

## Cellule staminali MESENCHIMALI

- **Cellule residue del tessuto connettivo embrionale** (quindi di derivazione mesodermica)
- **Non sono presenti in un solo tessuto e non hanno solo una nicchia**, ma si trovano sparse all'interno dello stroma di alcuni tessuti di derivazione mesodermica (come apparato scheletrico, nel tratto riproduttivo, tessuto adiposo, sangue e muscolo liscio) e hanno funzione regolatoria
- Sono **multipotenti**: possono differenziare in diversi tessuti; la prima scoperta è stata che sono in grado di formare nicchie ematopoietiche ectopiche in trapianti sottocutanei in animali, formando tessuto osseo (ci sono alcuni lavori che mostrano la possibilità di queste cellule di *transdifferenziare* in neuroni, cioè una cellula mesodermica differenzia in tessuto ectodermico - ancora molto discussi)
- Negli ultimi anni, sono state usate per **sperimentazioni cliniche**: sono facilmente ricavabili da molti tessuti, tra cui il grasso, senza causare problematiche al paziente. Usate anche per trattamenti autologhi e somministrate per via endovenosa.

### Vengono isolate da:

1. MIDOLLO OSSEO
2. TESSUTO ADIPOSO (si chiamano *adipose derived stem cells* e vengono ottenute attraverso liposuzione)
3. CORDONE OMBELICALE (da qui vengono isolate *cellule del cordone* che contengono diversi tipi di progenitori, queste staminali mesenchimali hanno caratteristiche più proliferative rispetto a quelle derivate dal tessuto adulto)
4. POLPA DENTALE
5. UTERO
6. PERICITI

RUOLO IN VIVO	RUOLO NELLE TERAPIE
<p>Il tessuto più studiato è la <u>nicchia ematopoietica</u>: nel midollo osseo, ci sono più nicchie e in alcune ci sono cellule mesenchimali che regolano l'omeostasi del tessuto e la sua attività. Queste esprimono <i>CXCL-12</i> (serve per ritenere le staminali) e <i>SCF</i> (fattore di sopravvivenza).</p> <p>Funzioni:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- controllare l'attività delle cellule differenziate del tessuto ematopoietico</li> <li>- mantenere le plasmacellule e i linfociti della memoria (mantengono i linfociti T in quiescenza e riducono l'infiammazione in molte patologie)</li> </ul>	<p>Vengono utilizzate per il loro ruolo <u>immunoregolatorio</u>: riducono l'attività di cellule T, B, dendritiche, macrofagi e microglia.</p> <p>In base a queste caratteristiche, sono state proposte terapie per patologie neurologiche infiammatorie come la sclerosi multipla.</p> <p>Queste cellule però non sembrano permanere per molto tempo nei tessuti dopo il trapianto, presentano un'azione di tipo <b>touch&amp;go</b>: entrano nei tessuti, li colonizzano e rilasciano fattori attivi nel ridurre i meccanismi della patologia, poi perdono adesione e vengono degradate.</p>

## Cellule staminali EMBRIONALI

- Sono **pluripotenti**: sono in grado di generare tutto l'embrione (una SE ha la capacità di generare i 3 foglietti embrionali)
- **Si sviluppano pochi giorni dopo la fecondazione**: ad un certo stadio della **BLASTOCISTI**, si trova un nodo di cellule chiamato **INNER CELLS MASS** che contiene le SE.
- Hanno una caratteristica che le farebbe escludere dalla categoria delle staminali in quanto, pur essendo pluripotenti, la loro **capacità di automantenimento è limitata**: la SE dotata di automantenimento esiste solo per poco nella inner cell mass, dopodiché le staminali cominciano a differenziare. Per questo, sono definite "staminali potenziali in vivo" in quanto, in condizioni fisiologiche, sono cellule che non possiedono proprietà di automantenimento; mentre in vitro presentano tutte le caratteristiche staminali (sono in grado di proliferare per un numero di cicli più elevato rispetto alle altre e sono pluripotenti)
- **La prima volta che si è cercato di isolare le SE è stato nel '98**, in cui un articolo spiegava come prelevare la inner cell mass della blastocisti e come avveniva la coltura in vitro in condizioni particolari. Questo protocollo suscitò **problemi di tipo etico** a causa dell'utilizzo degli **embrioni**, considerati (soprattutto dagli stati cattolici) potenziali individui; sono state poi sviluppate una serie di linee guida per l'utilizzo di SE e anche sistemi alternativi per ottenerle:
  - utilizzo di embrioni morti o che non si sarebbero sviluppati, con anomalie genetiche incompatibili con la vita;
  - metodo della biopsia (prelievo di solo una SE dalla inner cell mass senza intaccare l'embrione);
  - clonazione o creazione di cellule indotte pluripotenti;
  - tecnica della partenogenesi.
- **Non sono facili da crescere in coltura**: formano colonie, quando il bordo è netto vuol dire che la colonia sta bene e non si sta differenziando. Per crescerle in coltura bisogna prima fare un layer di altre cellule sottostanti e poi bisogna avere particolari condizioni per evitare che le cellule differenzino.
- **Sono cellule che possono formare tumori**: sono iperproliferative, fanno quello che fa un tumore ma in modo controllato, mantengono il controllo dell'attività proliferativa e differenziativa.
- **Capacità di inibire la senescenza cellulare**, che viene attivata quando la cellula supera un certo limite di replicazione: questo limite si chiama **HAYFLICK LIMIT** (valutato sui fibroblasti). Le SE riescono a bypassare questo meccanismo e sono state duplicate per 2 anni con 500 duplicazioni. Le SE hanno anche telomeri più lunghi di qualsiasi altra cellula somatica: infatti, tra i vari elementi della senescenza è importante la lunghezza dei telomeri che dipende dalle telomerasi: i telomeri si trovano nelle parti finali dei cromosomi, ad ogni ciclo di replicazione, un pezzo di telomero viene perso a meno che non ci siano le telomerasi ad allungarlo → nelle cellule senza telomerasi, quando le replicazioni cellulari raggiungono un certo numero, il telomero è molto corto e la cellula entra in senescenza replicativa. La lunghezza dei telomeri, quindi, può fare la differenza tra una staminale somatica multipotente e una staminale embrionale pluripotente.

### Signaling per il mantenimento della pluripotenza e il self-renewal delle SE

Le molecole più importanti per il SIGNALING sono

- **fattori di trascrizione** e **fattori epigenetici** → la cellula deve mantenere: il **nucleo** in modo tale da poter diventare qualsiasi tipo di cellula il proprio **corredo** e l'**accessibilità al DNA** aperti

Per l'AUTOMANTENIMENTO sono:

- **LIF** (fluoruro di litio) → importante per i topi meno per l'uomo, che insieme a **BMP** mantiene la cellula indifferenziata
- **FGF**, fattore principalmente umano

**Cellule staminali PLURIPOTENTI INDOTTE (IPSC)**

- **Corrispettivo delle staminali embrionali però prodotte in laboratorio:** si ottengono dalla riprogrammazione del nucleo di una cellula somatica attraverso l'introduzione di fattori che trasformano il nucleo da somatico unipotente a pluripotente.
- **Possibilità di sviluppare protocolli di terapia cellulare autologa:** queste cellule vengono ottenute da cellule somatiche adulte direttamente dal paziente, modificate e poi reinserite nel paziente. Il trapianto autologo non sempre è possibile (è utile nel caso in cui la patologia dipenda solo da 1 gene).
- Altra terapia in cui si utilizzano le IPSC = terapia personalizzata.
- **In vitro**, le IPSC possono essere usate:
  - come modelli cellulari di una patologia per testare alcuni farmaci specifici per il paziente → **drug screening**
  - al fine di studiare la base di alcune patologie per capirne i meccanismi cellulari → **functional studies**

Per capire se la riprogrammazione è avvenuta correttamente si valutano diversi parametri:

**EFFICIENZA** (cioè quante colonie o cellule riprogrammate si ottengono a partire da un certo numero di cellule del donatore);

**QUALITÀ DEL PRODOTTO FINALE**

**RIPRODUCIBILITÀ**

Cellule donatrici	Fattori di riprogrammazione
<p>Vengono scelte in base a:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Facilità di estrazione:</b> ad es. biopsia cutanea</li> <li>- <b>Rilevanza terapeutica:</b> ad es. è più semplice ottenere cellule cardiache da IPS di derivazione cardiaca</li> <li>- <b>Facilità di riprogrammazione:</b> più le cellule sono differenziate più difficile sarà riprogrammarle (es. le cellule neurali sono facili da riprogrammare ma difficili da raggiungere, allora si usano maggiormente <i>fibroblasti</i> e <i>cellule del sangue</i>)</li> </ul>	<p>Per ottenere la riprogrammazione si devono over-esprimere alcuni fattori:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Fattori della pluripotenza embrionale</b> come Nanog, Oct-4 e Sox2</li> <li>- <b>Fattori della proliferazione cellulare</b> come Myc e KLF4</li> </ul> <p>Altri fattori, invece, si devono reprimere:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Senescenza</b></li> <li>- <b>P53</b></li> <li>- <b>Apoptosi</b></li> </ul>

**Metodi di delivery** →

i **VETTORI VIRALI** sono tra i più utilizzati perché sono molto efficienti e riproducibili →

<b>VETTORI VIRALI</b>	<p><b>Lentivirus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Danno l'opportunità di usare diversi promotori</li> <li>- Danno la possibilità di silenziare il gene o di asportarlo con la <i>cre-recombinasi</i></li> <li>- L'efficienza di riprogrammazione è solo dello 0,1%</li> </ul>
<b>VETTORI INTEGRANTI NON VIRALI</b>	<p><b>Plasmidi</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bassa efficienza di trasferimento e riprogrammazione</li> </ul>
<b>VETTORI NON INTEGRANTI</b>	<p><b>Vettori episomiali; RNA; proteine; adenovirus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Buona efficienza</li> </ul>

**CELLULE STAMINALI TUMORALI** (*cancer stem cells*)

Una cellula tumorale viene definita tale quando possiede **2** proprietà:

- **Proliferazione incontrollata**
- **Non rispettano la citoarchitettura del tessuto** in cui si trovano, invadendo i tessuti circostanti

I tumori si possono classificare in base a:

- Grado di malignità
- Tessuto di origine
- Valutazione del profilo proteico e genico

**TUMORE BENIGNO** (*neoplasia*)

- Crescita espansiva ma lenta
- Forma una massa isolata
- Si rimuove facilmente con la chirurgia

**TUMORE MALIGNO** (*cancri*)

- Crescita espansiva e veloce
- Si infiltra formando *metastasi*
- Difficile rimozione (non c'è una linea netta di distinzione tra tessuto sano e malato).

Esistono **2 modelli** riguardanti lo sviluppo di un tumore:

MODELLO 1	MODELLO 2
<p>Prevede l'evoluzione clonale da una singola cellula che muta a causa di instabilità genica. In sostanza, un'unica cellula tumorigenica dà origine all'intera massa tumorale, che man mano diventa più aggressiva e acquista energie dall'organismo.</p> <p>Tra le modificazioni acquisite vi sono:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Autonomia replicativa</b></li> <li>- <b>Riduzione della capacità differenziativa</b></li> <li>- <b>Instabilità genetica</b></li> </ul> <p>Ruolo decisivo e importante è quello dell'<b>angiogenesi</b> (genesì di vasi sanguigni) che promuove la proliferazione tumorale.</p>	<p>Prevede l'esistenza di una popolazione di cellule staminali tumorali da cui ha origine il tumore: questo spiega l'eterogeneità presente nel tumore, in quanto le cellule tumorali sono diverse perché presentano elementi diversi del tessuto tumorale.</p> <p>Si è visto che ci sono cellule staminali che:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- portano avanti la crescita del tumore</li> <li>- sono in grado di rigenerarlo (insorgenza della <b>recidiva</b>).</li> </ul> <p>Inoltre, è possibile che queste cellule staminali tumorali possano annidarsi in siti «protetti» del corpo, dove possono rimanere indisturbate per molto tempo, anche anni, fino a quando uno stimolo arriva a risvegliarle, causando la ripresa della malattia. Ad es. nel caso dei tumori del sangue è stato ipotizzato che le cellule staminali leucemiche vadano a rintanarsi all'interno del midollo osseo, proprio nella stessa «nicchia» che accoglie e protegge le cellule staminali sane.</p>