



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

CATTEDRA DI FARMACOLOGIA
Prof. Alfredo Gorio

Milano, Giugno 2011

LE BASI FONDAMENTALI PER L'APPLICAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI NEL TRAUMA SPINALE ACUTO E CRONICIZZATO

La motivazione per questo progetto di ricerca si origina dal problema legato al recupero funzionale in seguito a lesioni spinali complete od incomplete. I recenti progressi della neurobiologia e della terapia farmacologica sperimentale hanno portato il sogno del recupero dopo lesione spinale nell'ambito dei progetti perseguibili. La lesione secondaria, che segue la lesione traumatica primaria (SCI), è fondamentalmente il risultato di un insulto di tipo ischemico; gli eventi biochimici e metabolici che sono associate alla disregolazione vascolare sono numerosi, e conducono ad una degenerazione progressiva che è ben più grande dell'iniziale danno meccanico. La patofisiologia della lesione traumatica spinale è anche interessata da una complessa interrelazione tra molecole pro- e anti-infiammatorie, e cellule migratorie. Entro le 12 ore dal trauma, i neutrofili entrano per primi nel sito di lesione seguiti nelle 24-48 ore successive dai linfociti e dalla microglia. Tra le citochine infiammatorie, l'interesse si è incentrato su MIP-2, TNF α , IL-1 β e IL-6 che aumentano drasticamente dopo lesione. Reparixin, un bloccante del recettore per IL-8 (MIP-2), blocca completamente l'infiltrazione di neutrofili e macrofagi nel midollo lesso (Gorio et al., 2007). La sommatoria complessa degli eventi degenerative primari e secondari determina la dimensione del danno tissutale, che normalmente si estende ben oltre i limiti dell'impatto meccanico. L'attenuazione da parte delle cellule staminali neurali adulte (NSC) delle anomalie molecolari e cellulari alla base della degenerazione secondaria potrebbe risultare in un drammatico miglioramento del recupero dalla disabilità provocata da SCI.

La capacità rigenerativa del sistema nervoso dei mammiferi adulti è ben maggiore di quanto pensavamo prima e le speranze di una connessione anatomica e funzionale del midollo lesso non sembra più irraggiungibile. Le NSCs sono state isolate da varie regioni del cervello, ma anche da cadaveri entro un breve periodo dalla morte. In un nostro studio recente abbiamo mostrato che la terapia cellulare per via endovenosa o intraspinale con NSCs adulte promuove il recupero

funzionale dopo la lesione traumatica del midollo spinale e questo è mantenuto per tutto il periodo osservazionale di 5-6 mesi, sebbene a questo punto le NSCs siano state tutte fagocitate dai macrofagi. L'effetto è probabilmente dovuto ad un potente aumento (da 10 a 100 volte) dell'espressione di fattori neurotrofici come NT-3, BDNF, e NGF nel sito di lesione, che si manifesta nelle prime 48 ore e, probabilmente, è responsabile dell'attenuazione della degenerazione secondaria. Le NSCs somministrate per via endovenosa raggiungono il sito di lesione, dove non trans-differenziano, e da dove possono essere recuperate entro i primi dieci giorni per riformare nuovamente delle cellule staminali in vitro. Questo processo di recupero della staminalità non è più possibile se viene effettuato 3 settimane dopo la somministrazione, le cellule seppure ancora indifferenziate sono già circondate dai macrofagi attivati che poi le fagocitano. Questo potrebbe essere una conseguenza degli elevati livelli di TNF α , che se da un lato potrebbero aver promosso il processo di rimielinizzazione dall'altro potrebbero aver stimolato ulteriormente l'infiltrazione macrofagica. Più recentemente, abbiamo isolato una nuova popolazione di NSCs resistenti all'ischemia (raccolte a 6 ore dalla morte del donatore), che presentano una marcata attivazione di HIF1 α ed esprimono eritropoietina ed il suo recettore. Queste cellule si differenziano prevalentemente in neuroni, oltre il 30% contro il 12-15% delle NSC raccolte alla morte del donatore e la cui azione è stata descritta sopra. Il differenziamento di queste cellule dipende dalla produzione endogena di EPO, poiché l'esposizione agli anticorpi per EPO o per EPOR inibisce il loro differenziamento verso il fenotipo neuronale (articolo sottoposto a revisione per pubblicazione). In forma preliminare abbiamo osservato che queste cellule migrano al sito di lesione nel midollo spinale e sopravvivono all'attacco dei macrofagi. Questo risultato aumenta fortemente le nostre speranze di essere sulla traccia di cellule staminali idonee per una terapia cellulare della SCI. Quindi, in ogni caso sembra che l'abilità delle NSCs di modificare l'ambiente della lesione sia alla base dell'effetto positivo sul recupero funzionale dopo SCI. Questo concetto è sostenuto anche dalla nostra precedente esperienza con cellule staminali derivate dal derma e dal midollo osseo, che differenziavano in funzione dello stadio del processo degenerativo post-traumatico. Nella fase infiammatoria precoce diventavano cellule infiammatorie e morivano dopo alcune settimane. Mentre, se il trapianto veniva fatto dopo 7 giorni dalla lesione, diventavano cellule GFAP-positive e partecipavano alla formazione della cicatrice.

TRAPIANTO E NEURORIABILITAZIONE

Recentemente è stato riportato uno studio condotto su un paziente con lesione midollare completa e cronicizzata, che è stato oggetto di un intenso trattamento riabilitativo associato ad elettrostimolazione del tratto spinale lombare per poco meno di due anni. In seguito a questo trattamento il paziente è stato in grado di recuperare l'abilità di mantenere la posizione eretta durante la stimolazione elettrica e l'abilità di muovere alcuni muscoli. In poche parole questo studio, che ha coinvolto due centri poderosi nella riabilitazione motoria come quelli della UCLA (University of California Los Angeles) e della University of Kentucky, ha dimostrato che a vari anni dalla lesione spinale i centri nervosi che regolano l'attività motoria a livello lombare (cioè caudale alla lesione) sono ancora vitali e funzionanti e che se propriamente stimolati o, meglio, innervati sono in grado di funzionare come prima. Questo indica che il ritorno del segnale nervoso attraverso il sito di lesione potrebbe portare ad un significativo miglioramento del recupero motorio. La ricerca condotta nei nostri laboratori indica che nelle cavie questo è possibile, sempre che siamo in grado di individuare quelle cellule staminali che sono in grado di sopravvivere nel sito di lesione e di rigenerare del tessuto sano. Le cellule staminali EPO-dipendenti potrebbero essere un primo esempio di questo.