



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI MEDICINA, CHIRURGIA E ODONTOIATRIA
Polo Universitario S. Paolo

CATTEDRA DI FARMACOLOGIA
Prof. Alfredo Gorio

20 gennaio '06

**STUDIO DELLE BASI FONDAMENTALI PER L'APPLICAZIONE
DELLE CELLULE STAMINALI NEL TRAUMA SPINALE E
NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

Nella maggior parte dei casi di trauma cerebrale o spinale e di malattie neurodegenerative (malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson, ecc) ,i neuroni e la glia sono persi definitivamente. Da questo ne deriva che la possibilità di sostituire le cellule morte rappresenta un aspetto di grande importanza per il recupero dalle lesioni al SNC, nelle quali l'attivazione di altri sistemi suppletivi non possa fornire dei processi di plasticità adattativa in grado di sostituire funzionalmente i neuroni persi. Poiché la sostituzione del tessuto perso con cellule nuove rappresenta un importante possibilità, molti laboratori hanno utilizzato i trapianti di tessuto neurale fetale per effettuare una terapia cellulare dopo vari tipi di lesioni neurali. Queste sperimentazioni precliniche hanno poi portato all'organizzazione ed effettuazione di svariati studi clinici nell'uomo. Però problemi di tipo etico, fisico e di prelievo del tessuto fetale ne impedisce l'uso su larga scala. Idealmente, la fonte di cellule sostitutive dovrebbe essere più omogenea, facilmente ottenibile e singenica. Le cellule staminali sono una grande promessa e rappresentano quella ipotetica fonte omogenea per introdurre nuovi neuroni e cellule gliali nel sistema nervoso centrale dopo lesione traumatica. Le cellule neurali staminali sono state isolate da varie regioni del sistema nervoso centrale adulto ed in sviluppo di topi e ratti, ed inoltre è stato possibile coltivarle in vitro grazie all'uso di fattori di crescita come quelli dell'epidermide e dei fibroblasti. Le cellule staminali presentano vari vantaggi grazie al fatto di essere multipotenti e di possedere la capacità di propagarsi in vitro, inoltre possono essere individuate grazie a marcatori e modificate geneticamente con l'introduzione di geni terapeutici. I nostri studi precedenti nostri e di vari gruppi nel mondo hanno indicato che le cellule staminali somatiche possono essere trapiantate nel tessuto danneggiato dal trauma spinale. Inoltre è

stato dimostrato che la somministrazione di cellule staminali in topini affetti da morbo di Parkinson sperimentale ha mitigato significativamente la sindrome motoria, e le cellule sono sopravvissute a lungo secernendo dopamina. Questo ultimo è il neurotrasmettitore che manca ai pazienti affetti dal morbo di Parkinson e che viene a loro somministrato sotto forma di un precursore, la L-DOPA, per alleviare i loro sintomi

Le cellule staminali somatiche possono essere derivate dallo stadio di vita fetale o adulta e sono tessuto specifiche. L'ipotesi prevalente sul loro ruolo fisiologico è che potrebbero costituire una riserva di cellule multipotenti disponibili per sostituire cellule vecchie o danneggiate dello stesso tessuto. In alcuni casi questa ipotesi è ben provata e conosciuta, come per i casi di cellule satelliti nella rigenerazione del muscolo scheletrico, dei cheratinociti nella crescita cutanea e dei precursori del midollo osseo nella generazione di cellule del sangue. Le cellule staminali somatiche hanno un'attività proliferativa forte e potente durante un periodo illimitato di tempo. In questo modo, un numero costante di cellule staminali progenitrici è mantenuto in vita quando sono utilizzate costantemente nel caso di sostituzioni fisiologiche di pelle e cellule del sangue o anche dopo un improvviso bisogno come nel caso di riparazione tissutale. Quindi alcune cellule staminali proliferano e mantengono il pool esistente, mentre altre si differenziano. Non è ancora chiaro quali fattori influenzino il destino delle cellule staminali dello stesso tessuto, ma molti studi *in vitro* hanno suggerito che il processo possa essere regolato sia da fattori circolanti che da fattori locali.

Obiettivo della Sperimentazione

Punto 1) Caratterizzazione *in vitro*. La differenziazione neurale verrà valutata tramite metodi morfologici di tipo immunocitochimico e biochimici tramite Western blot e PCR (Polymerase Chain Reaction). Punto 2) Trapianto e valutazione della migrazione e “homing” al sito di lesione, e differenziamento *in vivo* delle cellule staminali neurali. Le sfere galleggianti isolate al terzo passaggio verranno dissociate e iniettate stereotassicamente nel sito della lesione midollare o somministrate per via endovenosa ai seguenti tempi dalla lesione: 1 giorno, 7, 60, 180 giorni. Per la rivelazione dei marcatori di differenziamento le sezioni verranno esposte ad anticorpi specifici. Punto 3) Valutazione del recupero della disabilità. Il recupero della disabilità degli arti posteriori sarà valutato mediante dei test comportamentali secondo i 21 punti della scala BBB. Tale test permette la quantificazione del deficit motorio degli arti posteriori osservando i loro movimenti in uno spazio aperto libero di ostacoli. Questo ci permetterà di valutare se i trattamenti cellulari e farmacologici sono in grado di modificare il recupero spontaneo, che si osserva dopo la lesione. Punto 4) Analisi immunocitochimica ed ultrastrutturale del destino delle cellule staminali trapiantate nel sito di lesione. Al fine di realizzare una dettagliata caratterizzazione del destino delle cellule staminali trapiantate nel sito di lesione o somministrate per via endovenosa, verranno

combinare metodiche di marcatura citochimica, immunoenzimatica, di immunofluorescenza e di immuno-oro per la microscopia ottica, confocale ed elettronica. Punto 6.) Sito di lesione, infiltrazione cellulare e citochine infiammatorie. Dati preliminari suggeriscono che le NSC esogene potrebbero controllare la reazione neuroinfiammatoria posttraumatica. L'azione delle cellule trapiantate sull'infiltrazione macrofagica ed infiammatoria in generale sarà valutata attraverso la visualizzazione delle cellule ED-1 positive per immunocitochimica, mentre quella sulla formazione della cicatrice gliale sfrutterà la positività di queste cellule al GFAP. Saggeremo attraverso ELISA la produzione sistematica e in situ di MIP-2 (IL-8), TNF-alpha e le altre citochine infiammatorie principali. Punto 8) I trattamenti farmacologici possono influenzare il destino e l'azione delle cellule staminali neurali? Il metilprednisolone rappresenta il trattamento standard per le lesioni spinali, per cui ci sembra opportuno valutare se la sua somministrazione singola dopo il trauma influenza il destino e gli effetti delle cellule staminali neurali.

In conclusione, i nostri studi hanno come obiettivo lo sviluppo di un trattamento capace di attenuare o, meglio, eliminare la degenerazione secondaria, ristabilire la conduzione nervosa e la funzionalità neurologica, e promuovere la rivascolarizzazione delle strutture rimaste intatte nel sito del trauma spinale. Per i nostri scopi, useremo cellule staminali neurali somatiche e cellule staminali autologhe derivate dalla pelle e appropriati trattamenti farmacologici.

RELAZIONE SUI PROGRESSI DEL PROGETTO DI RICERCA.

La relazione scritta e orale sugli avanzamenti della ricerca verranno presentati ogni anno nel mese di dicembre o gennaio dell'anno successivo nella riunione del comitato scientifico destinata a questo. Inoltre verrà fatta una presentazione informale in una riunione estiva da tenersi nei mesi di giugno o luglio.