murino, in grado di riconoscere la regione costante dell'anticorpo primario umano utilizzato. L'anticorpo secondario, coniugato con l'enzima perossidasi (Horseradish peroxidase o HRP) (Santa Cruz Biotechnology, diluizione 1: 10000), è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente.

Le proteine immunoreattive sono state visualizzate mediante un substrato chemiluminescente (Santa Cruz Biotechnology).

Per il controllo endogeno è stato usato l'anticorpo β -actina (Thermo Fisher; diluizione 1: 10000).

RISULTATI

Isolamento e coltura di AFMSC

Nove campioni di liquido amniotico (3ml) di donne tra la 16^a e la 18^a settimana di gestazione sono stati prelevati durante amniocentesi per diagnostica.

Tali campioni sono stati messi in coltura con terreno MSCGM, specifico per la crescita di cellule mesenchimali, ottenuto aggiungendo al terreno MSCBM (Mesenchymal Stem Cell Basal Medium) il supplemento di crescita per cellule mesenchimali MCGS (Mesenchymal Cell Growth Supplement), L-Glutamina e Penicillina/Streptomicina. Dopo 7 giorni circa sono comparse le prime cellule aderenti (AFMSC) che hanno poi dato origine a popolazioni cellulari omogenee caratterizzate da una morfologia fibroblastoide.

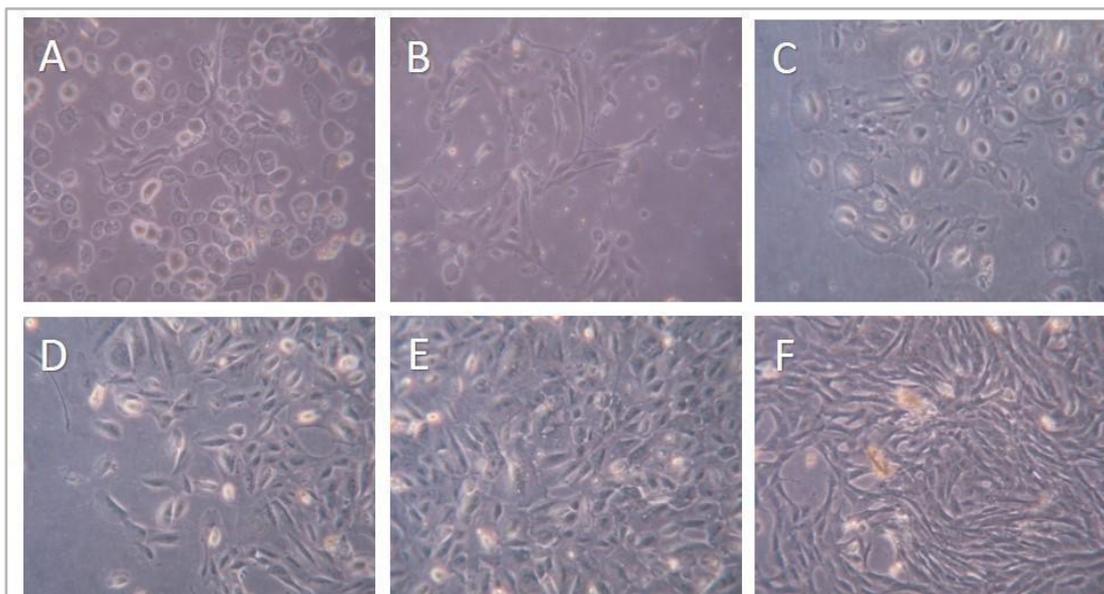


Fig. 1 : *modificazioni morfologiche delle AFMSC in coltura*
A: 7 giorni; B: 10 giorni; C: 12 giorni; D: 14 giorni; E: 16 giorni; F: 18 giorni

Le cellule sono state mantenute in coltura per mesi e in questo tempo è stato valutato il tempo di duplicazione (doubling time) dal primo al dodicesimo passaggio.

Il doubling time è rimasto stabile a circa 18 ± 1 h per i primi otto passaggi, quindi è gradualmente aumentato arrivando a 40 ± 2 h al dodicesimo passaggio.

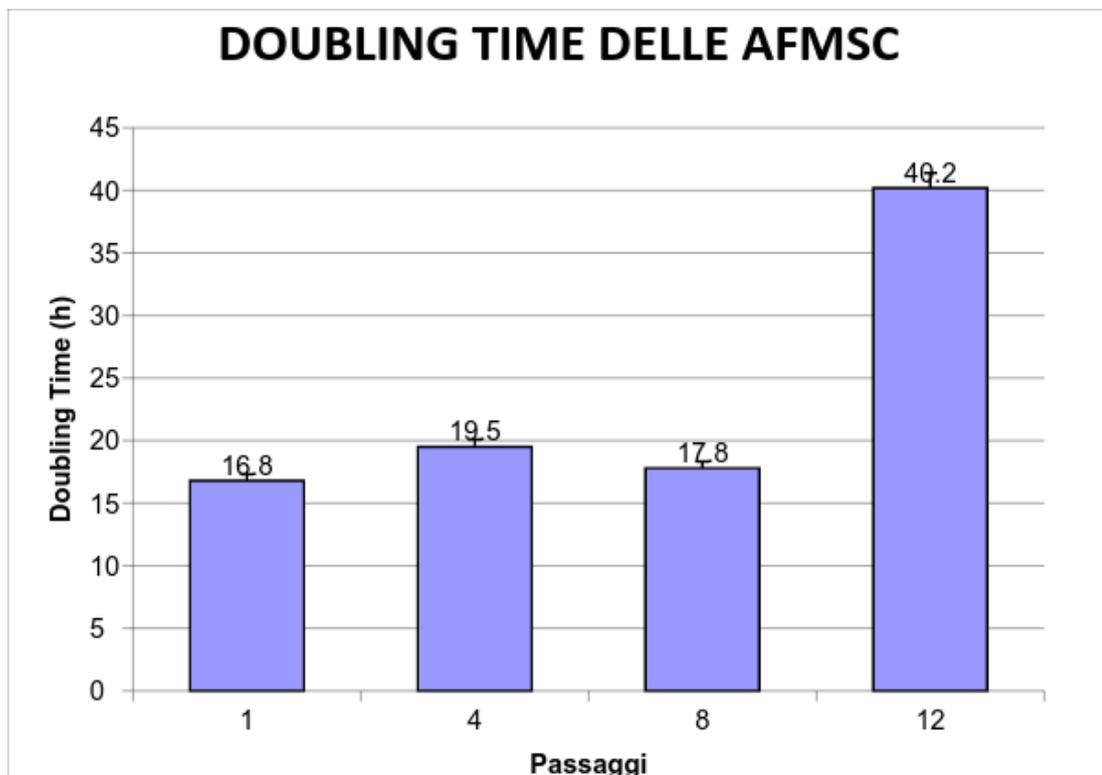


Fig. 2: Doubling Time delle AFMSC.

Caratterizzazione

Analisi Citofluorimetrica

Per la caratterizzazione immunofenotipica delle cellule isolate dai 9 liquidi amniotici e coltivate in MSCGM, 2.5×10^5 cellule al terzo passaggio sono state incubate per 45 minuti con anticorpi coniugati a fluorescina isotiocianato (FITC) e quindi caratterizzate per la presenza di HLA-DR, CD14, CD19, CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105.

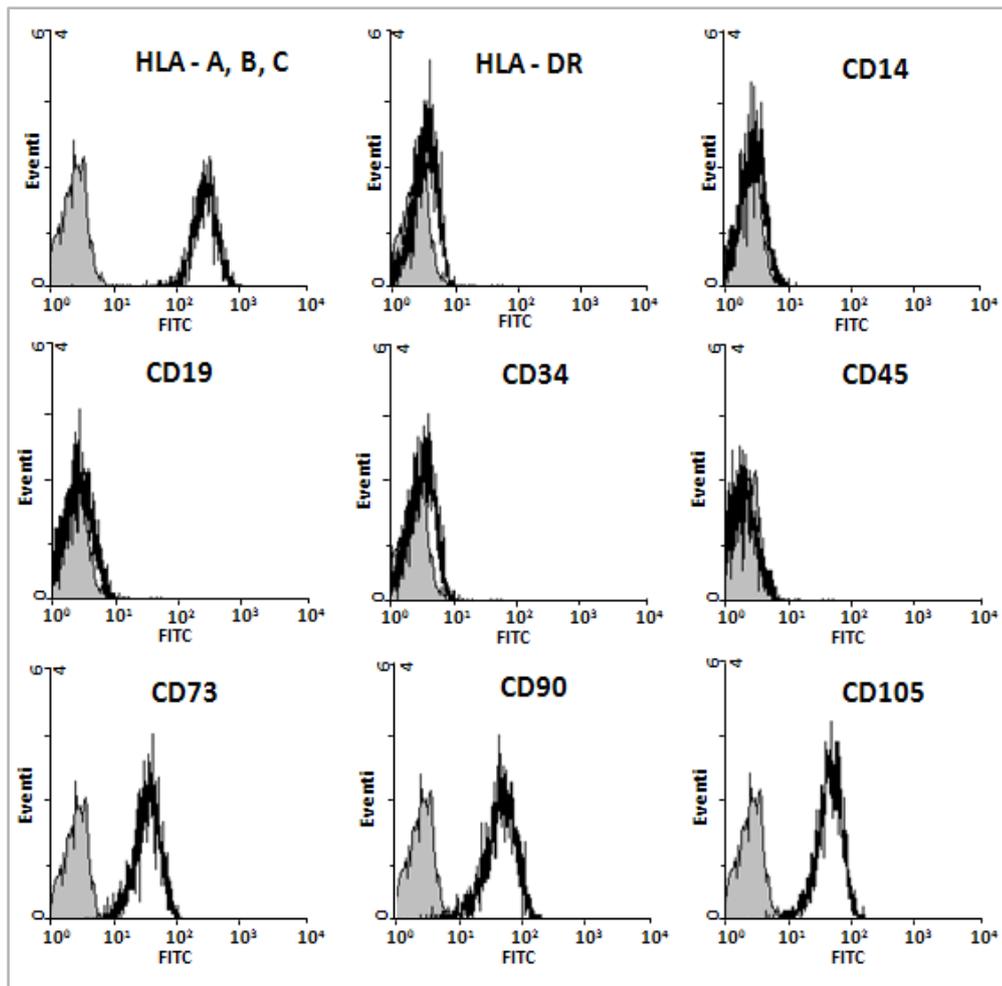


Fig. 3: *analisi citofluorimetrica degli antigeni esprimente HLA-A,B,C, HLA-DR, CD14, CD19, CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105. Come controllo è stato utilizzato un istotipo IgG1-FITC.*

Le cellule isolate mostravano un pattern fenotipico riconducibile a quello delle staminali e in accordo con quanto previsto dai criteri minimi per la loro identificazione riconosciuti da Dominici. In dettaglio, il 93-99% della popolazione è risultata esprime CD73, CD90 e CD105, mentre ha dimostrato negatività per HLA-DR, CD14, CD19, CD34 e CD45. Le cellule isolate dai diversi campioni di liquidi amniotici presentano un immunofenotipo sovrapponibile. Inoltre è stata testata mediante PCR l'espressione di geni correlati alla staminalità e all'auto-rinnovamento (SOX2, NANOG, OCT4, KLF4).

Differenziamento osteogenico e condrogenico

Le AFMSC ottenute sono state incubate per 15-21 giorni in terreni opportunamente addizionati per studiarne il potenziale differenziativo in senso osteogenico, condrogenico e adipogenico.

Dopo 14 giorni, le cellule coltivate in terreno osteogenico hanno mostrato una variazione della loro morfologia: inizialmente le AFMSC apparivano fusate e di aspetto fibroblastoide, mentre al termine del trattamento risultavano più rotondeggianti e cuboidi. La positività alla reazione con la fosfatasi alcalina e alla colorazione con Von Kossa hanno confermato il differenziamento in senso osteogenico di tali cellule.

Fig. 4: *differenziamento osteogenico con reazione Fosfatasi Alcalina (14 giorni)*

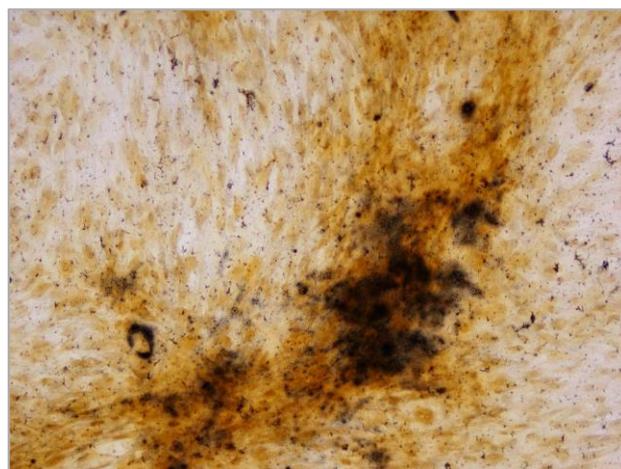
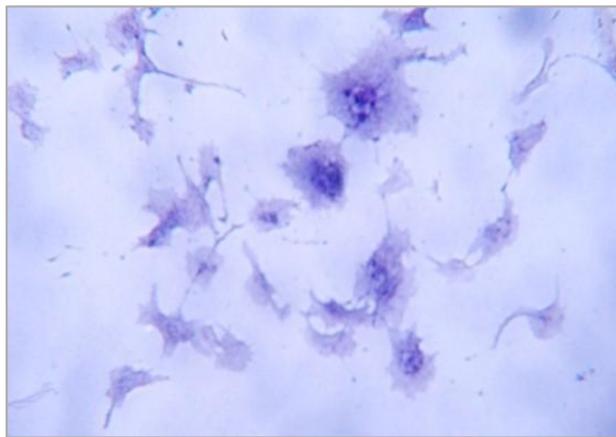


Fig. 5: *differenziamento osteogenico con colorazione Von Kossa (14 giorni)*

Per quanto riguarda il differenziamento in senso condrogenico, dopo 21 giorni di coltura con terreno specifico, le cellule apparivano maggiormente rotonde e positive alla colorazione con Alcian blu, colorante specifico per il tessuto cartilagineo che identifica la componente proteoglicana della matrice extracellulare.

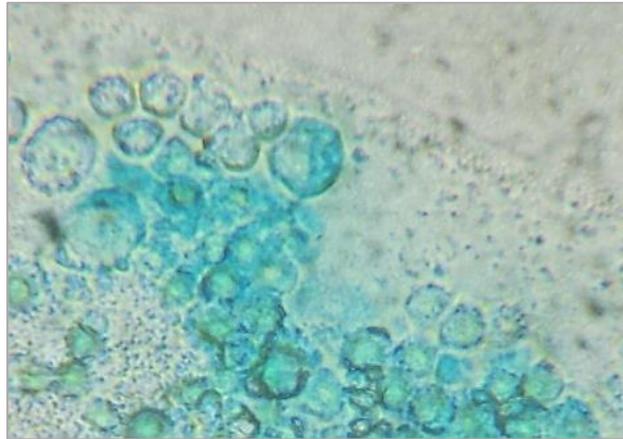


Fig. 6: *differenziamento condrogenico con colorazione Alcian Blue (21 giorni)*

Le cellule invece non sono risultate capaci di compiere il differenziamento in senso adipogenico, come dimostrato dalla non positività alla colorazione Oil Red, specifica per i vacuoli lipidici.

Differenziamento neuronale

Per promuoverne la differenziazione in senso neuronale le AFMSC sono state poste in co-coltura indiretta in presenza di cellule astrocitarie umane della linea 1321N1.

AFMSC e astrociti sono stati co-coltivati per 10 giorni su supporti transwell con membrane provviste di pori di $0.4\mu\text{m}$ testando differenti concentrazioni di cellule gliali e di percentuali relative di AFMSC. Al termine degli esperimenti preliminari le condizioni ottimali sono state stabilite a 200.000 cellule gliali per pozzetto in co-coltura con 160.000 cellule mesenchimali derivate da liquido amniotico.

Le AFMSC sono state osservate quotidianamente al microscopio ottico per valutarne eventuali cambiamenti morfologici. È stata rilevata la formazione di prolungamenti simil-neurite (definiti quindi neurite-like).

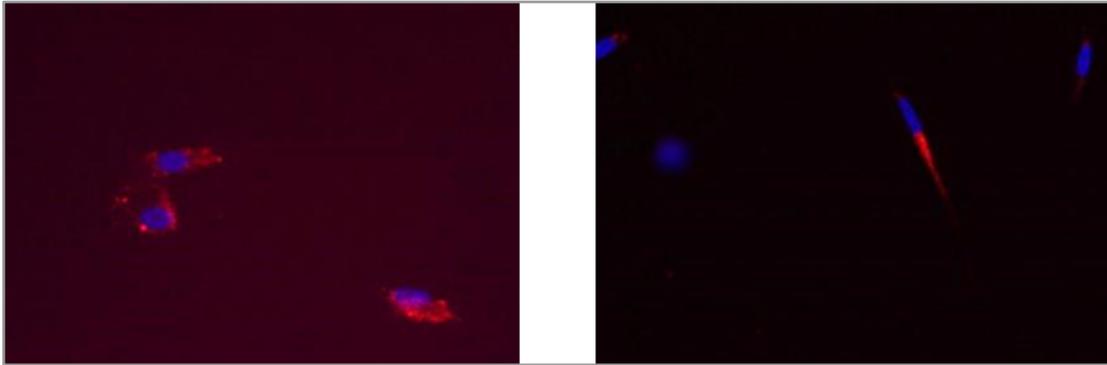


Fig. 7: *microscopia a fluorescenza di AFMSC prima e dopo co-coltura con 1231N1*
Cellule colorate con PKH26 e con Hoechst hanno rivelato la formazione di prolungamenti
neuriti-like dopo co-coltura. (Scala 20:1)

Per definizione, tali prolungamenti devono mostrare una lunghezza uguale o maggiore a quella del diametro cellulare.

Le AFMSC, sia di controllo che co-coltivate, sono state contate quotidianamente per valutare eventuali rallentamenti della proliferazione cellulare, tipici della differenziazione neuronale.

Dalla conta cellulare è emersa una sensibile riduzione del tasso di proliferazione cellulare delle AFMSC in co-coltura rispetto al controllo.

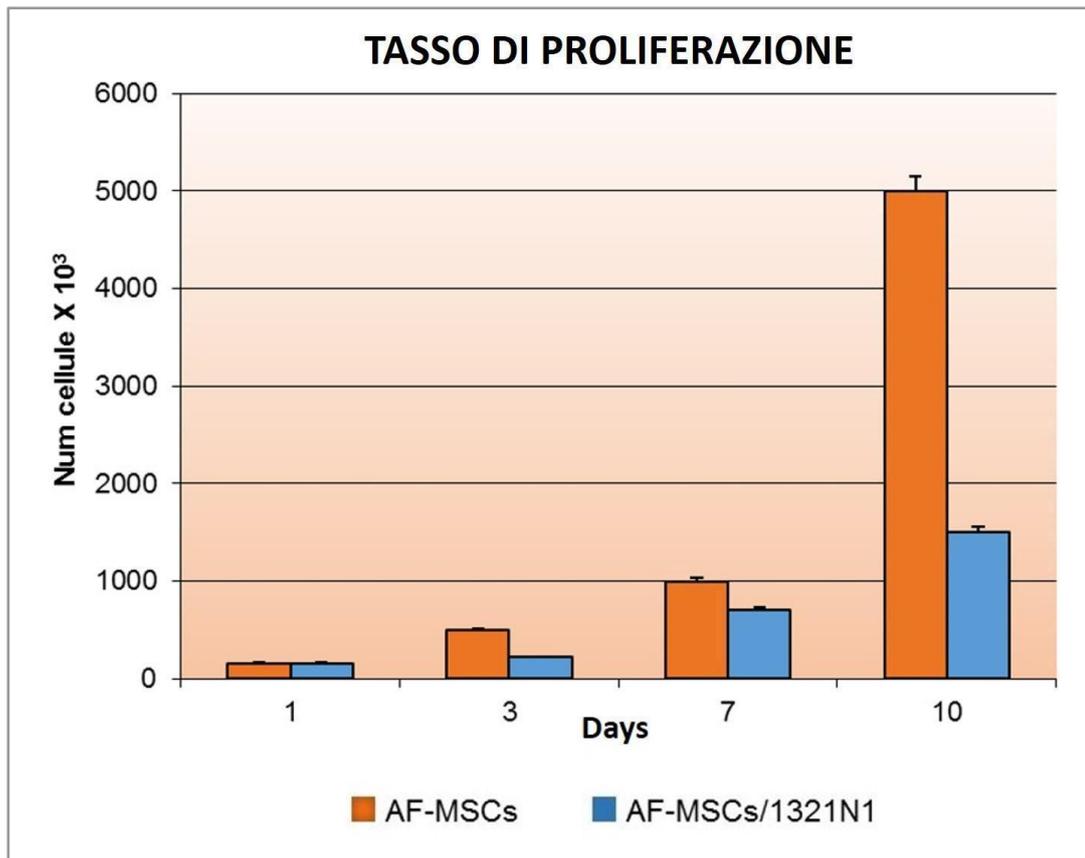


Fig. 8: *proliferazione cellulare delle AFMSC coltivate singolarmente (AF-MSCs) e in co-coltura con le cellule gliali (AF-MSC/1321N1)*

Tutte le analisi sono state effettuate anche su AFMSCs di controllo, mantenute in coltura senza cellule gliali.

Differenziamento in senso neuronale e caratterizzazione genotipica mediante RT-PCR (PCR array)

Durante il differenziamento cellulare le SC acquisiscono caratteristiche morfofunzionali specifiche che implicano un'attivazione genica selettiva con conseguente sintesi di proteine specifiche da parte di ciascun tipo cellulare.

Attraverso il profiling genico sulle AFMSC prima e dopo co-coltura con le cellule astrocitarie si è valutata l'espressione dei geni correlati alla staminalità e di quelli correlati al processo di neurogenesi.

Il profilo genico è stato eseguito tramite PCR Arrays. Al termine della reazione i dati ottenuti sono stati analizzati tramite l'equazione $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove $\Delta Ct = [Ct (\text{gene di interesse}) - Ct (\text{housekeeping})]$ e $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct [(AFMSC \text{ post co-coltura}) - \Delta Ct (AFMSC \text{ pre co-coltura})]$. In ciascun array il valore di AFMSC antecedente la co-coltura è stato posto pari a 1 ed è il valore di riferimento a cui sono state riferite le variazioni di espressione delle AFMSC dopo co-coltura.

PCR array - staminalità

L'espressione genica nelle piastre contenenti i geni relativi alla staminalità ha subito notevoli modifiche, soprattutto nelle classi dei geni regolatori del ciclo cellulare, della divisione simmetrica e asimmetrica, nei markers di autorinnovamento e di differenziazione cellulare, nelle citochine e nei fattori di crescita.

Up-regulated genes	ADAR*, ASCL2*, BMP1, BMP2, BMP3*, BTRC, CCND1*, CCND2*, CD44, CDH2*, CDK1, COL1A1*, DLL1*, DVL1, FGF2, FGFR1*, FZD1, HSPA9, JAG1, KAT2A*, KRT15*, MSX1*, MYC*, NCAM1*, NOTCH1*, NOTCH2, NUMB, PARD6A, TUBB3, WNT1*
No expression variation genes	ABCG2, APC, AXIN1, BGLAP, CCNA1, CCNE2, CD8B, CDC42, COL2A1, CTNNA1, DTX1, DTX2, EP300, GJA1, GJB2, HDAC2, IGF1, ISL1, KAT7, MME, RB1, SIGMAR1, T
Down-regulated genes	ACAN*, ACTC1*, ALDH1A1, ALDH2, ALPI, CD3D, CD4, CD8A, CDH1, COL9A1, CXCL12*, DHH, DLL3, FGF1, FGF3*, FGF4*, FOXA2, FRAT1, GDF2*, GDF3*, GJB1, KAT8, MYOD1*, NEUROG2, PDX1*, PPARG, PPARG, S100B, SOX1, SOX2, TERT

Tab. 3: variazioni di espressione dei geni di differenziazione in senso staminale delle AFMSC in co-coltura. Il valore di AFMSC antecedente la co-coltura è stato posto pari a 1 ed è il valore di riferimento a cui sono state riferite le variazioni di espressione di mRNA delle AFMSC dopo co-coltura. * = p-value < 0,05

Geni regolatori del ciclo cellulare: nelle cellule in co-coltura con cellule gliali è stata rilevata una riduzione di espressione dei geni coinvolti nella proliferazione e nell'auto-rinnovamento delle cellule staminali FGF1 (-0.52), FGF3 (-0.045) e FGF4 (-0.19), rispetto a prima della co-coltura.

FGF2, gene coinvolto nella regolazione della proliferazione dei progenitori neuronali, è risultato invece aumentato di 1.44.

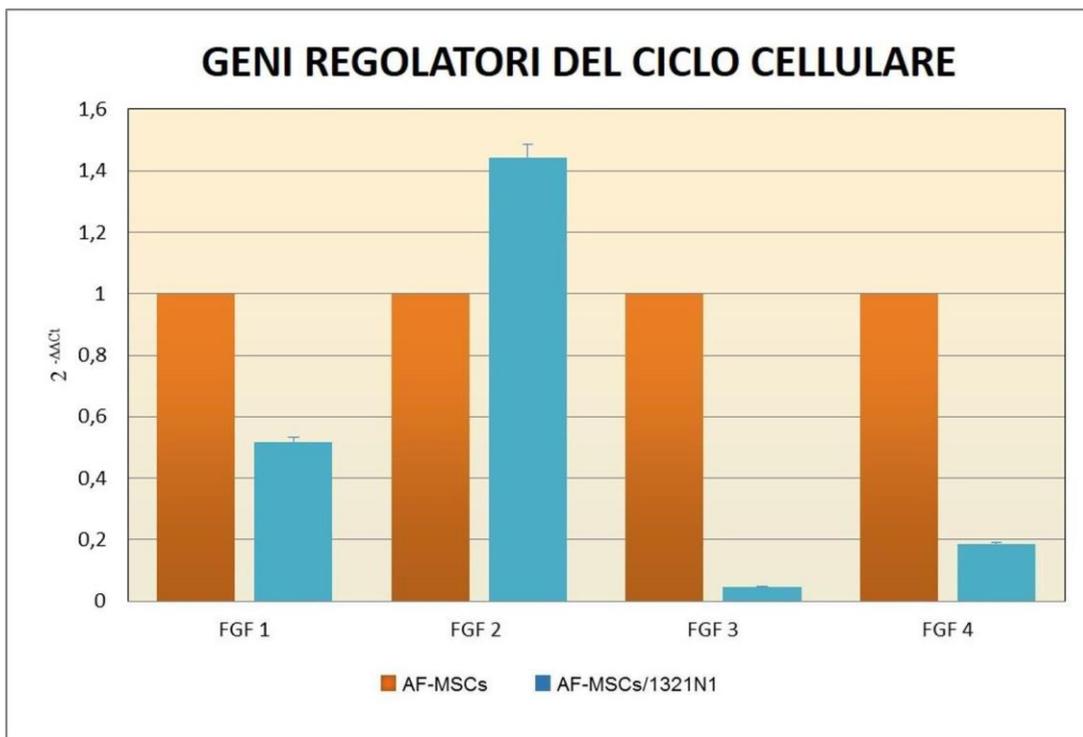


Fig. 9: espressione dei geni regolatori del ciclo cellulare nelle AFMSC coltivate isolatamente e dopo co-coltura con cellule gliali (AFMSC/1321N1)

Geni regolatori della divisione simmetrica e asimmetrica: sono stati studiati i geni coinvolti nella regolazione della divisione asimmetrica, caratteristica tipica delle cellule staminali che consente loro di dare origine a una cellula staminale, per la conservazione del pool staminale, e ad una cellula che continuerà il percorso differenziativo.

Dopo co-coltura con astrociti le AFMSC hanno mostrato un aumento dell'espressione di NOTCH1, NOTCH2, NUMB E PARD6A rispettivamente di 2.30, 1.52, 1.40 e 1.38 rispetto a prima della co-coltura.

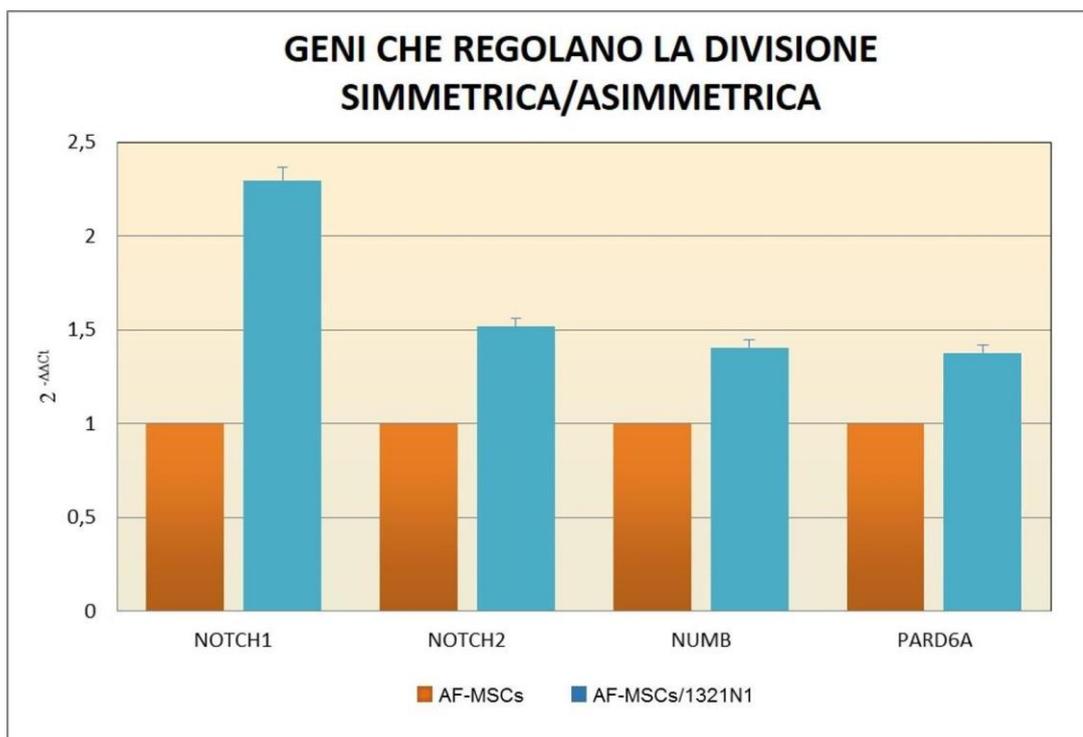


Fig. 10: espressione dei geni regolatori della divisione simmetrica/asimmetrica nelle AFMSC coltivate isolatamente e dopo co-coltura con cellule gliali (AFMSC/1321N1)

Markers di autorinnovamento: le SC sono in grado di replicarsi per periodi indefiniti mantenendo lo stato indifferenziato.

Come atteso, l'espressione dei geni coinvolti nell'auto-rinnovamento è risultata diminuita dopo co-coltura con astrociti: KAT7, -0.95; KAT8, -0.64; NEUROG2, -0.21; SOX1, -0.32 e SOX3, -0.38).

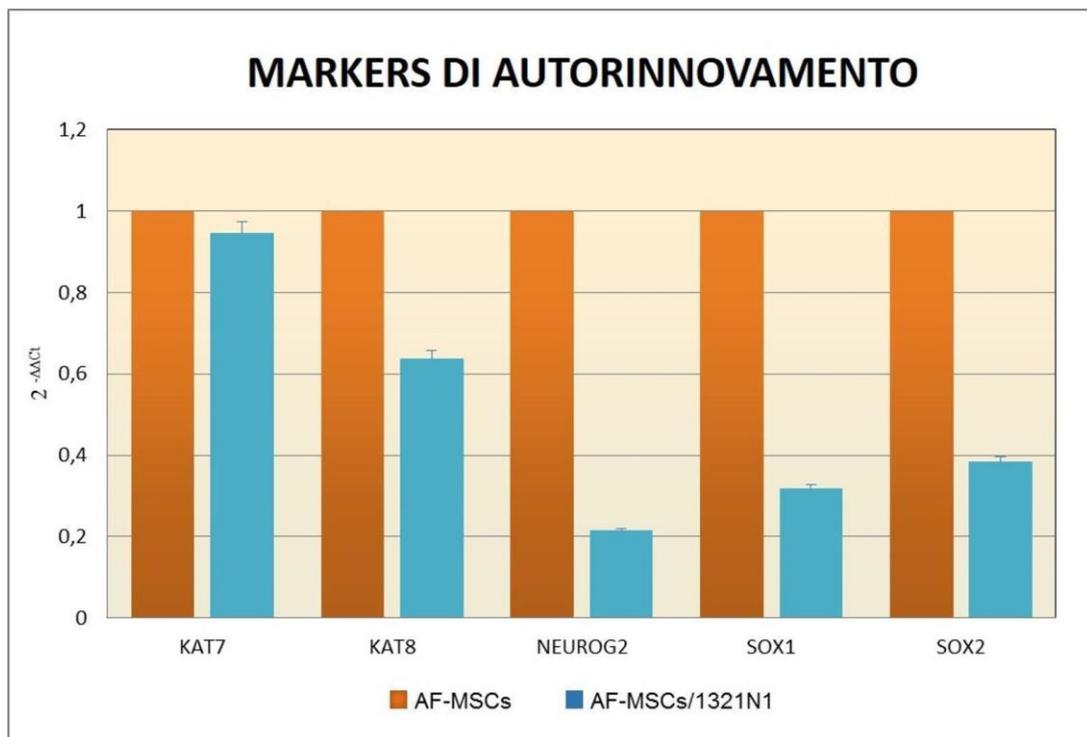


Fig. 11: espressione dei geni coinvolti nel processo di autorinnovamento nelle AFMSC coltivate isolatamente e dopo co-coltura con cellule gliali (AFMSC/1321N1)

Citochine e fattori di crescita: sono stati analizzati citochine e fattori di crescita in grado di regolare la proliferazione, il differenziamento e la maturazione cellulare.

Tra le molecole prese in considerazione è stata già descritta la riduzione dell'espressione di FGF1, FGF2 e FGF4 e un aumento di FGF2. Si è verificata inoltre un'aumentata espressione delle BMP (Bone Morphogenetic Protein) citochine coinvolte nel differenziamento neuronale e nel destino cellulare: BMP1 (+1.53); BMP2 (+1.35); BMP3 (+2.189) e una concomitante riduzione dei Growth Differentiation factor GDF2 (-0.16) e GDF3 (-0.12), fattori di crescita e differenziazione espressi a livello cerebrale che interferiscono con la pluripotenza delle cellule staminali inibendola.

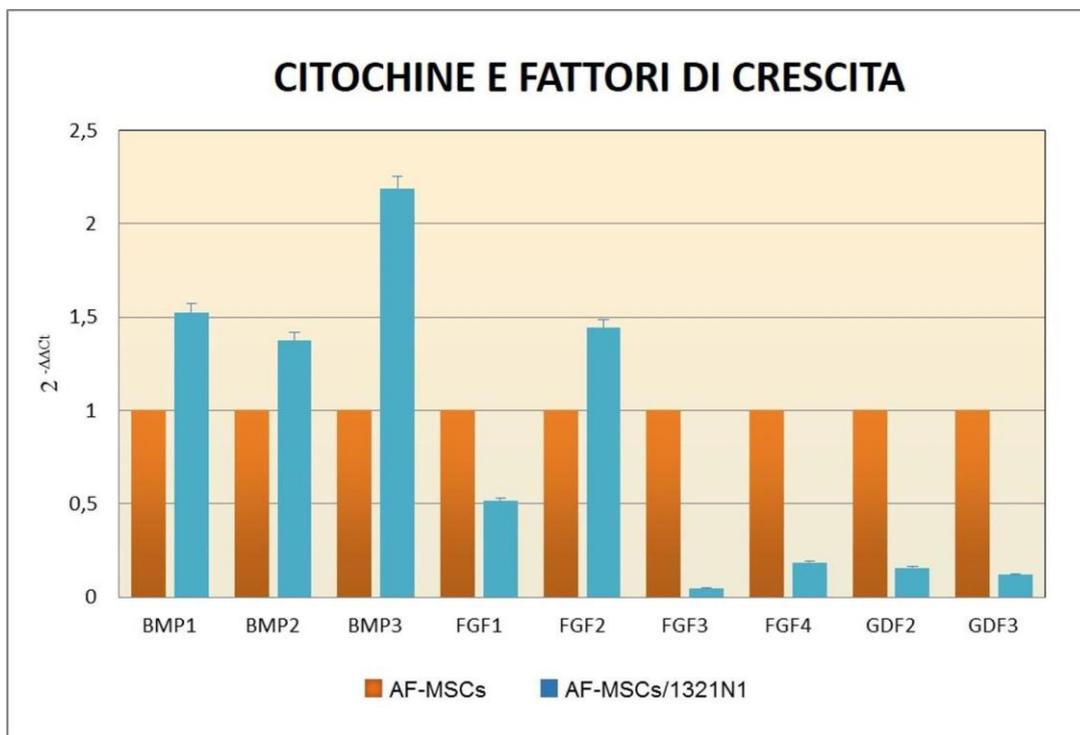


Fig. 12: espressione dei geni relativi a citochine e fattori di crescita nelle AFMSC coltivate isolatamente e dopo co-coltura con cellule gliali (AFMSC/1321N1)

Markers di differenziazione cellulare: dall'analisi dei geni che identificano specificatamente cellule embrionali e mesenchimali e di cellule che iniziano a differenziare in senso emopoietico o neuronale è stato visto che è fortemente diminuita l'espressione dei geni non implicati nel differenziamento in senso neuronale. Si ha invece overespressione delle molecole di adesione coinvolte nella sinaptogenesi CD44 (+1.62) e NCAM1 (+2.73), nonché di β -tubulina 3 (TUBB3, + 1.38), coinvolta nella formazione dei microtubuli neuronali.

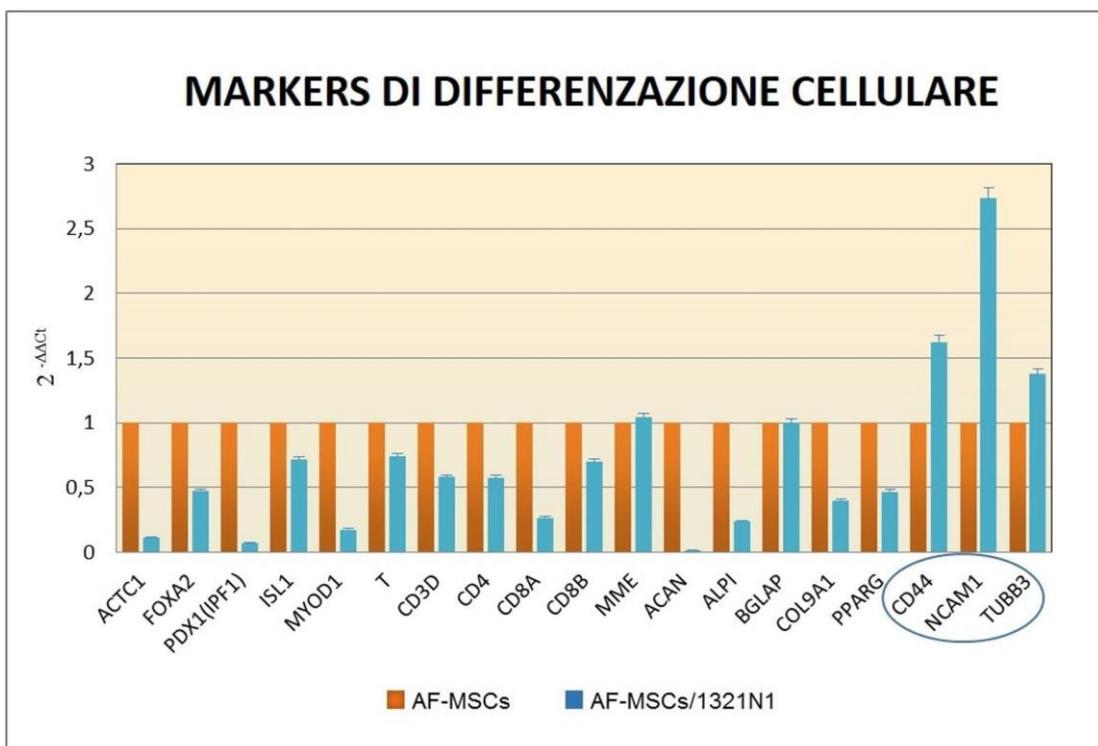


Fig. 13: espressione dei geni relativi ai markers di differenziazione cellulare nelle AFMSC coltivate isolatamente e dopo co-coltura con cellule gliali (AFMSC/1321N1)

NOTCH e WNT pathway: questi pathway molecolari sono fondamentali regolatori delle cellule staminali, coinvolti nel definire e mantenere la staminalità, nel destino cellulare e nella neurogenesi. WNT è implicato nei processi di sviluppo del sistema nervoso centrale; NOTCH promuove l'uscita dal ciclo cellulare e il differenziamento neuronale. Dopo co-coltura l'espressione dei geni coinvolti in questi pathways è risultata aumentata: WNT1 (+67.65), NOTCH1 (+2.3) e i suoi ligandi DLL1 (+6.19), JAG1 (+1.78) e NUMB (+1.4).

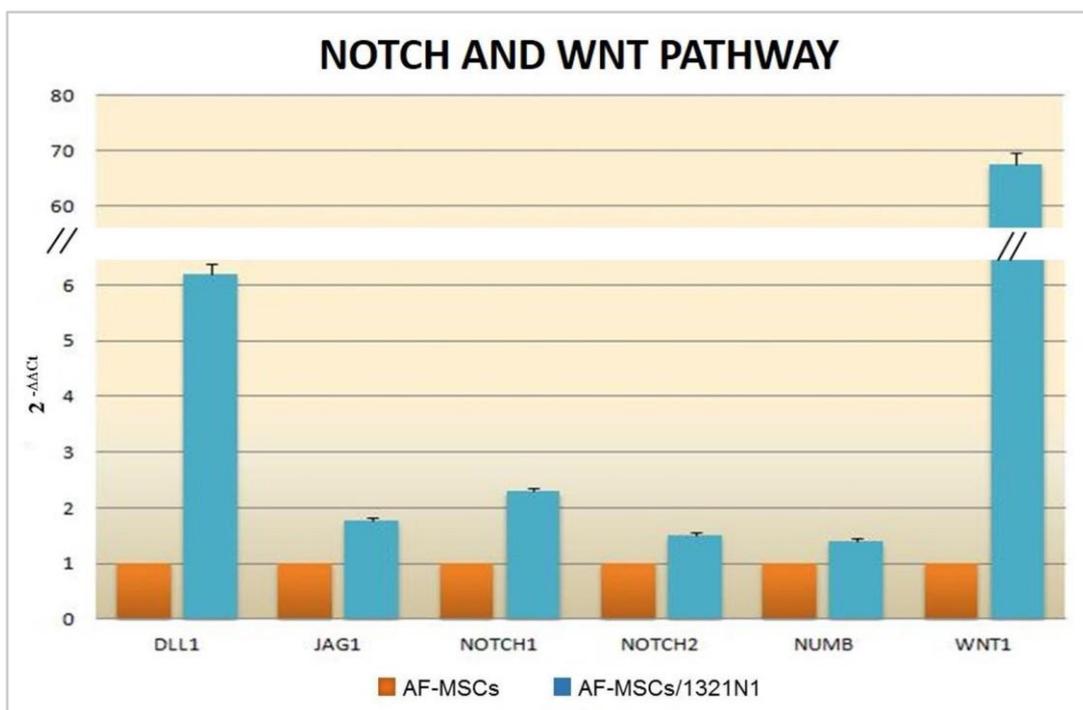


Fig. 14: espressione dei geni relativi ai pathways NOTCH e WNT nelle AFMSC coltivate isolatamente e dopo co-coltura con cellule gliali (AFMSC/1321N1)

PCR Array – neurogenesi

Notevoli modifiche dell'espressione genica dopo co-coltura con cellule della glia sono state osservate anche nelle piastre contenenti i geni coinvolti nella neurogenesi

Up-regulated genes	ACHE*, ADORA2A*, ALK*, BMP2, BMP4, CDK5R1, CXCL1*, DLL1*, EFNB1*, ERBB2, FGF2, GPI*, MDK*, MEF2C, KMT2A, NDN, NOG*, NOTCH1, NOTCH2, NRCAM*, NRP2*, NTN1, PARD3, PAX3*, PAX6*, POU4F1*, ROBO1*, SLIT2*, STAT3, VEGFA
No variation genes	ADORA1, APBB1, APP, ARTN, ASCL1, BCL2, CDK5RAP2, CREB1, DLG4, DRD2, DVL3, EP300, GDNF, GRIN1, HDAC4, MAP2, NEUROD1, NEUROG1, NEUROG2, NF1, NRG1, NRP1, NTF3, TENM1, PAFAH1B1, PAX5, PTN, RAC1, RTN4, S100B, SHH, SOX2, SOX8, TGFB1, TNF
Down-regulated genes	APOE*, BDNF, BMP8B, CHRM2*, DCX*, EGF, FLNA, HES1, HEY1, HEY2, HEYL, IL3, NDP*, NR2E3, OLIG2, POU3F3, S100A6, SOD1, TH

Tab. 4: variazioni di espressione dei geni di differenziamento in senso neuronale delle AFMSC in co-coltura. Il valore di AFMSC antecedente la co-coltura è stato posto pari a 1 ed è il valore di riferimento a cui sono state riferite le variazioni di espressione di mRNA delle AFMSC dopo co-coltura. * = p-value < 0,05

Differenziazione neuronale: è stato riscontrato un aumento dell'espressione di numerosi geni della differenziazione neuronale: BDNF (+2.79), CDK5RAP2 (+1.27), HES1 (+1.49), HEYL (+1.93), NEUROD1 (+1.21) e OLIG2 (+3.07).

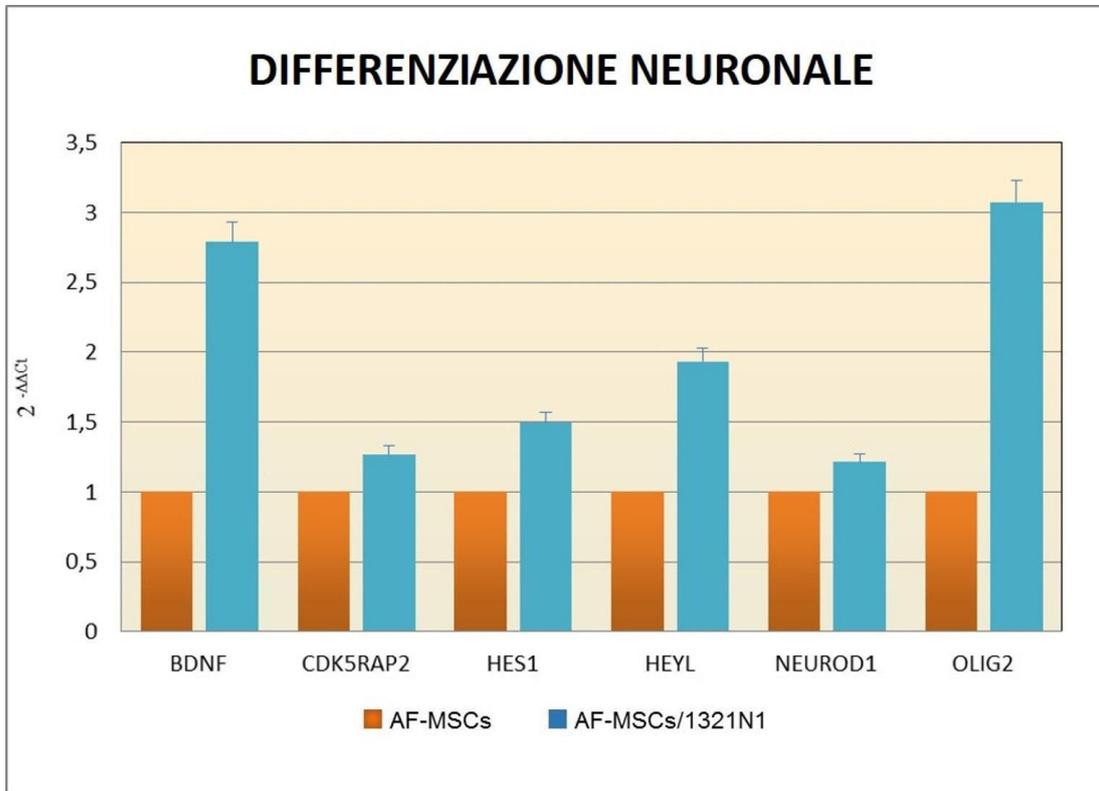


Fig. 15: espressione dei geni della differenziazione neuronale nelle AFMSC coltivate isolatamente e dopo co-coltura con cellule gliali (AFMSC/1321N1)

Funzione sinaptica: anche in questo caso c'è stato un aumento dell'espressione genica rispetto alle AFMSC prima della co-coltura con cellule astrocitarie per quanto riguarda i geni coinvolti nella regolazione di:

- plasticità sinaptica (ADORA1, +1.44; APOE, +5.46; BDNF, +2.79 e DRD2, +1.3)
- trasmissione sinaptica (APOE, +25.46; CHRM2, +11.88; SOD1, +1.66 e TH, +2.39)
- assonogenesi (APBB1, +1.23; DCX, +11.63; DRD2, +1.30; S100A6, +158)

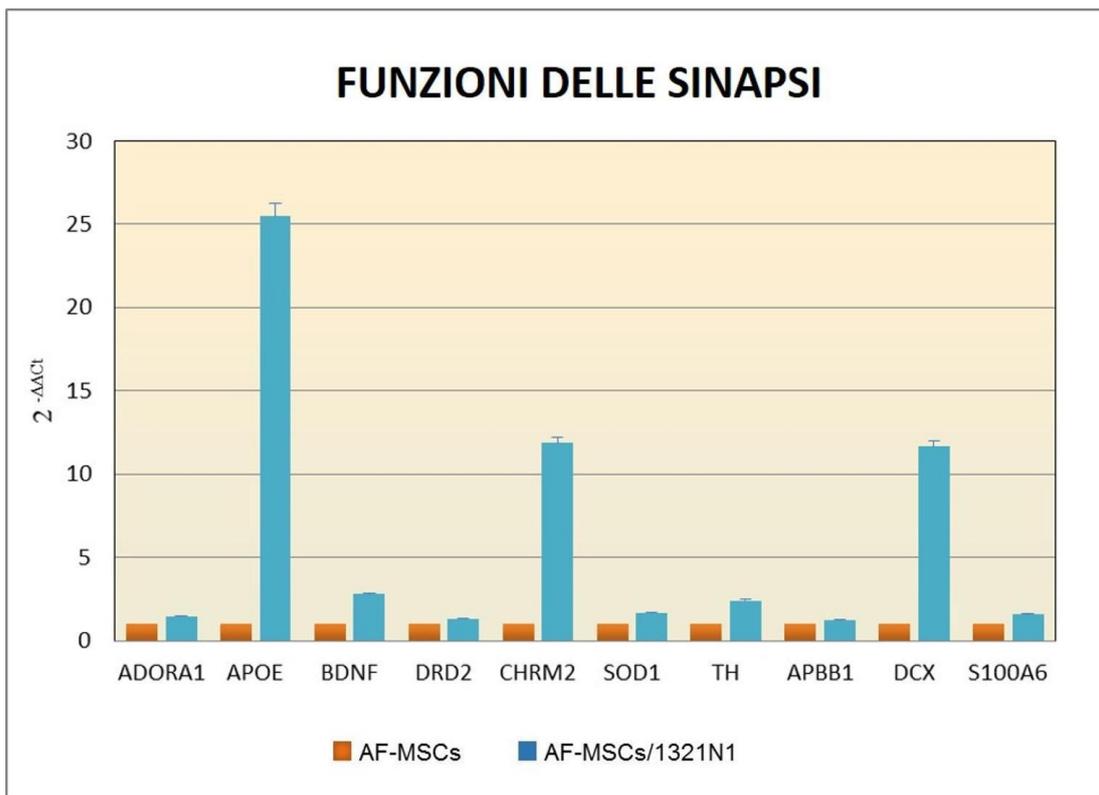


Fig. 16: espressione dei geni legati alle funzioni sinaptiche nelle AFMSC coltivate isolatamente e dopo co-coltura con cellule gliali (AFMSC/1321N1)

Fattori di crescita e citochine: i geni BDNF (+2.79), EGF (+4.17), NDP (+7.96), NRG1 (+1.39), PTN (+1.29) e S100A6 (+1.58) risultano iperespressi.

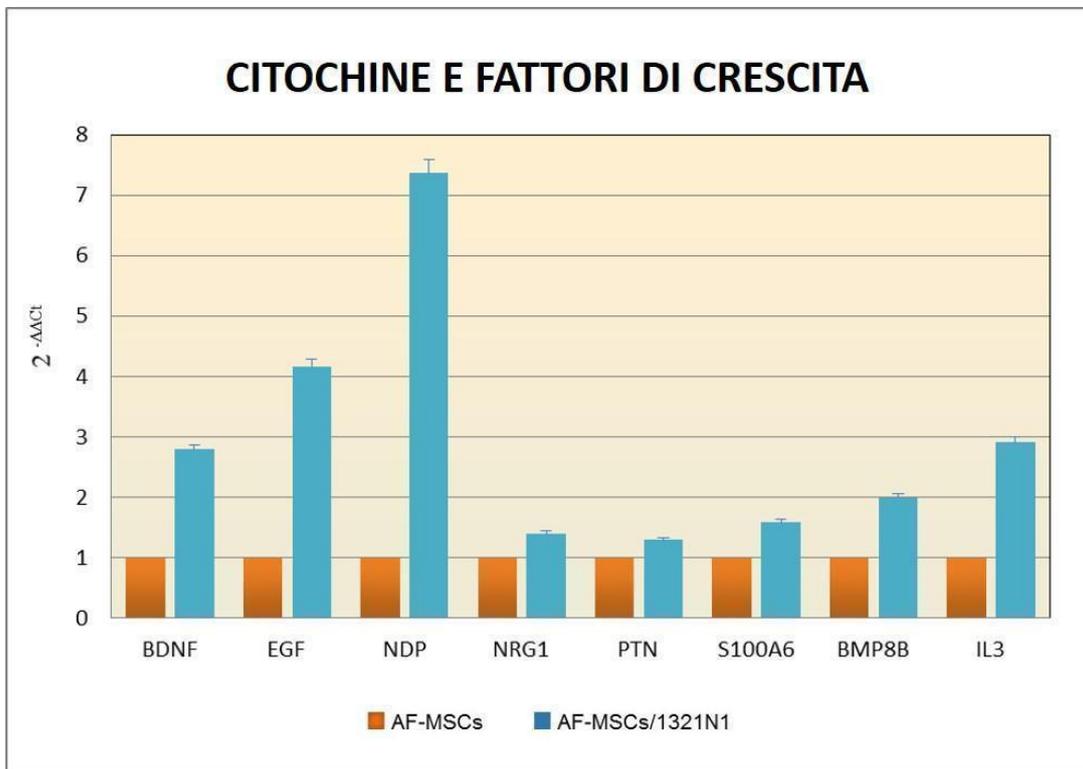


Fig. 17: espressione dei geni relativi a citochine e fattori di crescita nelle AFMSC coltivate isolatamente e dopo co-coltura con cellule gliali (AFMSC/1321N1)

Western Blot

Per approfondire gli effetti della co-coltura e valutare il differenziamento in senso neuronale delle AFMSC, è stata testata mediante Western Blot l'espressione delle proteine Nestina, proteina citoscheletrica dei neuroni, della β -Tubulina III, componente fondamentale dei microtubuli dei neuroni e delle proteine S100 e GFAP, entrambi markers delle cellule gliali.

Nello specifico il WB ha confermato i dati riportati nell'analisi molecolare, infatti dopo co-coltura con cellule astrocitarie è risultata un'overespressione della proteina Nestina e β -Tubulina III, markers dei progenitori neurali. Un basso livello basale di espressione di Nestina e β -Tubulina III è stato rilevato anche nelle AFMSC di controllo, ma tale espressione risulta nettamente aumentata nelle AFMSC dopo la co-coltura.

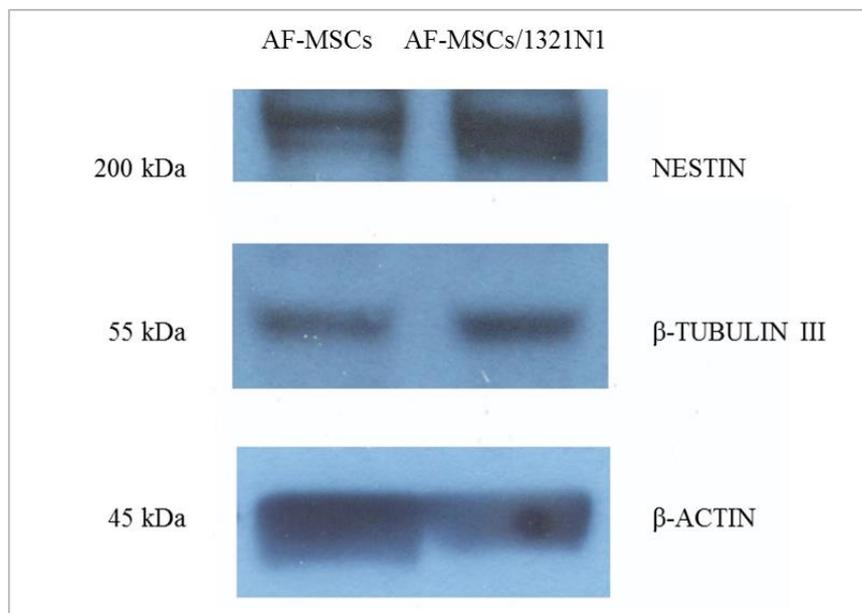


Fig. 18: *Analisi Western Blot di Nestina e β -Tubulina III espresse dalle AF-MSC prima (AF-MSCs) e dopo co-coltura con cellule astrocitarie (AF-MSCs/1321N1). La β -Actina è stata usata come controllo endogeno.*

Contestualmente, non è stata riscontrata l'espressione di GFAP e S100, suggerendo che la co-coltura ha spinto il differenziamento in senso neuronale e non gliale.

CONCLUSIONI

Le malattie neurodegenerative sono patologie a carico del sistema nervoso centrale con eziopatogenesi e sintomatologie ben distinte tra loro, caratterizzate da un processo cronico e selettivo di morte cellulare neuronale e ancora prive di cura.

La patogenesi di queste malattie è multifattoriale, ma il fattore di rischio maggiore sono i processi degenerativi legati all'età. Il deterioramento neuronale è causa di un inevitabile danno delle funzioni cerebrali che si manifesta, a seconda del tipo di malattia, con deficit cognitivi, demenza, alterazioni motorie e disturbi comportamentali più o meno gravi.

Ad oggi l'Alzheimer rappresenta la più comune forma di demenza nell'anziano; al mondo ci sono circa 35 milioni di persone affette da questa patologia e si prevede che nel 2030 il loro numero aumenterà fino a raggiungere i 70 milioni (161). Il morbo di Parkinson è la seconda malattia neurodegenerativa più comune dopo la malattia di Alzheimer (162). I malati di Parkinson in Italia sono più di 250.000 e la malattia è più comune negli anziani e la prevalenza aumenta dall'1% in quelli oltre i 60 anni di età, fino al 4% della popolazione sopra gli 80 anni.

A causa dell'invecchiamento generale della popolazione e della rilevanza di queste patologie anche in relazione ai loro costi sociali ed emotivi, le malattie neurodegenerative sono ai primi posti nell'interesse del mondo medico.

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) rappresentano uno dei tipi di cellule staminali più adatti all'utilizzo nel trattamento di molte patologie degenerative. Le cellule staminali mesenchimali sono cellule con elevato potenziale proliferativo in coltura e capacità di differenziazione multilineare (58).

La facile isolabilità, coltura e stabilità fenotipica, nonché la loro multipotenzialità e ipoimmunogenicità conferiscono a queste cellule un enorme potenziale terapeutico. Numerosi studi hanno dimostrato l'elevata capacità di *homing* delle MSC somministrate e il loro successivo differenziamento nei siti specifici di danno cellulare, o comunque il loro ruolo trofico e di promozione della rigenerazione nervosa.

Lavori recenti in letteratura (24; 88; 163; 164; 165) hanno evidenziato i tessuti fetali come una fonte di cellule staminali fenotipicamente simili alle MSCs del midollo osseo, ma con maggiore potenziale proliferativo e differenziativo.

Le MSC possono essere utilizzate in generale in tutti gli ambiti di applicazione della medicina rigenerativa, secondo diversi protocolli e vie di somministrazione; la speranza che queste cellule staminali abbiano il potenziale per trattare o curare le malattie neurodegenerative, per le quali le terapie efficaci sono carenti, giustifica gran parte del recente entusiasmo che riguarda le cellule staminali umane.

In questo lavoro sono state analizzate cellule staminali mesenchimali isolate da liquido amniotico (AFMSC) raccolto nel secondo trimestre di gravidanza e indotte a differenziarsi in cellule neuronali tramite co-coltura indiretta con cellule astrocitarie umane.

Le AFMSC isolate da 9 campioni di liquido amniotico sono state caratterizzate immunofenotipicamente ed è stato valutato il loro potenziale differenziativo in senso osteogenico, condrogenico e adipogenico. Le cellule hanno mostrato di soddisfare i requisiti minimi richiesti per la definizione di staminalità, a parte la capacità di differenziare in senso adipogenico. Tale risultato è in accordo con lavori già presenti in letteratura che attribuiscono ad una disregolazione dell'espressione dei membri della famiglia SMAD l'incapacità di originare cellule del lineage adipocitario (166). Stabilito il carattere mesenchimale di tali cellule, esse sono state co-coltivate in modo indiretto con cellule gliali, allo scopo di mimare le condizioni fisiologiche di differenziamento in senso neuronale delle stesse. AFMSC coltivate da sole sono state utilizzate come controllo. Prima e dopo co-coltura, le AFMSC sono state oggetto di studi molecolari

per valutare il loro differenziamento in senso neuronale. Nel dettaglio, è stata analizzata mediante RT-PCR (PCR Array) l'espressione di oltre 180 geni correlati alla staminalità e alla neurogenesi e mediante Western Blot è stata valutata l'espressione delle proteine coinvolte nella neurogenesi.

Durante la co-coltura, si è assistito a un progressivo rallentamento del tasso di proliferazione cellulare delle AFMSC e alla comparsa di una morfologia neurite-like, significativa di una risposta delle AFMSC ai fattori secreti dalle cellule gliali della co-coltura.

L'analisi dei livelli di espressione genica correlata alla staminalità e alla neurogenesi delle AFMSC ha coinvolto lo studio di oltre 180 geni e si sono osservate notevoli variazioni di espressione dopo co-coltura soprattutto nelle classi dei geni regolatori del ciclo cellulare, della divisione simmetrica e asimmetrica, nei markers di autorinnovamento e di differenziazione cellulare, nelle citochine e nei fattori di crescita.

Nello specifico, dopo co-coltura è diminuita l'espressione di FGF1, FGF3 e FGF4, geni regolatori della proliferazione e dell'autorinnovamento, mentre è risultato overespresso FGF2, gene coinvolto nella proliferazione di progenitori neuronali.

È risultata aumentata anche l'espressione di NOTCH1 e 2, NUMB e PARD6A, geni che promuovono la divisione asimmetrica, tipica delle cellule staminali adulte, che porta alla formazione di due cellule figlie: una specializzata, che va incontro a differenziazione, e una staminale che mantiene il pool di cellule indifferenziate.

Del pathway di NOTCH, così come di quello WNT, sono stati analizzati ulteriori geni, in quanto la loro regolazione della staminalità cellulare è molto complessa; i geni chiave di questi pathways coinvolti nella differenziazione neurale, testati con PCR Array, presentano un'espressione aumentata dopo co-coltura con cellule gliali e così anche l'espressione di DLL1 e JAG1, ligandi di NOTCH che guidano la neurogenesi.

Al contempo, come ci si aspettava presupponendo un processo di differenziamento, i geni correlati all'autorinnovamento sono risultati inibiti. Nello specifico: l'espressione

dei markers precoci non legati alla neurogenesi sono diminuiti, mentre CD44, NCAM1 e β -Tubulina III, marcatori precoci di neurogenesi, sono risultati iperespressi.

Notevoli modifiche dell'espressione genica dopo co-coltura con cellule della glia sono state osservate anche nelle piastre per l'analisi dei geni coinvolti nella neurogenesi. La plasticità sinaptica è fondamentale nella neurogenesi e permette al SNC di modulare l'intensità delle sinapsi e di stabilirne di nuove.

Per confermare i dati che suggerivano come la co-coltura con astrociti avesse innescato il processo differenziativo nelle AFMSC, sono stati quindi testati anche geni coinvolti nella plasticità sinaptica (ADORA1, APOE e BDNF) e geni tradizionalmente implicati nella differenziazione neuronale (BDNF, HES1, HEYL e NEUROD1) che sono risultati in entrambi i casi iperespressi.

Queste variazioni dopo co-coltura sono indicative dell'influenza dei fattori delle cellule gliali nel differenziamento in senso neuronale delle cellule staminali.

I dati evidenziati dall'analisi molecolare sono stati riconfermati anche dall'analisi proteica mediante Western Blot: dopo co-coltura con cellule astrocitarie è risultata un'overespressione delle proteine Nestina e β -Tubulina III, markers dei progenitori neurali, nettamente aumentata nelle AFMSC dopo la co-coltura rispetto alle AFMSC di controllo. Al contempo non è stata riscontrata l'espressione di GFAP e S100 nelle cellule in co-coltura, confermando che il differenziamento procedeva in senso neuronale e non gliale.

In conclusione, i dati ottenuti da questo studio indicano che la co-coltura indiretta di cellule staminali derivate da liquido amniotico con cellule astrocitarie umane mima fortemente l'ambiente fisiologico necessario alle cellule staminali per il loro differenziamento in senso neuronale e permette cambiamenti morfologici e di espressione genica suggestivi di differenziamento neuronale.

Nonostante l'iniziale traguardo verso la differenziazione neuronale di queste cellule staminali, sarà di primaria importanza valutarne la funzionalità.

Ulteriori studi saranno quindi necessari per valutare se oltre ai cambiamenti morfologici e di espressione genica e proteica osservati, queste cellule presentino anche le caratteristiche elettrofisiologiche proprie dei neuroni.

Le AFMSC sembrano comunque porsi come ottimi candidati per la terapia di patologie neurodegenerative.

BIBLIOGRAFIA

1. Coleman B, De Silva MG, Shepherd RK; *Concise Review: The Potential of Stem Cells for Auditory Neuron Generation and Replacement*. Stem Cells. 2007. 25(11):2685-94.
2. Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD; *Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro*. Mech Dev. 1996. 59(1):89-102.
3. Bishop AE, Buttery L, Polak JM; *Embryonic stem cells*. Journal of Pathology J Pathol. 2002. 197: 424–429.
4. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E; *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines*. Nature. 1984. 17-23;309(5965):255-6.
5. Nagy A, Gócza E, Diaz EM, Prideaux VR, Iványi E, Markkula M, Rossant J; *Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse*. Development. 1990. 110(3):815-21.
6. Evans MJ, Kaufman MH; *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature. 1981. 9;292(5819):154-6.
7. Martin GR; *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci USA. 1981. 78(12):7634-.
8. Wobus AM; *Potential of embryonic stem cells*. Mol Aspects Med. 2001. 22(3):149-64.
9. Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD; *Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants*. Science. 1999. 285(5428):754-6.
10. Keller G, Snodgrass HR; *Human embryonic stem cells: the future is now*. Nat Med. 1999. 5(2):151-2.
11. Geary S, Moon YS; *The human embryo in vitro: recent progress*. J Reprod Med. 2006. 51(4):293-302.
12. Commissione Dulbecco 2000, Steering committee on bioethics 2003, Commission of the European communities 2003.

13. <http://leg16.camera.it/561?appro=286#paragrafo2878>
14. Western P; *Foetal germ cells: striking the balance between pluripotency and differentiation*. Int J Dev Biol. 2009. 53(2-3):393-409.
15. Akiva JM, Dale Woodbury; *Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard*. J Cell Mol Med. 2008. 12(3): 730–742
16. O'Donoghue K, Choolani M, Chan J, de la Fuente J, Kumar S, Campagnoli C, Bennett PR, Roberts IA, Fisk NM; *Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis*. Mol Hum Reprod. 2003. 9(8):497-502.
17. Campagnoli C, Roberts I, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM; *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*. Blood. 2001. 98(8):2396-402
18. Campagnoli C, Fisk N, Overton T, Bennett P, Watts T, Roberts I; *Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood*. Blood. 2000. 95(6):1967-72.
19. Bianchi DW; *Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2000. 92: 103-108.
20. Johnson KL, Samura O, Nelson JL, McDonnell M d WM, Bianchi DW; *Significant fetal cell microchimerism in a nontransfused woman with hepatitis C: Evidence of long-term survival and expansion*. Hepatology. 2002. 36(5):1295-7.
21. Campagnoli C, Bellantuono I, Kumar S, Fairbairn LJ, Roberts I, Fisk NM; *High transduction efficiency of circulating first trimester fetal mesenchymal stem cells: potential targets for in utero ex vivo gene therapy*. BJOG. 2002. 109(8):952-4.
22. Bianchi DW; *Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis*. J Haematol. 1999. 105(3):574-83.
23. Bohmer RM1, Stroh HP, Johnson KL, Le Shane ES, Bianchi DW; *Fetal cell isolation from maternal blood cultures by flow cytometric hemoglobin profiles. Results of a preliminary clinical trial*. Fetal Diagn Ther. 2002. 17(2):83-9.
24. De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AG, Snyder EY, YOO JJ, Furth ME, Soker S Atala A; *Isolation of amniotic stem cell lines with potential of therapy*. Nature Biotechnology. 2007. 25: 100 – 106.

25. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP; *Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro*. BMC Dev Biol. 2007. 7: 11.
26. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U; *Stem cells derived from human fetal membranes display multi-lineage differentiation potential*. Biol Reprod. 2000. 77:577-88.
27. Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Freilinger A, Hengstschlager M; *Human amniotic fluid stem cells: a new perspective*. Amino Acids. 2008. 35(2):291-3.
28. Cibelli JB, Kiessling A, Cunniff K, Richards C, Lanza RP, West MD; *Somatic Cell Nuclear Transfer in Humans: Pronuclear and Early Embryonic Development*. The Journal of Regenerative Medicine. 2002. Volume 2.
29. Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sritanaudomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer RL, Wolf D, Mitalipov S; *Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer*. Cell. 2013. 53(6):1228-38.
30. Chung YG, Eum JH, Lee JE, Shim SH, Sepilian V, Hong SW, Lee Y, Treff NR, Choi YH, Kimbrel EA, Dittman RE, Lanza R, Lee DR; *Human somatic cell nuclear transfer using adult cells*. Cell Stem Cell. 2014. 14(6):777-80.
31. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V; *Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications*. J Postgrad Med. 2007. 53: 121-126.
32. Slack JMW; *Stem Cells in Epithelial Tissues*. Science. 2000. 287: 1431-1433.
33. Korbling M, Estrov Z; *Adult stem cells for tissue repair- a new therapeutic concept?* The new England journal of medicine. 2000. 349: 570-572.
34. Fuchs E, Segre JA; *Stem cells: a new lease on life*. Cell. 2000. 100: 143-155.
35. Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM; *Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis*. Cell. 2000. 102: 451-61.
36. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Massironi SMG, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF; *Isolation and Characterization of a Population of Immature Dental Pulp Stem Cells Expressing OCT-4 and Other Embryonic*. Stem Cell Markers. 2006. 184: 105-116.

37. Booth C, Potten CS; *Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells*. J Clin Invest. 2000. 105(11): 1493–1499.
38. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS; *Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells*. J Cell Biol. 2000. 151:1221-34.
39. Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, Nadeau DP, Gowen M; *Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders*. J Bone Miner Res. 1998. 13: 371-82.
40. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH; *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng. 2001. 7: 211–228.
41. Vessey CJ, Hall PM; *Hepatic stem cells: a review*. Panthology. 2001. 33: 130-141.
42. Gage FH; *Mammalian neural stem cells*. Science. 2000. 287: 1433-8.
43. Gritti A, Vescovi AL, Galli R; *Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential*. J Physiol Paris. 2002. 96: 81-90.
44. Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, Kim J, Chavala S, Scherr DS, Zhang F, Torres R, Gale NW, Yancopoulos GD, Murphy A, Valenzuela DM, Hobbs RM, Pandolfi PP, Rafii S; *Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors*. Nature. 2007. 449: 346-50.
45. 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.
46. 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

47. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR; *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science. 1999. 284: 143-7.
48. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J; *Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing*. Stem Cells. 2007. 25(11):2739-49.
49. Ambrosi G; *Embriologia e organogenesi in Anatomia dell'uomo*. Edi. Ermes, Editor 2001: Milano.
50. Luria EA, Panasyuk AF, Friedenstein AY; *Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells*. Transfusion. 1971. 11: 345-349.
51. Simmons PJ, Torok-Storb B; *Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1*. Blood. 1991. 78: 55-62.
52. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE; *Growth kinetics, selfrenewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation*. J. Cell. Biochem. 1997. 64: 278-294.
53. Colter D, Class R, Di Girolamo C, Prockop DJ; *Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*. PNAS. 2001. 97: 3213-3218.
54. Montzka K, Lassonczyk N, Tschöke B, Neuss S, Führmann T, Franzen R, Smeets R, Brook GA, Wöltje M; *Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression*. BMC Neurosci. 2009. 3: 10-16.
55. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. International Society for Cellular Therapy. Cytotherapy. 2005. 7(5): 393-5.
56. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW; *Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging*. Exp Hematol. 2004. 32: 414-425.
57. Dennis JE, Charbord P; *Origin and differentiation of human and murine stroma*. Stem Cells. 2002. 20: 205-214.
58. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM; *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.
59. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM; *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.* Nature 2002. 418: 41-49.
60. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN; *Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord.* Stem Cells. 2003. 21: 105-10.
61. <http://gazzette.comune.jesi.an.it/2006/106/4.htm>
62. Looijenga LH; *POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors.* Cancer Res. 2003. 63(9):2244-50.
63. Konrad Hochedlinger; *Ectopic Expression of Oct-4 Blocks Progenitor-Cell Differentiation and Causes Dysplasia in Epithelial Tissues Cell.* 2005. Vol. 121; 465–477.
64. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R; *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function Genes.* Dev. 2003. 17(1):126-40.
65. Yates I; *The homeodomain protein Nanog and pluripotency in mouse embryonic stem cells.* A. Bioscience. 2005. 33 (6) 1518-1521.
66. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A; *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.* Cell. 2003. 113: 643-55.
67. Cavalieri F, Schöler HR; *Nanog: a new recruit to the embrionic stem cell orchestra.* Cell. 2003. 113: 551-557.
68. Hanna LA, Foreman RK, Tarasenko IA, Kessler DS, Labosky PA; *Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo.* Genes Dev. 2002. 16: 2650-61.
69. Wilder PJ, Kelly D, Brigman K, Peterson CL, Nowling T, Gao QS, McComb RD, Capecchi MR, Rizzino A; *Inactivation of the FGF-4 gene in embryonic stem cells alters the growth and/or the survival of their early differentiated progeny.* Dev Biol. 1997 192: 614-29.
70. Tuan RS, Boland G, Tuli R; *Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering.* Arthritis Res Ther. 2003. 5: 32-45.

71. Fischbach GF, Fischbach RL; *Stem cells: science, policy and ethics*. J Clin Invest. 2004. 114: 1364-1370.
72. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M; *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo*. Nature Med. 2000. 6: 1229–1234.
73. Alison MR, Poulosom 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: 257.
74. Jackson KA, Mi T, Goodell MA; *Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle*. Proc Natl Acad Sci USA. 1996. 96: 14482–14486.
75. 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: 1528–1530.
76. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, Di Girolamo C, Prockop DJ; *Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats – similarities to astrocyte grafts*. Proc Natl Acad Sci USA. 1998. 95: 3908–3913.
77. Lennard AL, Jackson GH; *Science, medicine, and the future-stem cell transplantation*. BMJ. 2000. 321: 433-437.
78. Kattera S, Chen C; *Cryopreservation of embryos by vitrification: current development*. Int Surg. 2006. 91: S55-62.
79. Rowley SD; *Hematopoietic stem cell cryopreservation: a review of current techniques*. J Hematother. 1992. 1-233.
80. Wissel ME, Lasky LC; *Progenitor processing and cryopreservation*. In: Brecher ME, Lasky LC, Sacher RA; *Hematopoietic Progenitor Cells: Processing, Standards and Practice*. AABB, Bethesda. 1995. pag 109.
81. Grella PV; *Compendio di ginecologia e ostetricia*, Ed. Monduzzi. 2006. 550-552.
82. Cananzi M, Atala A, De Coppi P; *Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine*. Ethics, Bioscience and Life. 2009. Vol 4, n°1.
83. Pozzobon M1, Piccoli M, De Coppi P; *Stem cells from fetal membranes and amniotic fluid: markers for cell isolation and therapy*. Cell Tissue Bank. 2014. 15(2):199-211.

84. Sessarego N, Parodi A, Podesta M, Benvenuto F, Moggi M, Raviolo V, Lituanica M, Kunkl A, Ferlazzo G, Dagna Bricarelli F, Uccelli A, Frassoni F; *Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application*. Haematologica. 2008. 93(3).
85. Moschidou D, Mukherjee S, Blundell MP, Drews K, Jones GN, Abdulrazzak H, Nowakowska B, Phoolchand A, Lay K, Ramasamy TS, Cananzi M, Nettersheim D, Sullivan M, Frost J, Moore G, Vermeesch JR, Fisk NM, Thrasher AJ, Atala A, Adjaye J, Schorle H, De Coppi P, Guillot PV; *Valproic acid confers functional pluripotency to human amniotic fluid stem cells in a transgene-free approach*. Mol Ther. 2012. 20(10):1953-67.
86. 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; *Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy*. Nat Biotechnol. 2007. 25(1):100-6.
87. Mosquera A, Fernandez J, Campos A, Goyanes VJ, Diaz RR, Gosalvez J, *Simultaneous decrease of telomere length and telomerase activity with ageing of human amniotic fluid cells*. J Med Genet. 1999. 36: 494-6.
88. Poloni A, Rosini V, Mondini E, Maurizi G, Mancini S, Discepoli G, Biasio S, Battaglini G, Berardinelli E, Serrani F, Leoni P; *Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta*. Cytotherapy. 2008. 10:690-697.
89. Tsai MS, Lee JL, Chang YG, Hwang SM; *Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol*. Human Reproduction. 2004. 19:1450-1456.
90. Sakuragawa N, Nisawa H, Ohsugi K, Kakishita K, Ishii T, Thangavel R, Tohyama J, Elwan M, Yokoyama Y, Okuda O, Arai H, Ogino I, Sato K; *Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease*. Neurosci Lett. 1996. 209: 9-12.
91. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I; *Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells*. Neurosci Lett. 1996. 209: 9-12.
92. Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Valli A, Hengstschläger M; *Stem cells in amniotic fluid as new tools to study human genetic diseases*. Stem Cell Rev. 2007. 3:256-264.

93. Ronald GL; *Identification of a Novel Gene (HSN2) Causing Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type II through the Study of Canadian Genetic Isolates*. Am J Hum Genet. 2004. 74(5):1064-73.
94. Rubinsztein DC; *The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration*. Nature. 2006. 19;443(7113):780-6.
95. Di Mauro S, Schon EA; *Mitochondrial disorders in the nervous system*. Annual Review of Neuroscience. 2008. 31: 91-123.
96. Sims NR, Muyderman H; *Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke*. Biochim Biophys Acta. 2010. 1802(1):80-91.
97. . Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB, Chu Y, Beach TG, Adler CH, Halliday GM, Bartus RT; *Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease*. Brain. 2013. 136(Pt 8):2419-31.
98. Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K, Singleton A; *Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism*. Ann. Neurol. 2006. 60, 389-398.
99. Emborg EM; *Nonhuman Primate Models of Parkinson's Disease*. 2007. Vol.48, Number 4.
100. Allam MF, Del Castillo AS, Navajas RF; *Parkinson's disease risk factors: Genetic, enviromental, or both?* Neurol Res. 2005. 7:206-208.
101. Kuang XL, Liu F, Chen H, Li Y, Liu Y, Xiao J, Shan G, Li M, Snider BJ, Qu J, Barger SW, Wu S; *Reductions of the components of the calreticulin/calnexin quality-control system byproteasome inhibitors and their relevance in a rodent model of Parkinson's disease J Neurosci Res*. 2014. 92(10):1319-29.
102. Cornelissen T, Haddad D, Wauters F, Van Humbeeck C, Mandemakers W, Koentjoro B, Sue C, Gevaert K, De Strooper B, Verstreken P, Vandenberghe W; *The deubiquitinase USP15 antagonizes Parkin-mediated mitochondrial ubiquitination and mitophagy*. Hum Mol Genet. 2014. 23(19):5227-42.
103. Cohen G, Farooqui R, Kesler N; *Parkinson disease: a new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow..* Proc Natl Acad Sci. 1997. 94(10):4890-4.
104. Zuo L, Motherwell MS; *The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease*. Gene. 2013. 532(1):18-23.

105. Van Humbeeck C, Cornelissen T, Hofkens H, Mandemakers W, Gevaert K, De Strooper B, Vandenberghe W; *Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy*. J Neurosci. 2011. 31(28):10249-61.
106. Murphy KE, Halliday GM; *Glucocerebrosidase deficits in sporadic Parkinson disease Autophagy*. 2014. 10.
107. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW; *Rotenone, Paraquat and Parkinson's Disease*. Environ Health Perspect. 2011. Vol.119, n° 6. 866–72.
108. Liu L, Arun A, Ellis L, Peritore C, Donmez G; *Sirtuin 2 (SIRT2) enhances 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)-induced nigrostriatal damage via deacetylating forkhead box O3a (Foxo3a) and activating Bim protein*. J Biol Chem. 2012. 287(39):32307-11.
109. Góngora-Alfaro JL; *Caffeine as a preventive drug for Parkinson's disease: epidemiologic evidence and experimental support*. Rev Neurol. 2010. Vol. 50, n° 4, 221–9.
110. Castagnoli K, Murugesan T; *Tobacco leaf, smoke and smoking, MAO inhibitors, Parkinson's disease and neuroprotection; are there links?* Neurotoxicology. 2004. Vol. 25, 1–2:279–91.
112. Forno LS. *The Lewy body in Parkinson's disease*. Adv Neurol. 1987. 45:35-43
113. Dexter DT, Jenner P; *Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms*. Free Radic Biol Med. 2013. 62:132-44.
114. Isacson O, Breakfield XO; *Benefits and risks of hosting animal cells in the human brain*. Nature Med. 1997. 3: 964-969.
115. Bernal-Pacheco O, Limotai N, Go CL, Fernandez HH; *Nonmotor manifestations in Parkinson disease*. Neurologist. 2012. 18(1):1-16.
116. Stocchi F, Jenner P, Obeso JA; *When do levodopa motor fluctuations first appear in Parkinson's disease?* Eur Neurol. 2010. 63(5):257-66.
117. Hassan A, Bower JH, Kumar N, Matsumoto JY, Fealey RD, Josephs KA, Ahlskog JE; *Dopamine agonist-triggered pathological behaviors: surveillance in the PD clinic reveals high frequencies*. Parkinsonism Relat Disord. 2011. 17(4):260-4.
118. Duker AP, Espay AJ; *Surgical treatment of Parkinson disease: past, present, and future*. Neurol Clin. 2013. 31(3):799-808.

119. Yamada H; *The indication of DBS in Parkinson' disease from a neurological standpoint.* Rinsho Shinkeigaku 2012. 52(11):1098-9.
120. Crook R, Verkkoniemi A, Perez-Tur J, Mehta N, Baker M, Houlden H, Farrer M, Hutton M, Lincoln S, Hardy J, Gwinn K, Somer M, Paetau A, Kalimo H, Ylikoski R, Pöyhönen M, Kucera S, Haltia M; *A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1.* Nat Med. 1998. 4(4):452-5.
121. Ezquerra M, Carnero C, Blesa R, Gelpí JL, Ballesta F, Oliva R; *A presenilin 1 mutation (Ser169Pro) associated with early-onset AD and myoclonic seizures.* Neurology. 1999. 52(3):566-70.
122. Lopera F, Tobón N, Arcos-Burgos M, Vargas S, Gutiérrez JE, Rosselli M, Ardila A; *Image characterization of Alzheimer's disease associated with the E280A-PS1 mutation. Case-control study: MRI findings.* Rev. Neurol. 1999. 29(1):6- 12.
123. Mayeux R, Stern Y; *Epidemiology of Alzheimer disease.* Cold Spring Harb Perspect Med. 2012, 2:8.
124. Vanacore N, Maggini M, Raschetti R; *Epidemiologia della demenza di Alzheimer in Italia.* Notiziario ISS. 2005. Vol. 18, n* 2.
125. Hebert LE, Scherr PA, McCann JJ, Beckett LA, Evans DA; *Is the Risk of Developing Alzheimer's Disease Greater for Women than for Men?* Am. J. Epidemiol. 2001. 153(2):132-136.
126. Reitz C, Mayeux R; *Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers.* Biochem Pharmacol. 2014. 88(4):640-51.
127. Tanzi E; *The genetics of Alzheimer disease.* Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Oct 1;2 (10). pii:a 006296.
128. Holtzman DM; *Role of apoE/Aβ interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy.* J Mol Neurosci. 2001. 17:147-155.
129. Holtzman DM, Herz J, Bu G; *Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease.* Cold Spring Harb Perspect Med. 2012. 2(3):a 006312.
130. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G; *Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy.* Nat Rev Neurol. 2013. 9(2):106-18.

131. Giunta B, Obregon D, Velisetty R, Sanberg PR, Borlongan CV, Tan J; *The immunology of traumatic brain injury: a prime target for Alzheimer's disease prevention*. J Neuroinflammation. 2012. 1;9:185.
132. Muresan Z, Muresan V; *c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein-3 facilitates phosphorylation and controls localization of amyloid beta precursor protein*. J Neurosci. 2005. 25:3741-3751
133. Siahmard Z, Alaei H, Reisi P, Pilehvarian AA; *The effect of red grape juice on Alzheimer's disease in rats*. Adv Biomed Res. 2012. 1:63.
134. Bergamini M; *Il Bergamini di Neurologia*, Edizioni Libreria Cortina Torino. 2012. 24:531-533.
135. Serrano-Pozo A, Mielke ML, Muzitansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Bacskai BJ, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT; *Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol. 2012. 71(8):694-701.
136. Mohsenzadegan M, Mirshafiey A; *The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease*. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2012. 11(3):203-16.
137. Kaye R, Lasagna-Reeves CA; *Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity*. J Alzheimers Dis. 2013. 33 Suppl 1:S67-78.
138. Bloom GS; *Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis*. JAMA Neurol. 2014. 71(4):505-8.
139. Khan UA, Liu L, Provenzano FA, Berman DE, Profaci CP, Sloan R, Mayeux R, Duff KE; *Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease*. Small SA. Nat Neurosci. 2014. 17(2):304-11.
140. Marien MR, Colpaert FC, Rosenquist AC; *Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory*. Brain. Res. Rev. 2004. 45(1):38-78.
141. Möller C, Vrenken H, Jiskoot L, Versteeg A, Barkhof F, Scheltens P, Van Der Flier WM; *Different patterns of gray matter atrophy in early- and late-onset Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging. 2013. 34(8):2014-22.
142. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr; *The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Biochemistry. 1993. 32(18):4693-7.

143. Mesulam MM; *The systems-level organization of cholinergic innervation in the human cerebral cortex and its alterations in Alzheimer's disease*. Prog Brain Res. 1996. 109:285-97.
144. Marien MR, Colpaert FC, Rosenquist AC; *Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory*. Brain. 2004. 45(1):38-78.
145. Kawas CH; *Clinical practice. Early Alzheimer's disease*. N. Engl. J. Med. 2003. 349(11):1056-1063.
146. Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J; *The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease*. Neurology. 1996. 46(1):130-135.
147. Mc Khann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM; *Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease*. Neurology. 1984. 34(7):939-44
148. Wang Y1, Chen S, Yang D, Le WD; *Stem cell transplantation: a promising therapy for Parkinson's disease*. J Neuroimmune Pharmacol. 2007. 2(3):243-50.
149. Hermann A, Gerlach M, Schwarz J, Storch A; *Neurorestoration in Parkinson's disease by cell replacement and endogenous regeneration*. Expert Opin Biol Ther. 2004. 4(2): 131-43.
150. Zheng W, Honmou O, Harada K, Suzuki J, Liu H, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD; *Therapeutic benefits of human mesenchymal stem cell derived from bone marrow after global cerebral ischemia*. Brain Res. 2010. 1310:8-16.
151. Shichinohe H, Kuroda S, Lee JB, Nishimura G, Yano S, Seki T, Ikeda J, Tamura M, Iwasaki Y; *In vivo tracking of bone marrow stromal cells transplanted into mice cerebral infarct by fluorescence optical imaging*. Brain Res Brain Res Protoc. 2004. 13(3):166-75.
152. Qu C, Xiong Y, Mahmood A, Kaplan DL, Goussev A, Ning R, Chopp M; *Treatment of traumatic brain injury in mice with bone marrow stromal cell-impregnated collagen scaffolds*. J. Neurosurg. 2009. 111(4): 658-65.
153. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A; *Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy*. Blood. 2005. 106: 1755-1761.

154. Cummins G, Barker RA; *What is the most promising treatment for Parkinson's disease: genes, cells, growth factors or none of the above?* Regen Med. 2012. 7(5):617-21.
155. Hermann A, Gerlach M, Schwarz J, Storch A; *Neurorestoration in Parkinson's disease by cell replacement and endogenous regeneration.* Expert Opin Biol Ther. 2004. 4(2): 131-43.
156. *ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal Diagnosis* Ultrasound Obstet Gynecol 2016; 48: 256-268
157. <http://www.doubling-time.com/compute.php>
158. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E; *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy. 2006. 8 (4): 315-7.
159. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA; *Fluorescence activated cell sorting.* Rev Sci Instrum. 1972. 43: 404–409.
160. Orciani M1, Morabito C, Emanuelli M, Guarnieri S, Sartini D, Giannubilo SR, Di Primio R, Tranquilli AL, Marigliò MA; *Neurogenic potential of mesenchymal-like stem cells from human amniotic fluid: the influence of extracellular growth factors.* J Biol Regul Homeost Agents. 2011. 25(1):115-30.
161. Dartigues JF; *Alzheimer's disease: a global challenge for the 21st century.* Lancet Neurol. 2009. 8(12):1082-3.
162. de Lau LM, Breteler MM; *Epidemiology of Parkinson's disease,* Lancet Neurol. 2006. Vol. 5, n°6. 525–35.
163. Rada T, Reis RL, Gomes ME; *Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential.* Stem Cells Rev. 2011. 7:64-76.
164. Chang YJ, Shih DT, Tseng CP, Hsieh TB, Lee DC, Hwang SM; *Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood.* Stem Cells. 2006. 24:679-85.
165. Li C, Zhang W, Jiang X, Mao N; *Human-placenta-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation and function of allogeneic immune cells.* Cell Tissue Res. 2007. 330:437-446.

166. Lazzarini R, Olivieri F, Ferretti C, Mattioli-Belmonte M, Di Primio R, Orciani M; *mRNAs and miRNAs profiling of mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid and skin: the double face of the coin*. Cell Tissue Res. 2014. 355(1):121-30.