

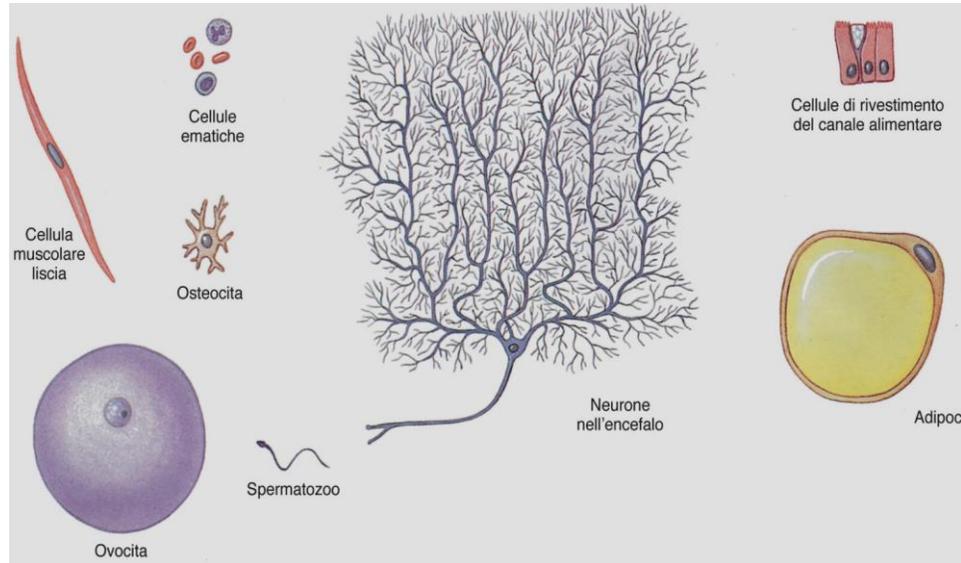
ISTOLOGIA

Studio dei tessuti

Tessuto

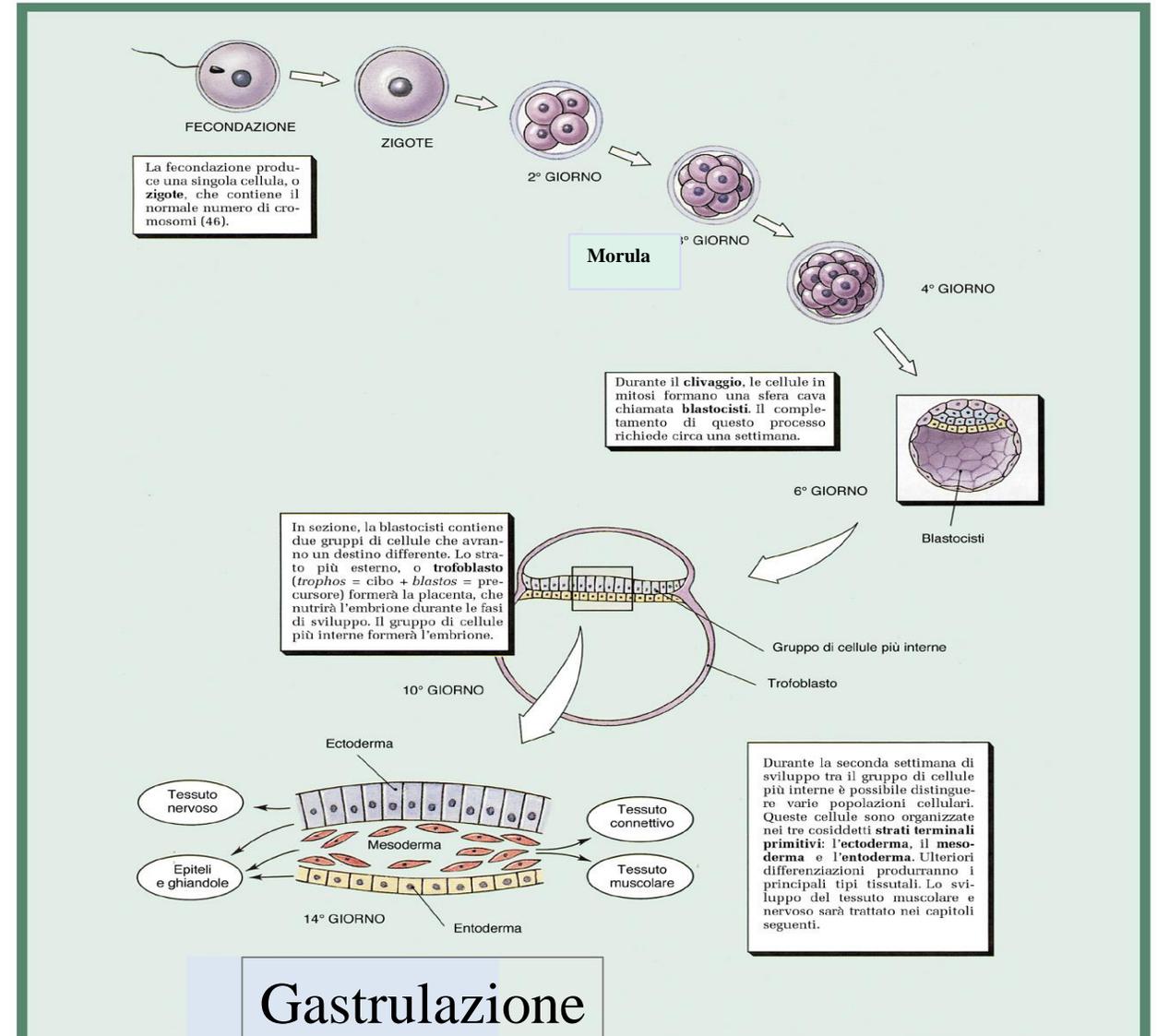
Struttura organizzata e con funzioni specifiche, costituita da uno o più tipi cellulari diversi e dalla matrice extracellulare prodotta dalle cellule stesse.

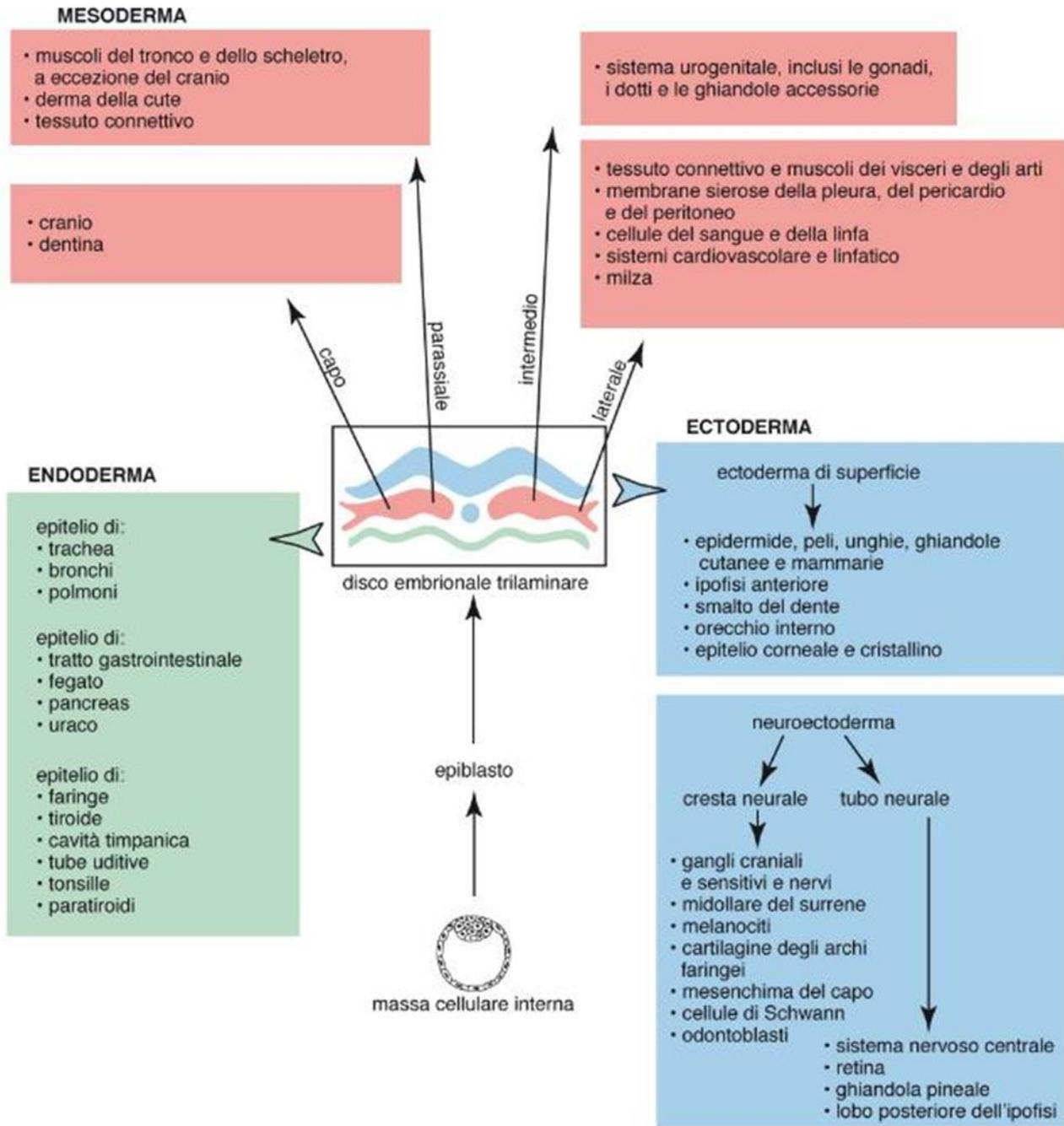
Tutte le cellule di un organismo derivano dallo zigote e contengono lo stesso genoma: quando inizia il differenziamento?



Lo sviluppo è il processo attraverso il quale da una singola cellula ha origine un organismo pluricellulare

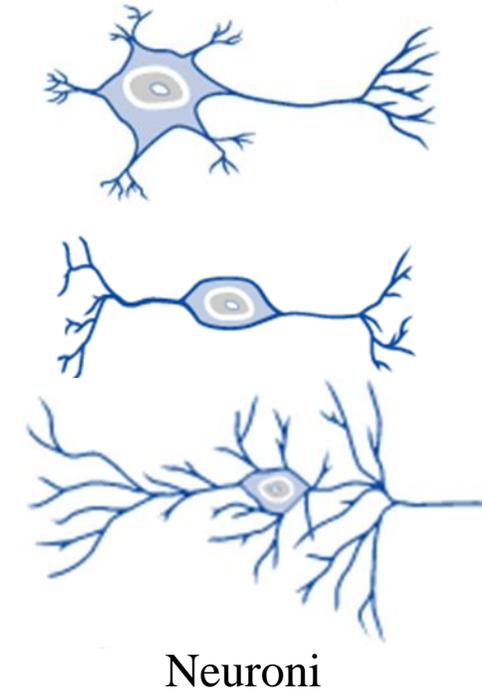
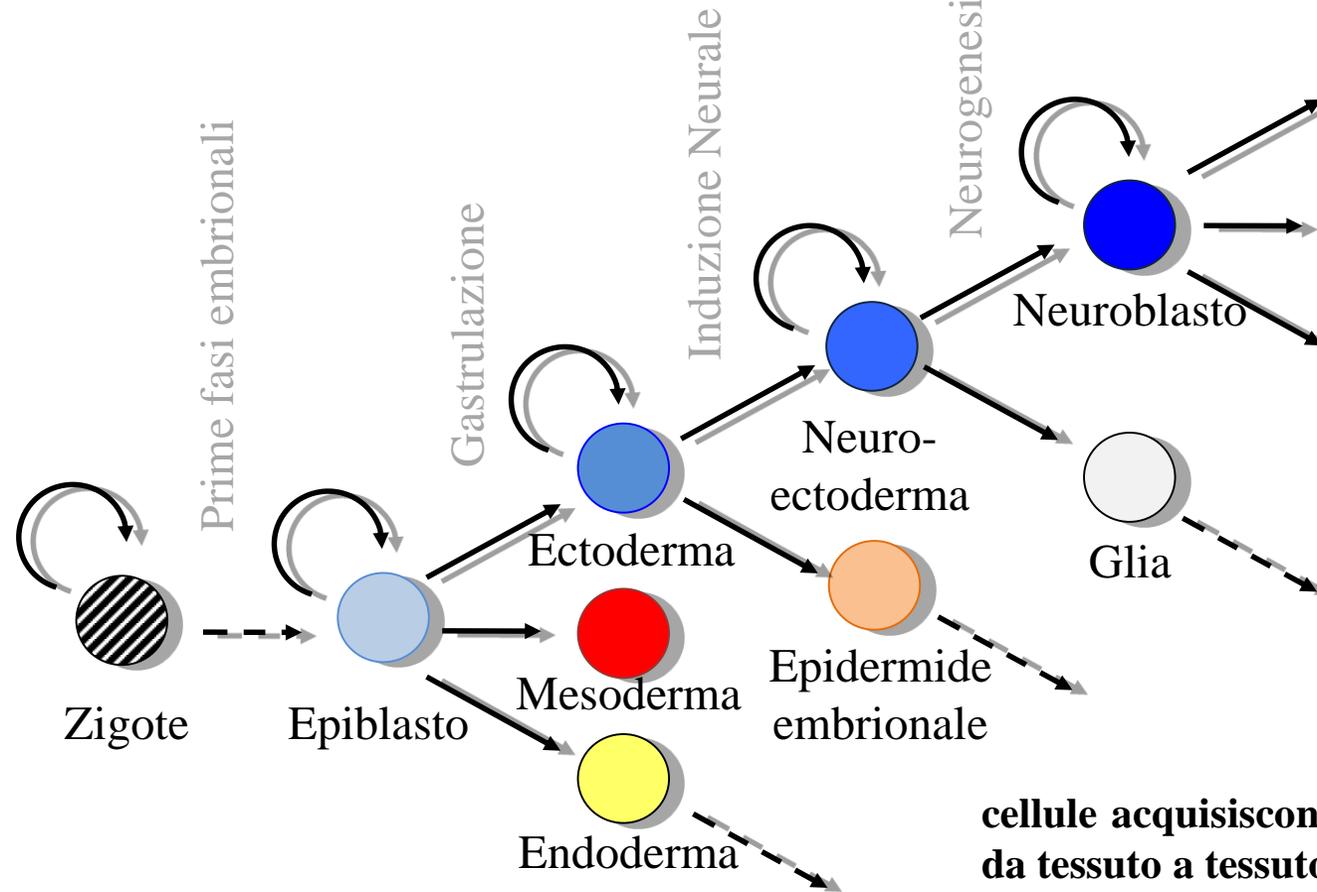
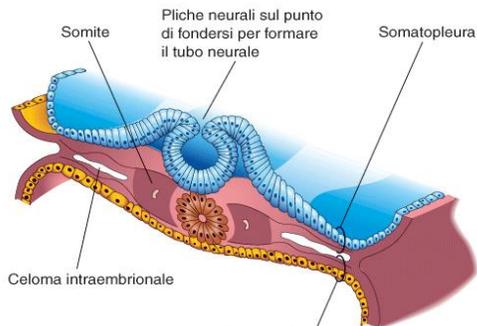
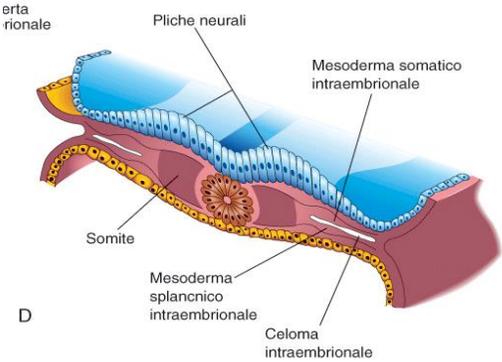
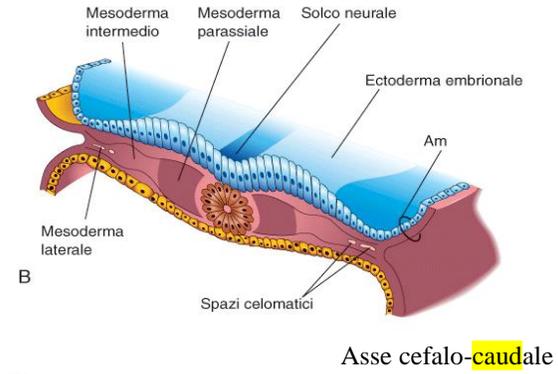
CENNI EMBRIOLOGICI: LA FORMAZIONE DEI TESSUTI





Differenziamento cellulare o istogenesi

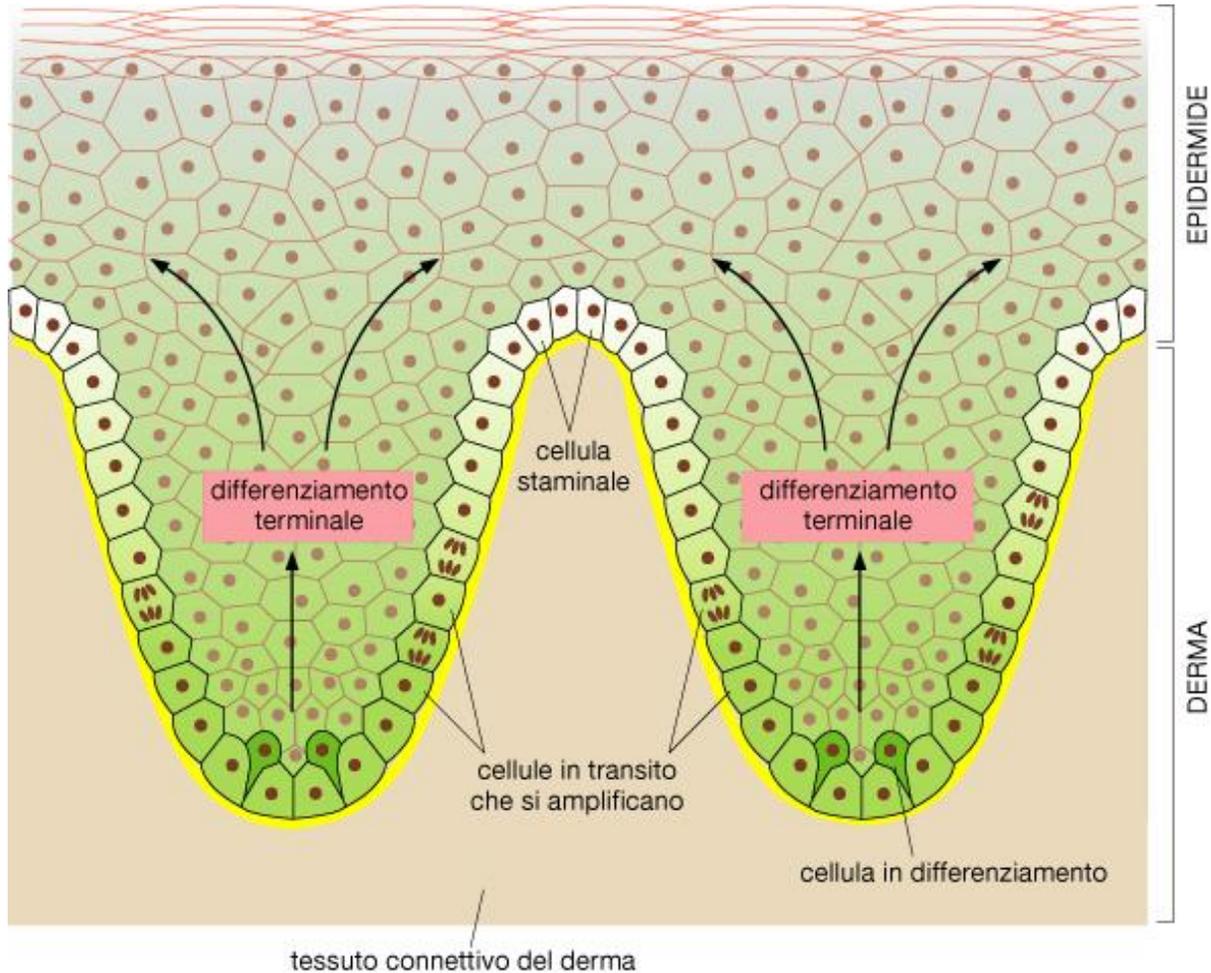
comporta una regolazione dell'espressione genica che si attua attraverso scelte successive (espressione selettiva di alcuni geni)



cellule acquisiscono caratteri di specificità diversi da tessuto a tessuto.

- porta alla formazione di popolazioni cellulari apparentemente non correlati tra loro (esempio: epiteli e tessuto nervoso) ma che possono avere un'origine comune

I tessuti sono strutture dinamiche



Il differenziamento cellulare è un processo graduale e avviene non solo nel corso dello sviluppo embrionale ma anche durante la vita adulta

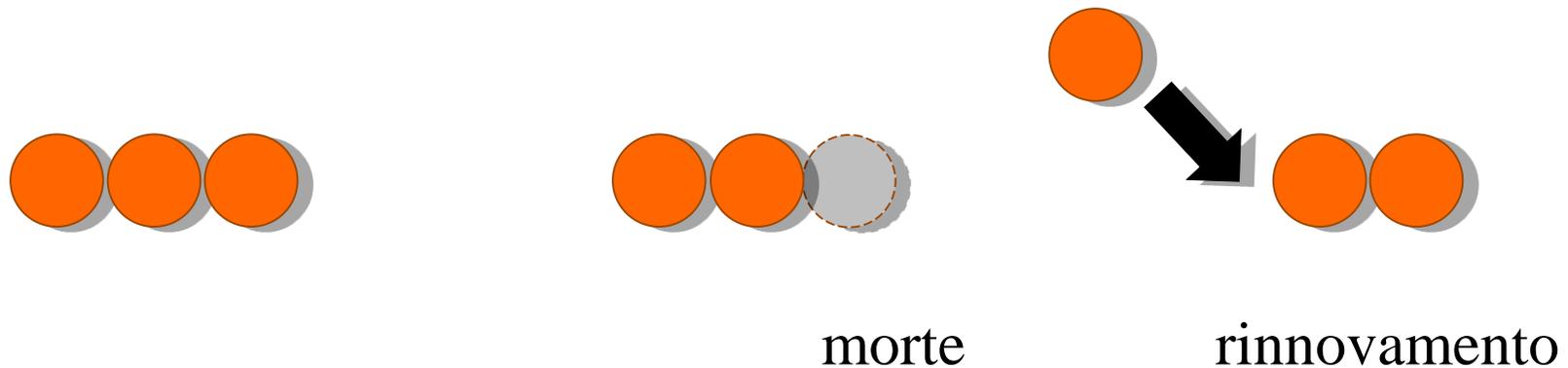
Il turnover cellulare avviene con velocità diverse a seconda del tipo di tessuto

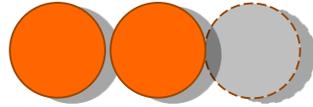
- **Popolazioni cellulari perenni** costituite da cellule differenziate che *non si dividono più* (neuroni del tessuto nervoso, epitelio uditivo, orecchio interno, cristallino)
- **Popolazioni cellulari stabili**, formate da cellule differenziate che possono dividersi in condizioni particolari per un *lento rinnovamento e la rigenerazione* (epatociti, cellule endoteliali, etc.)
- **Popolazioni cellulari labili**, costituite da cellule che *si rinnovano continuamente e più o meno rapidamente* (epiteli di rivestimento, cellule del sangue).

Oggi si ritiene che non esistano tessuti interamente perenni

*Nei tessuti (embrionali e adulti) esiste un **turnover cellulare**, un equilibrio tra produzione di nuove cellule e eliminazione di quelle danneggiate o invecchiate*

Omeostasi tissutale





Perchè vengono eliminate alcune cellule?

- Perdita di funzione
- Danno
- Eliminazione attiva (sviluppo embrionale, attivazione di nuove funzioni, meccanismi fisiologici, etc)

Come vengono eliminate le cellule?

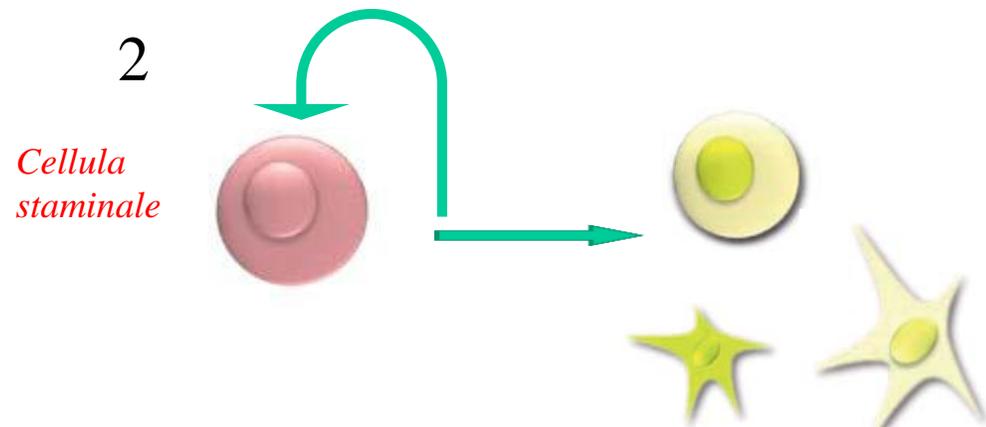
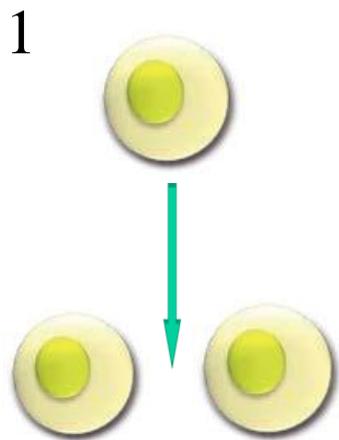
- Necrosi o morte accidentale
- Apoptosi o morte cellulare programmata



Il turnover cellulare avviene mediante:

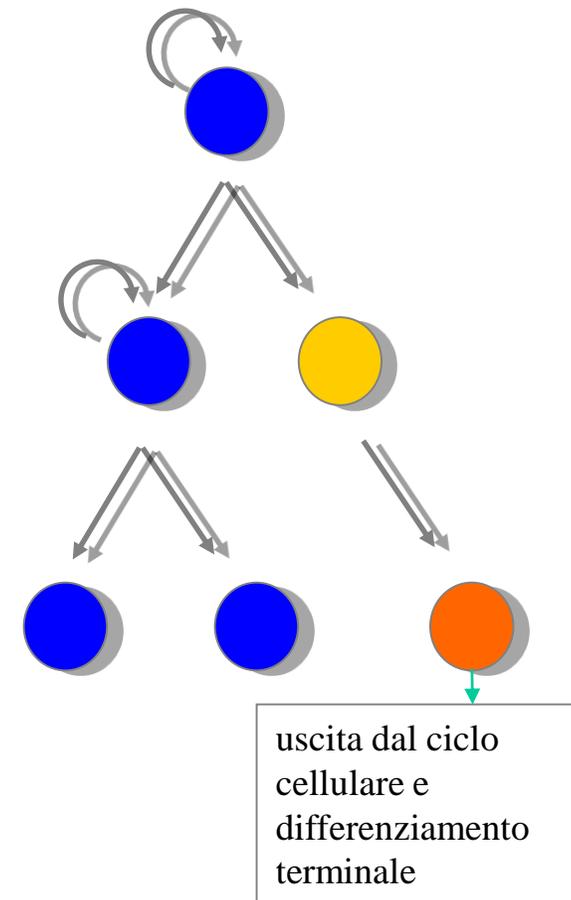
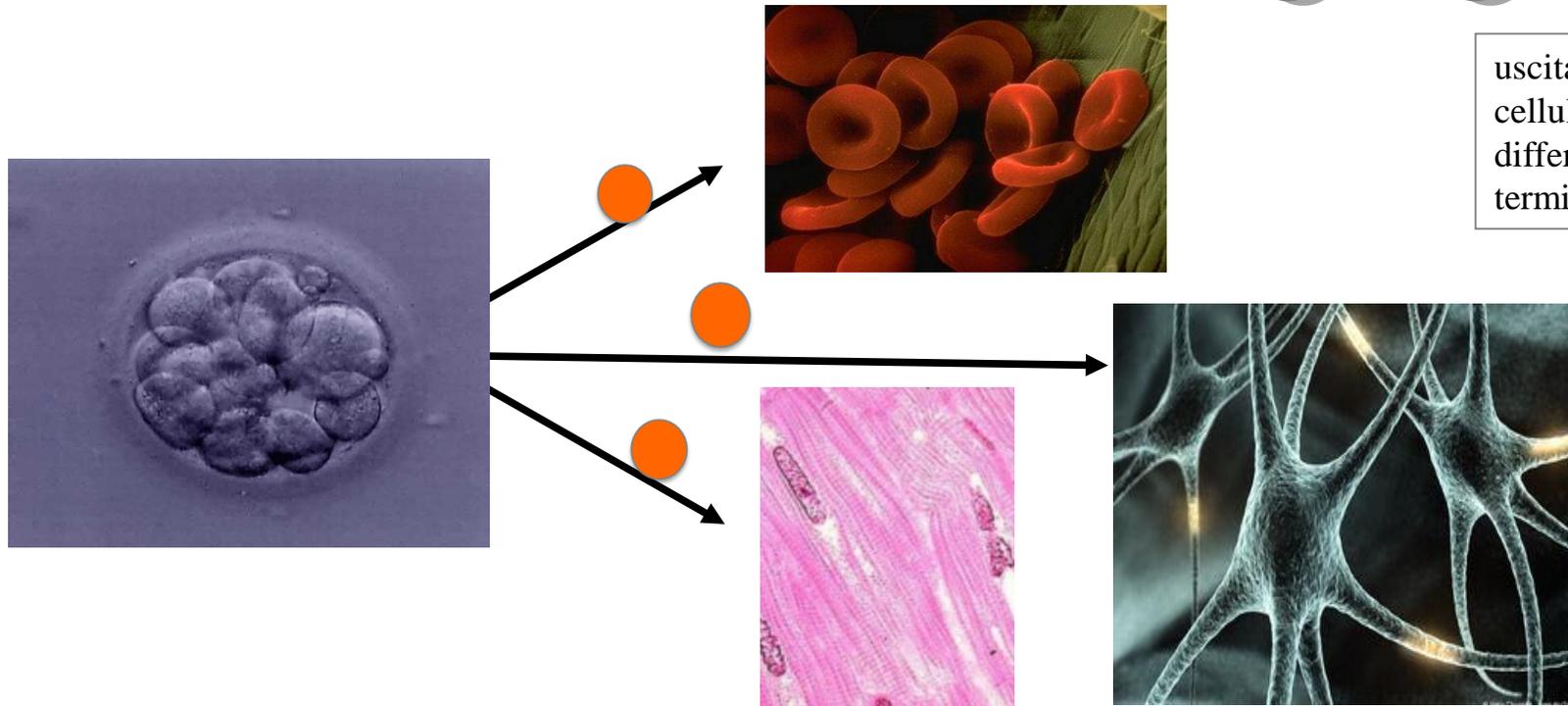
1) *Duplicazione semplice* di cellule del tessuto già differenziate (proliferazione) che possono riprendere a dividersi per il lento rinnovo dei tessuti quando alcune parti degenerano per eventi traumatici o patologici

2) *Cellule staminali* per tessuti che si rinnovano costantemente e per la rigenerazione

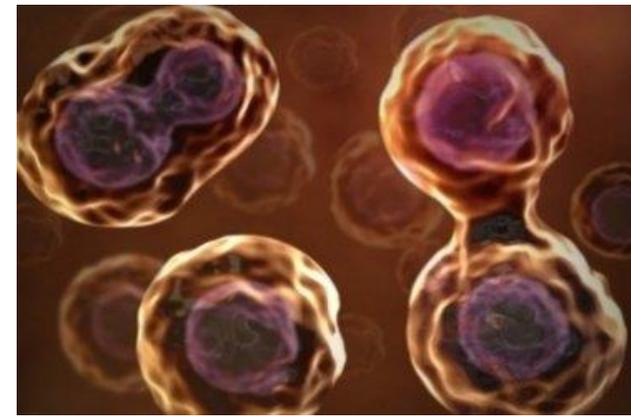


Cosa sono le cellule staminali?

Sono cellule **capaci di auto-rinnovarsi**
e di differenziarsi



Proprietà della cellula staminale



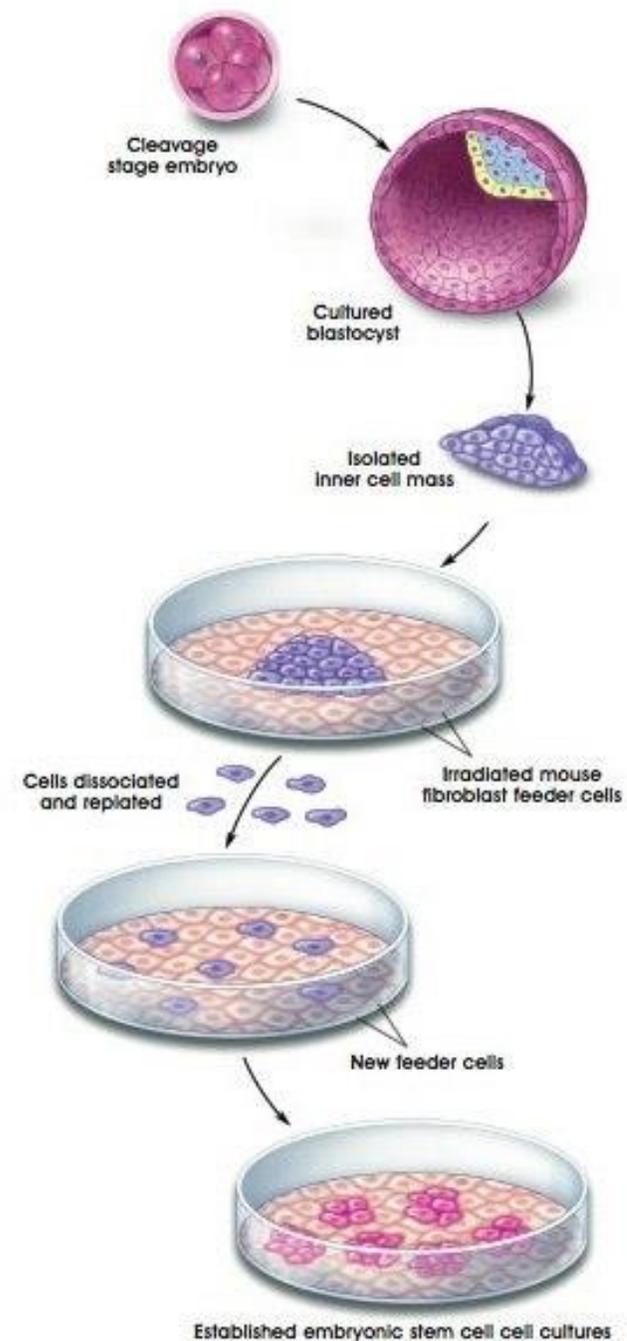
- cellula *non differenziata terminalmente* (in uno stato differenziativo più precoce delle altre cellule del tessuto)
- con *illimitata capacità di proliferare* (ma si dividono poco cioè hanno *bassa capacità di replicazione*)
- *in grado di dare origine ad altre cellule staminali* (autorinnovamento) *o a cellule differenziate* (differenziamento terminale)

Le cellule staminali si classificano secondo la provenienza

Popolazione staminale	Origine
Cellule embrionali (Embryonic Stem, (ES)	Massa Cellulare Interna della blastocisti
Cellule staminali fetali	Feti dall'ottava settimana in poi (aborto spontaneo o terapeutico)
Cellule staminali emopoietiche fetali	Cordone Ombelicale alla nascita
Cellule staminali adulte	

Le cellule staminali si classificano secondo la provenienza in:

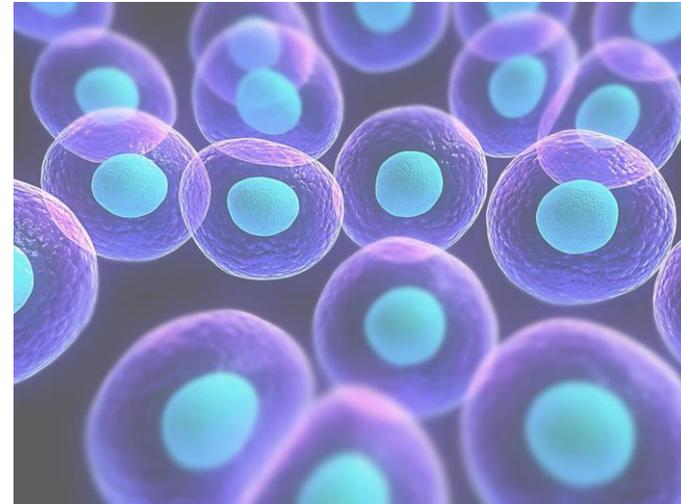
1. Cellule staminali embrionali (ES), presenti nella massa cellulare interna della blastocisti.



2. *Cellule staminali fetali*, ottenute da feti dall'ottava settimana dopo la fecondazione (abortiti spontaneamente o da interruzioni di gravidanza).

Posseggono caratteristiche intermedie tra le cellule staminali embrionali e quelle adulte.

È in fase di studio un loro impiego clinico



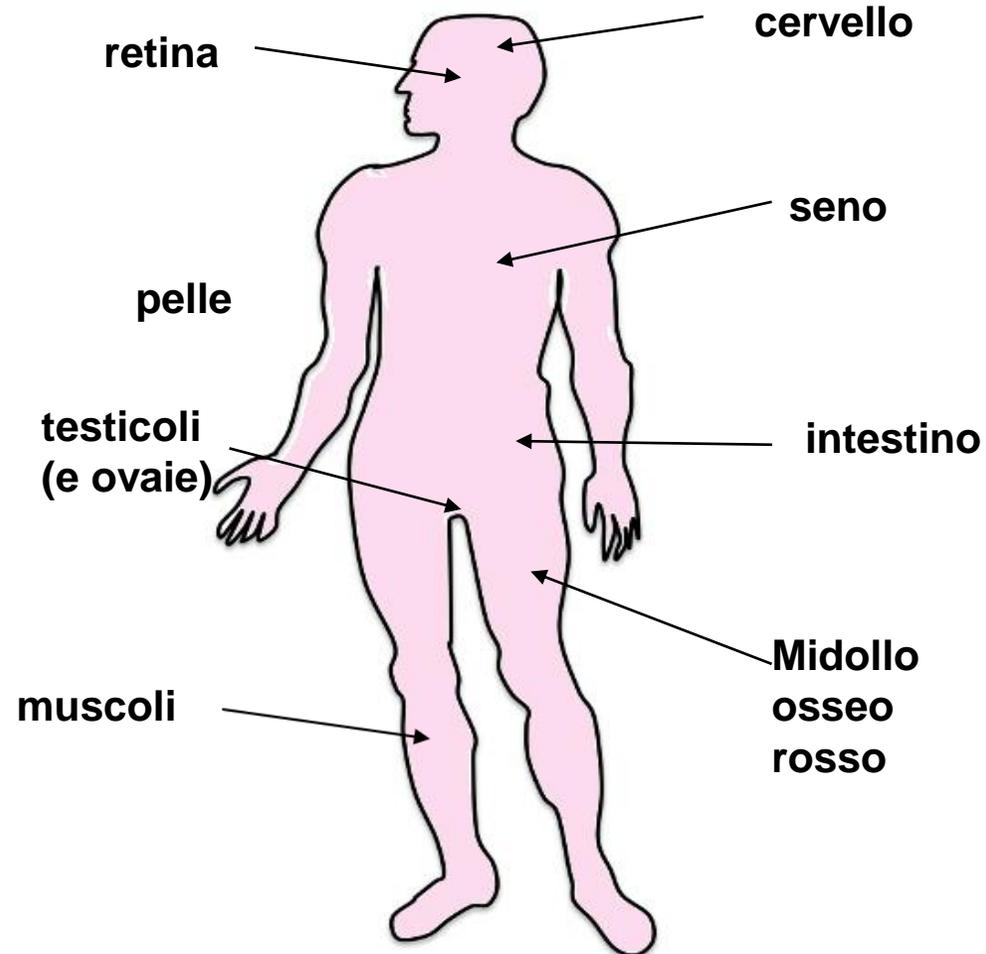
3. Cellule staminali da sangue del cordone ombelicale (emopoietiche fetali): sono considerate staminali adulte

Il sangue del cordone ombelicale può quindi rappresentare una fonte di cellule staminali per curare alcune gravi malattie ematologiche.

Possono essere mantenute in banche anche per decenni



4. Cellule staminali adulte (o somatiche): si trovano in tutti i tessuti dei mammiferi (anche cordoni ombelicali e tessuti dei bambini) e sono tessuto-specifiche.



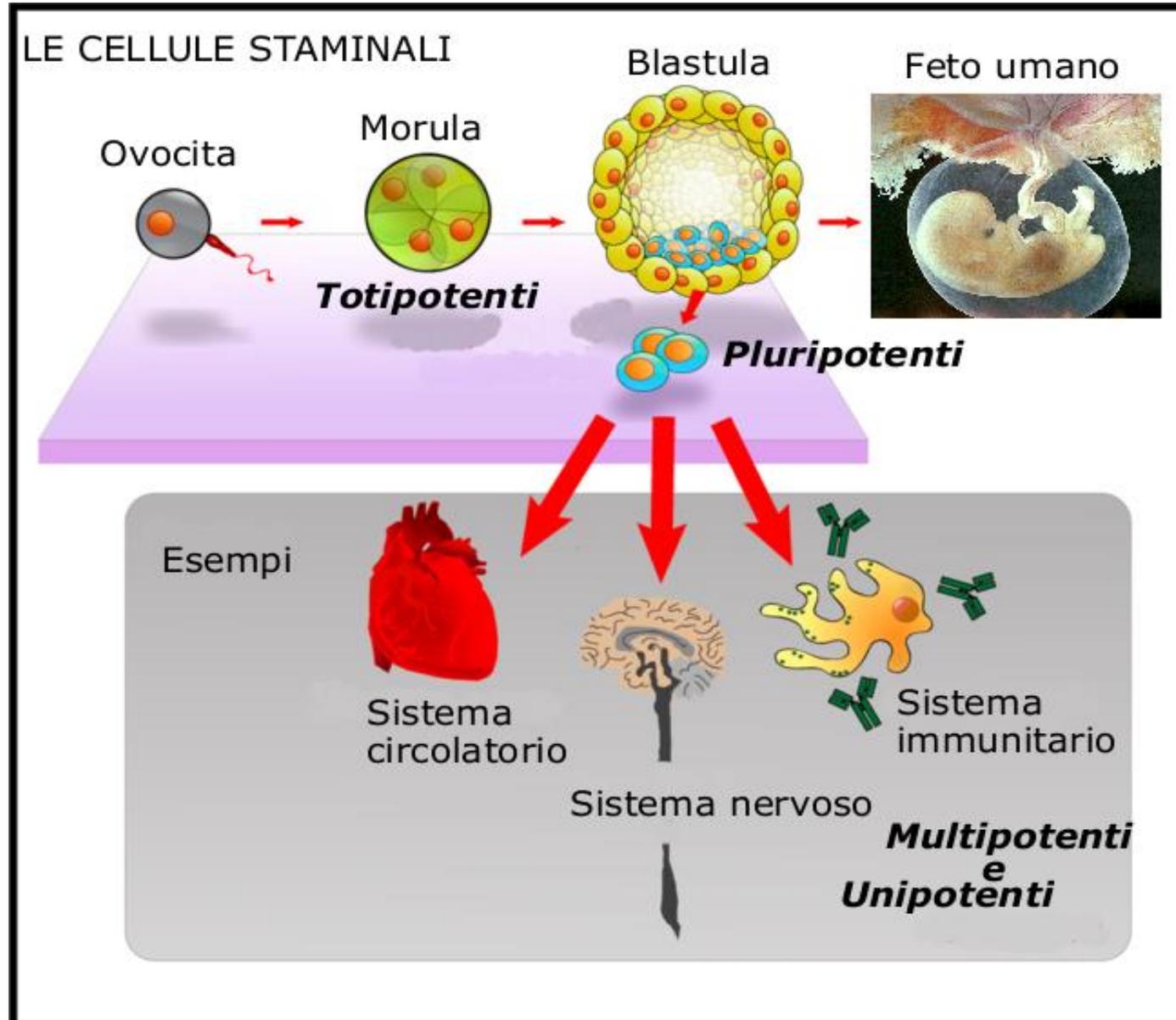
Le cellule staminali dell'adulto servono per:

- rinnovamento tissutale (omeostasi)
- rigenerazione in seguito a danno

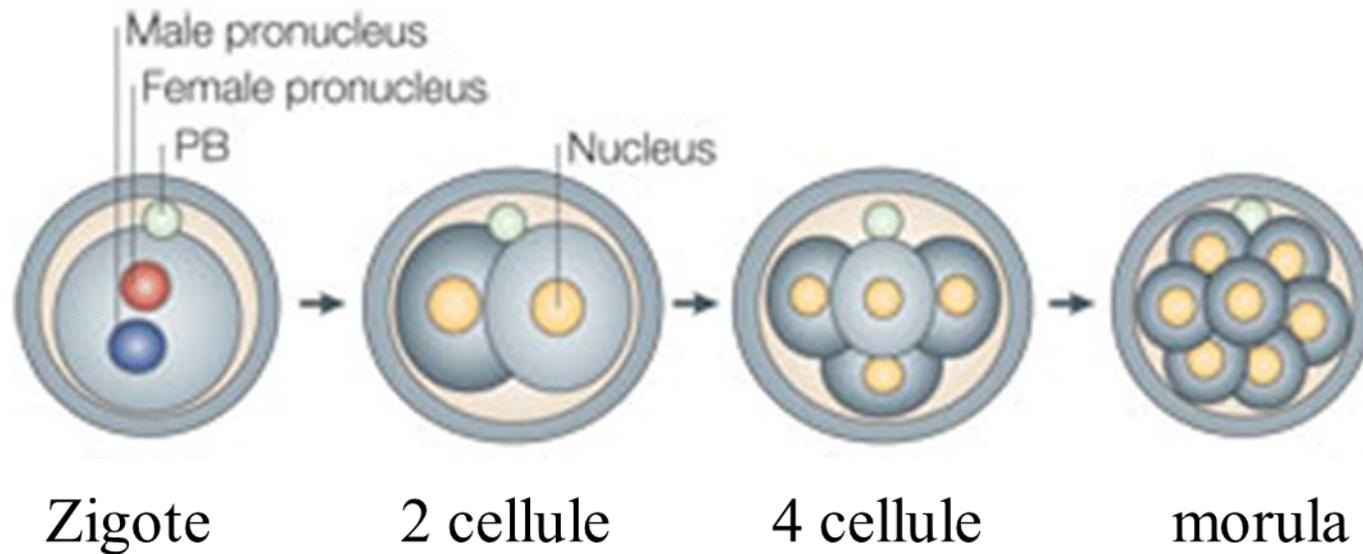
Non sempre le due funzioni sono svolte dallo stesso tipo di cellula staminale

Il differenziamento non è quindi un processo esclusivamente embrionale

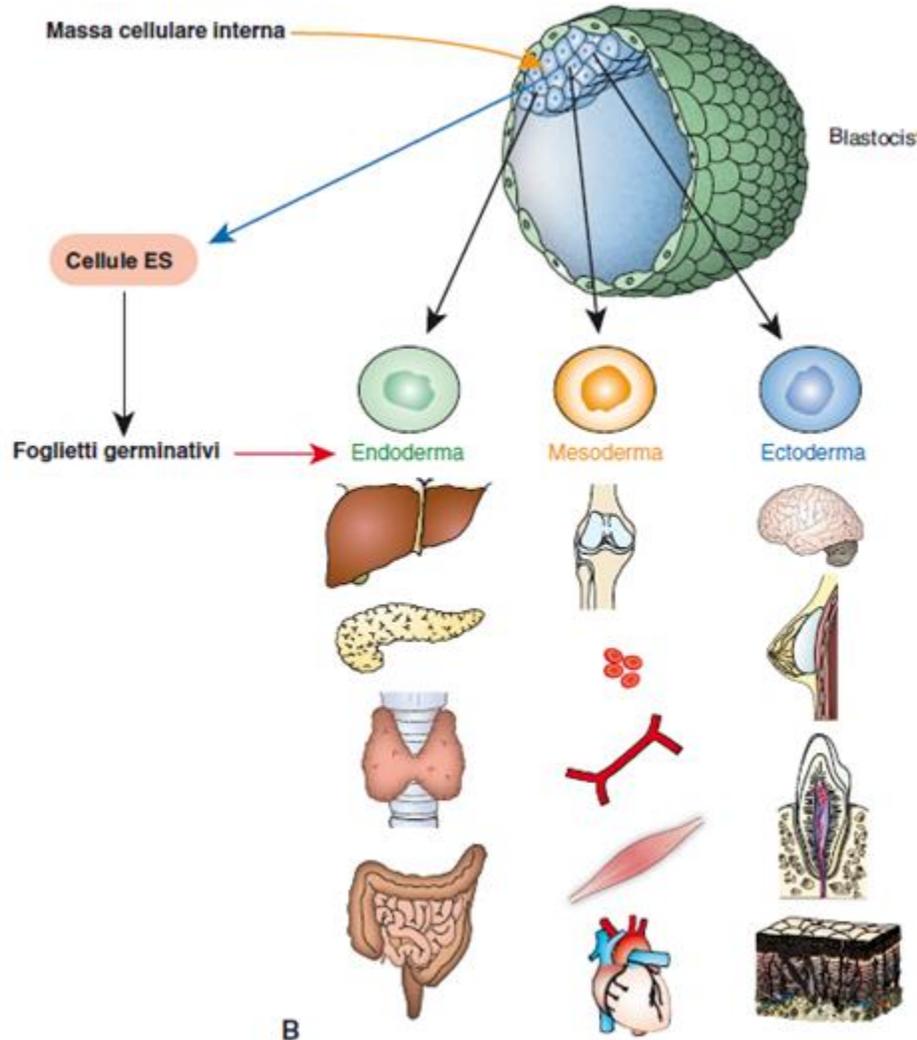
II POTENZIALE DIFFERENZIATIVO delle cellule staminali



Totipotenti: cellule a stadi embrionali molto precoci (zigote, primi blastomeri, morula) capaci di dare origine a tutti i tipi cellulari di un organismo, anche ai tessuti extra-embryonali (placenta).

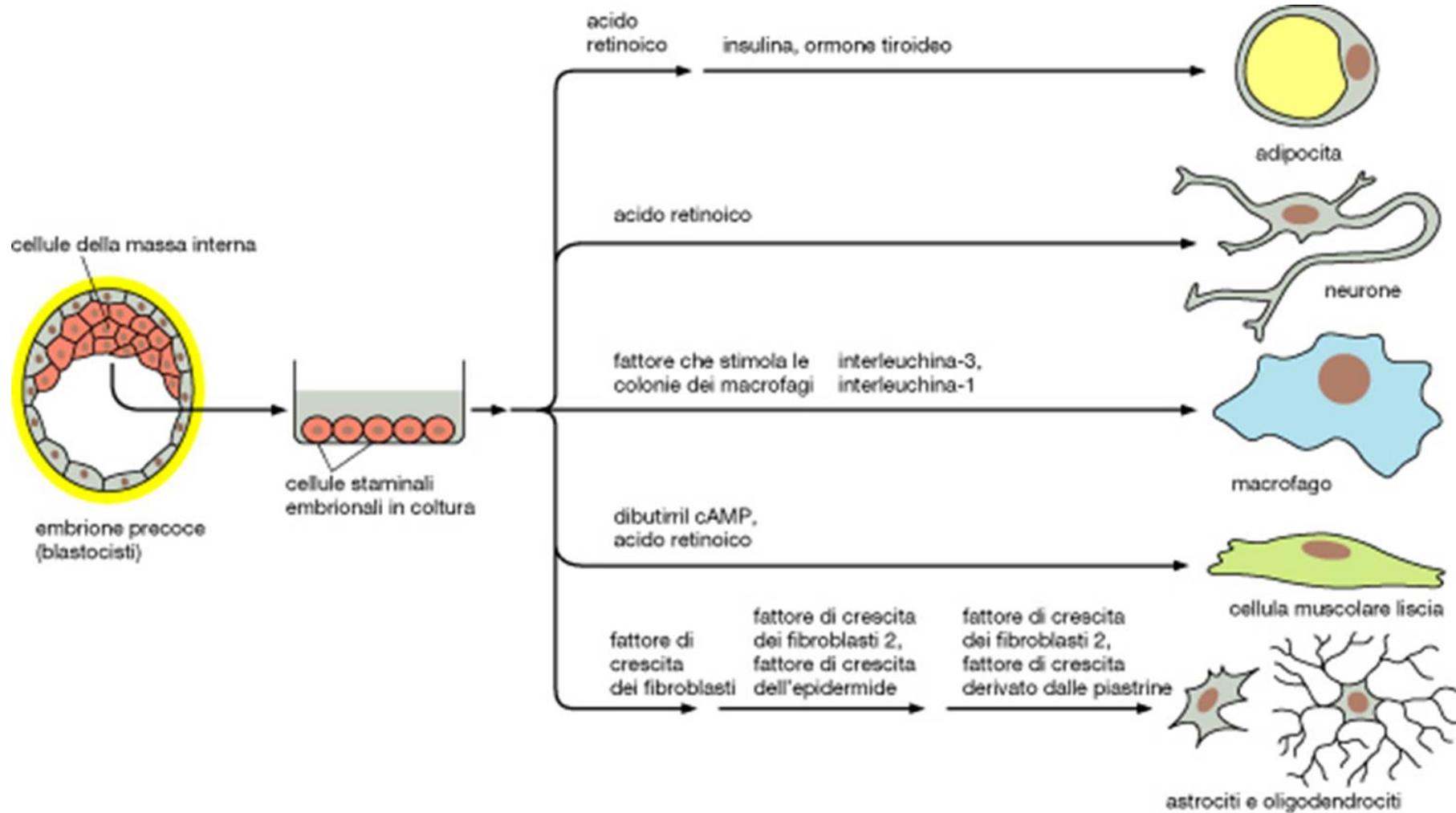


Pluripotenti: cellule embrionali della massa cellulare interna; possono dare origine a tutte le cellule (somatiche e germinali) di un organismo



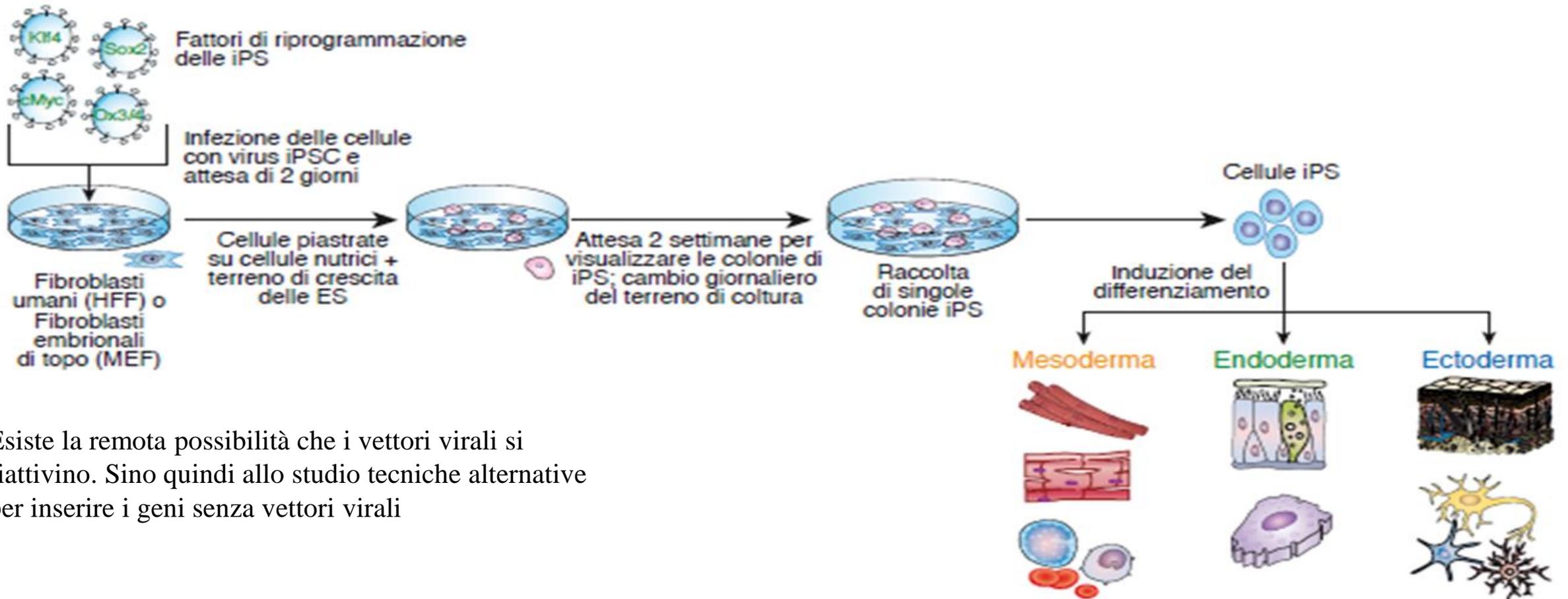
Lo stato funzionale di una cellula staminale è influenzato dall'ambiente circostante

Le cellule staminali pluripotenti in laboratorio



Cellule staminali pluripotenti indotte (iPS)

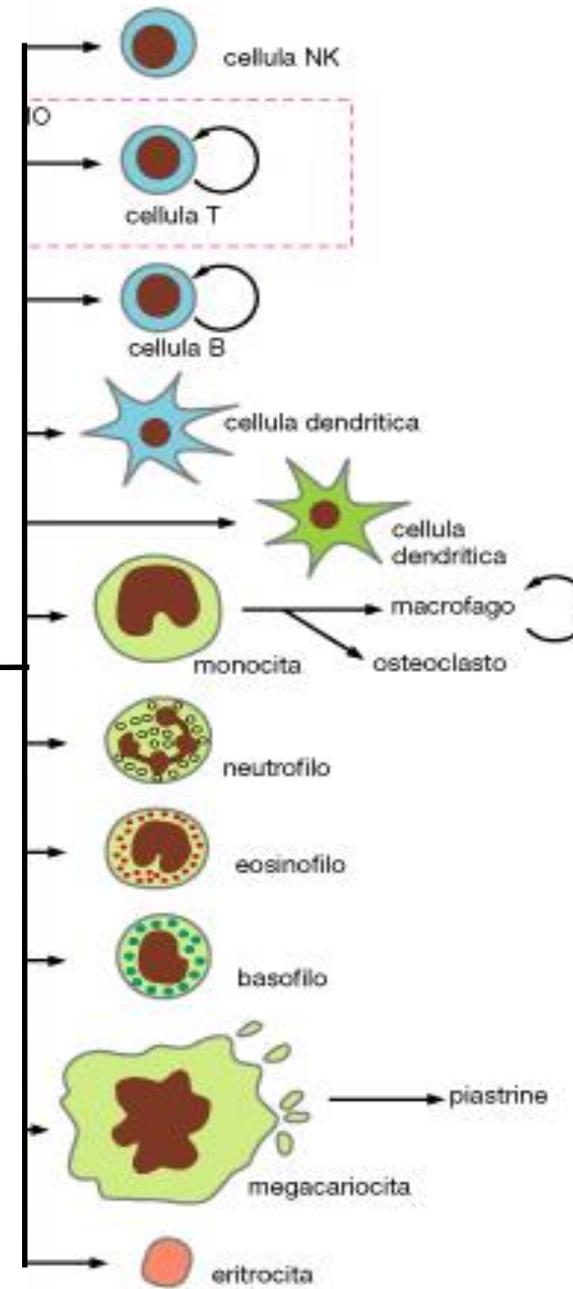
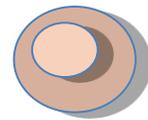
Ottenute dal de-differenziamento di cellule adulte fino ad uno stato staminale e quindi pluripotente (riprogrammazione genetica), molto simile a quello delle ES. Potenzialità enormi, ma esistono ancora dei problemi da risolvere



Esiste la remota possibilità che i vettori virali si riattivino. Sino quindi allo studio tecniche alternative per inserire i geni senza vettori virali

Multipotenti: si possono differenziare in molti tipi di cellule diverse

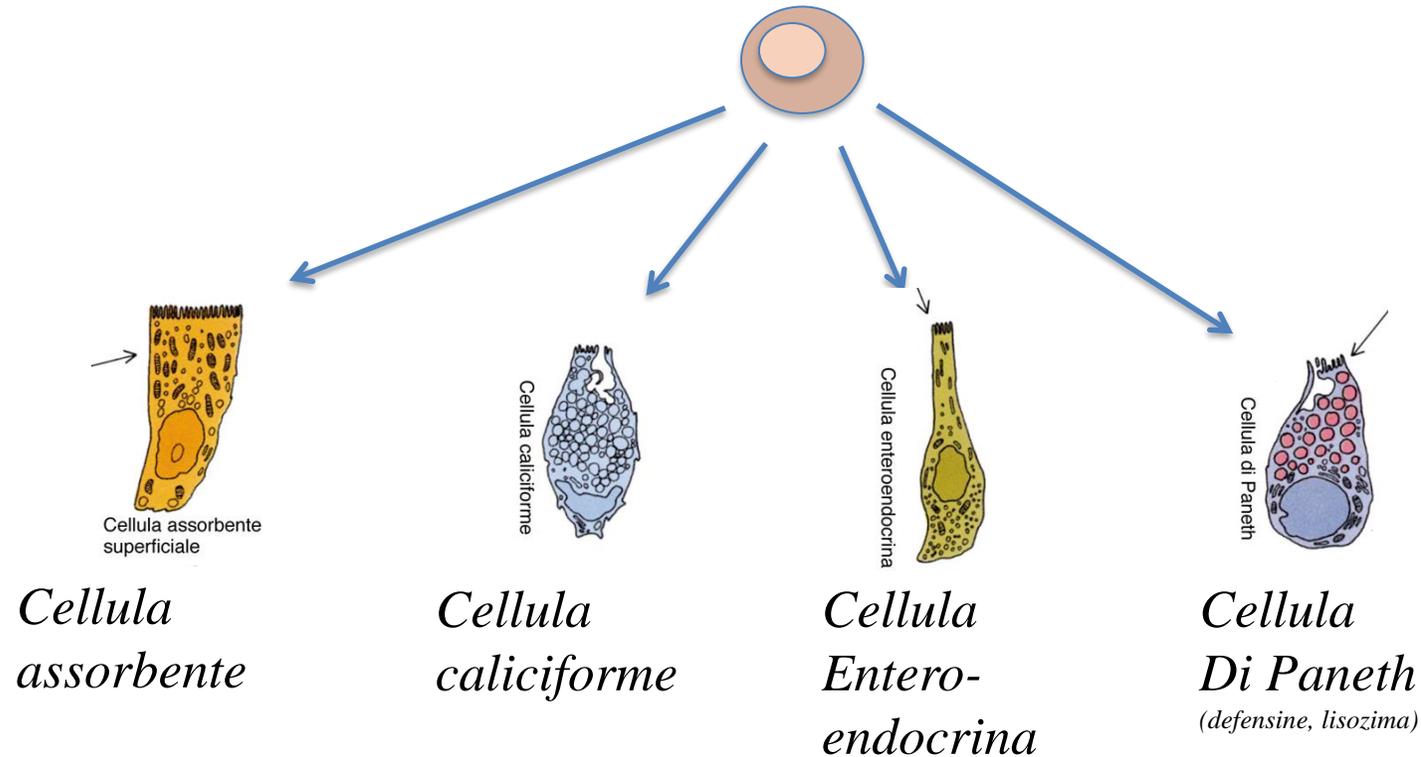
Es: Cellula Staminalle Emopoietica



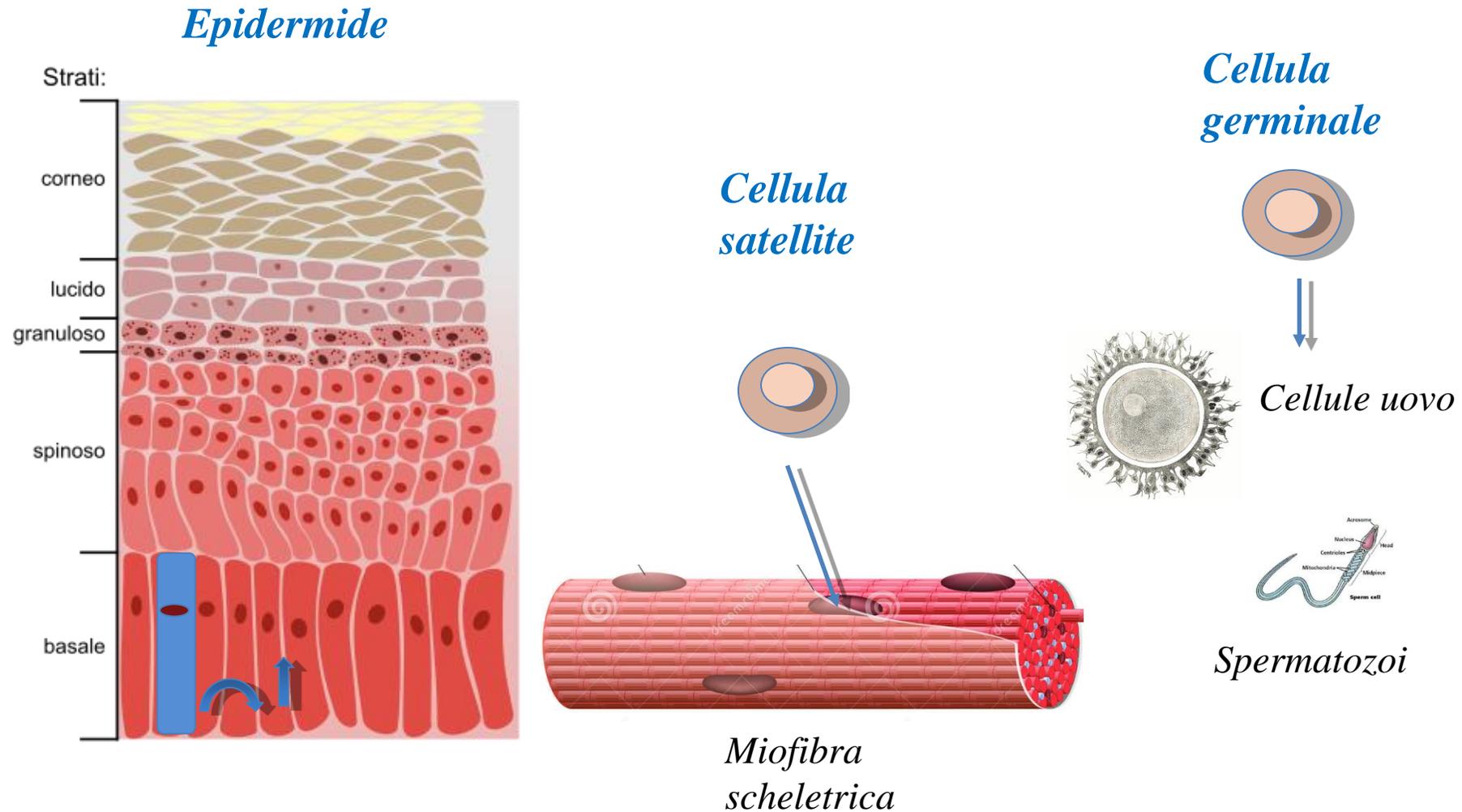
CELLULE DIFFERENZIATE

Oligopotenti: cellule indifferenziate dei tessuti, predestinate a produrre più cellule con funzioni specifiche

Cellula staminale intestinale



Unipotenti: cellule indifferenziate, predestinate a produrre una cellula con funzioni specifiche (cellule staminali dell'epidermide, del muscolo scheletrico, della retina, etc.)

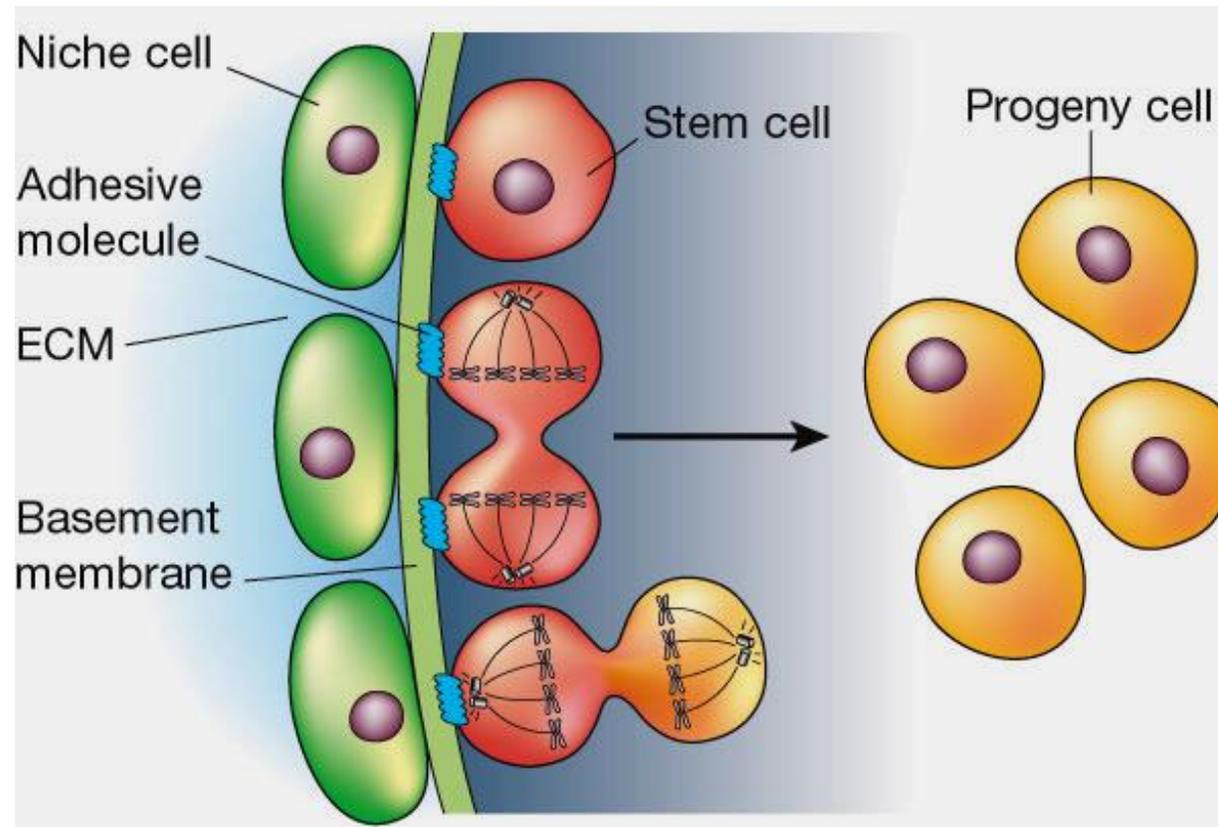


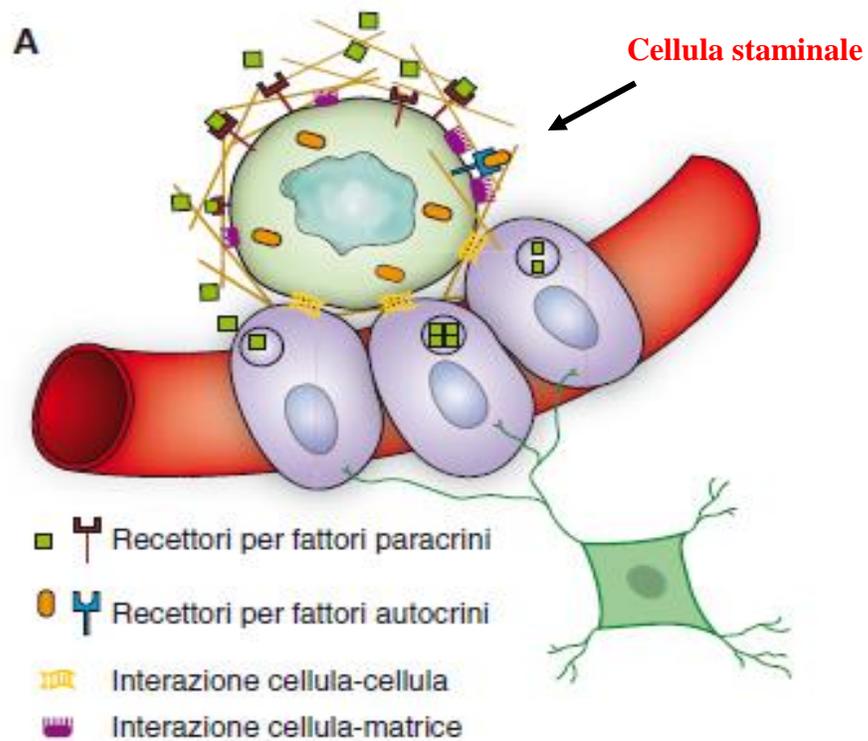
La staminalità non è uno stato “assoluto”, ma viene mantenuto dal microambiente della cellula, ovvero dalla **nicchia staminale**

Ogni cellula staminale adulta:

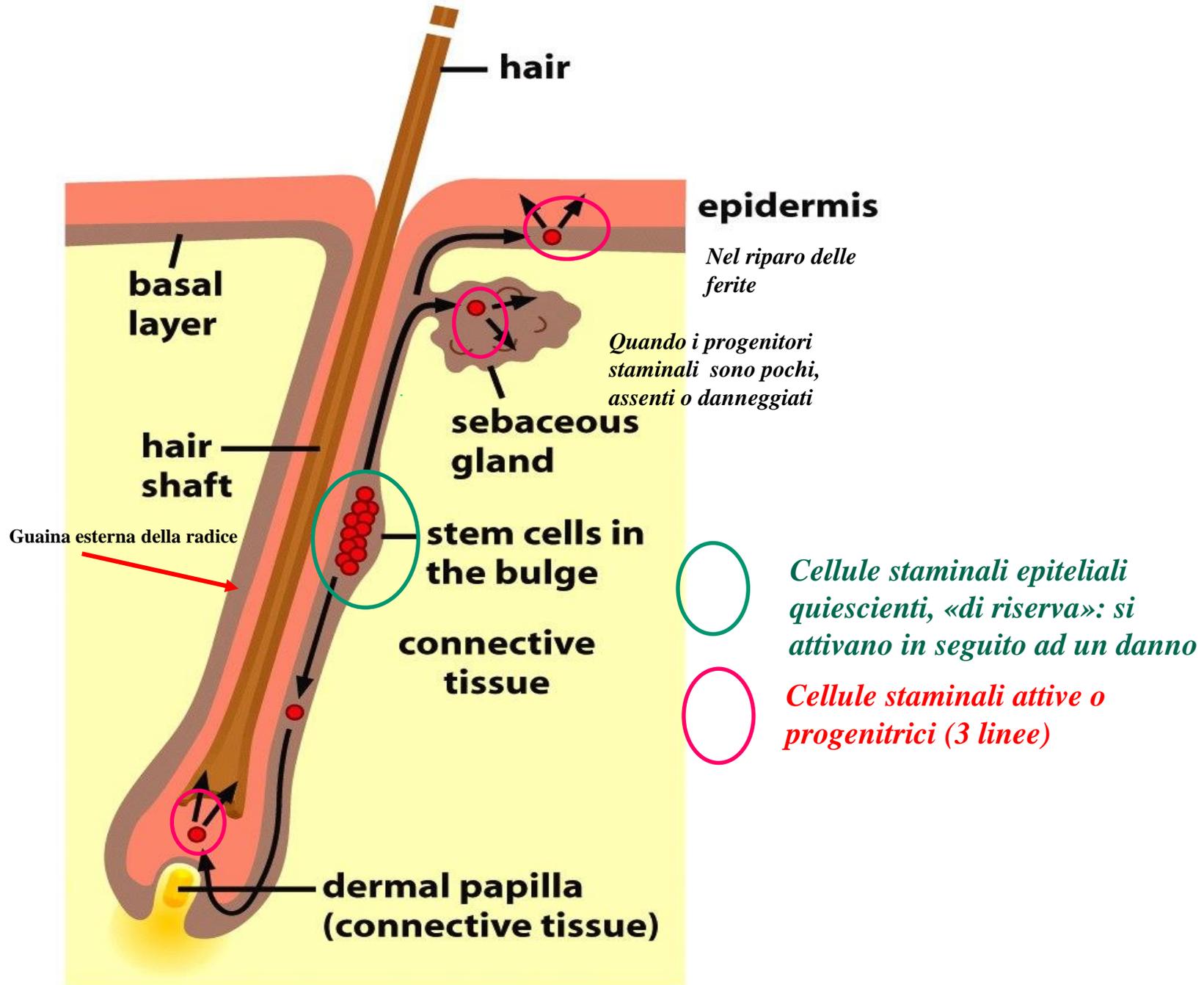
- *occupa una nicchia staminale, il microambiente delle cellule*
- *si divide poco, per limitare la probabilità di mutazioni nel corso della replicazione del DNA*

L'allontanamento dalla nicchia è un primo passo verso il differenziamento.





Cellule staminali	Localizzazione della nicchia
Cellule staminali emopoietiche	Endostale (osteoblasti) e perivascolare (cellule endoteliali dei seni venosi)
Cellule satelliti del muscolo	Sotto la membrana basale delle miofibre scheletriche
Cellule staminali del sistema nervoso centrale	Zona subventricolare e ippocampo
Cellule staminali dell'epitelio intestinale	Base delle cripte intestinali
Cellule staminali del follicolo pilifero	<i>Bulge</i> (rigonfiamento) del follicolo pilifero
Cellule staminali dell'epidermide	Strato basale interfollicolare
Spermatogoni	Membrana basale del tubulo seminifero, cellule di Sertoli



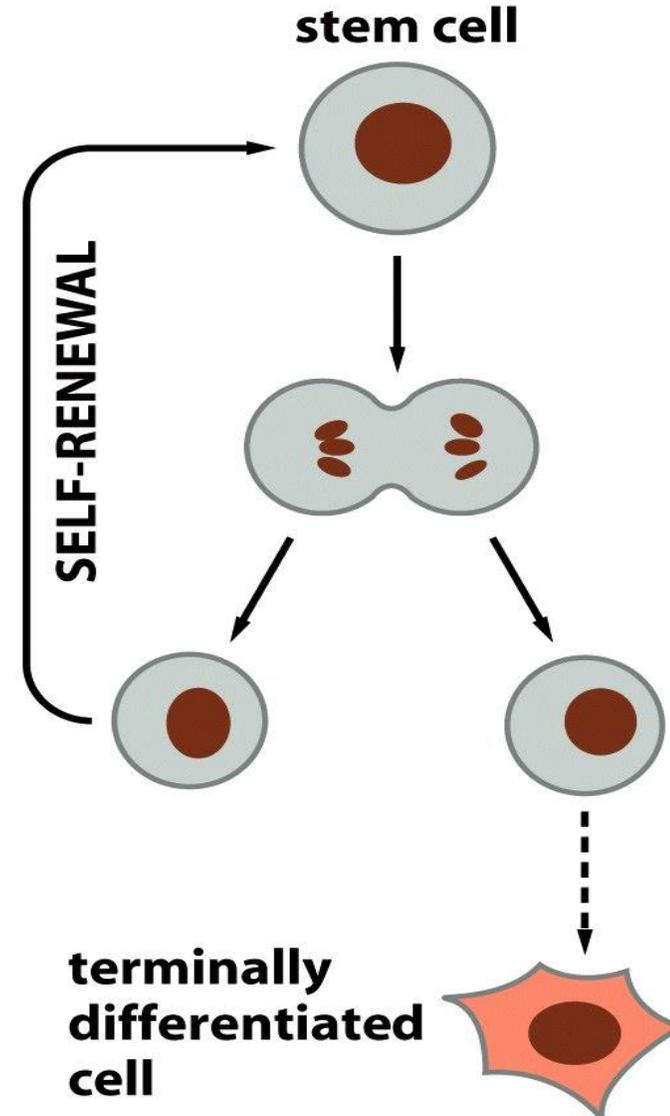
Divisione simmetrica (proliferativa) e divisione asimmetrica (differenziativa)

Da una cellula staminale possono originare:

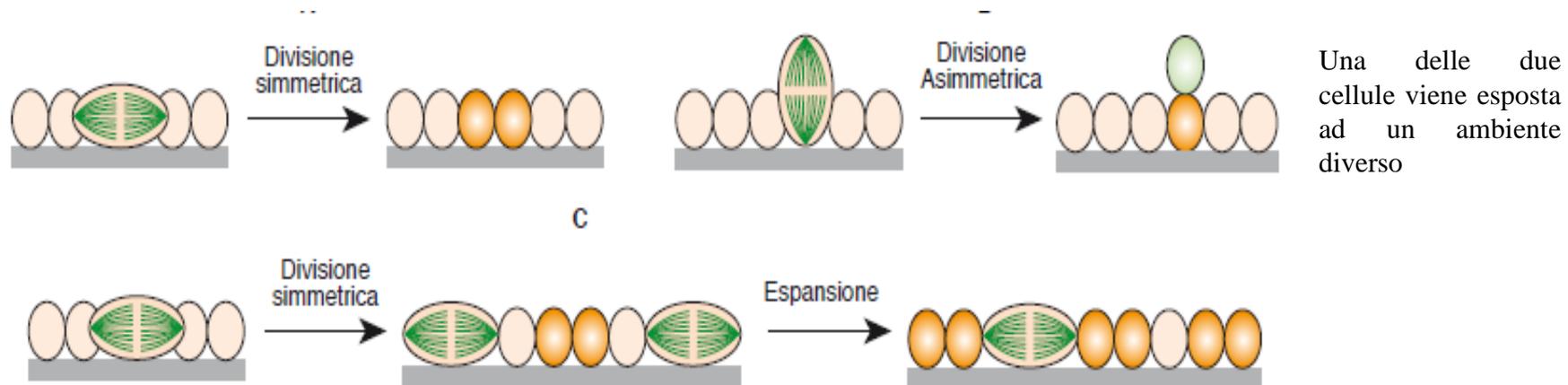
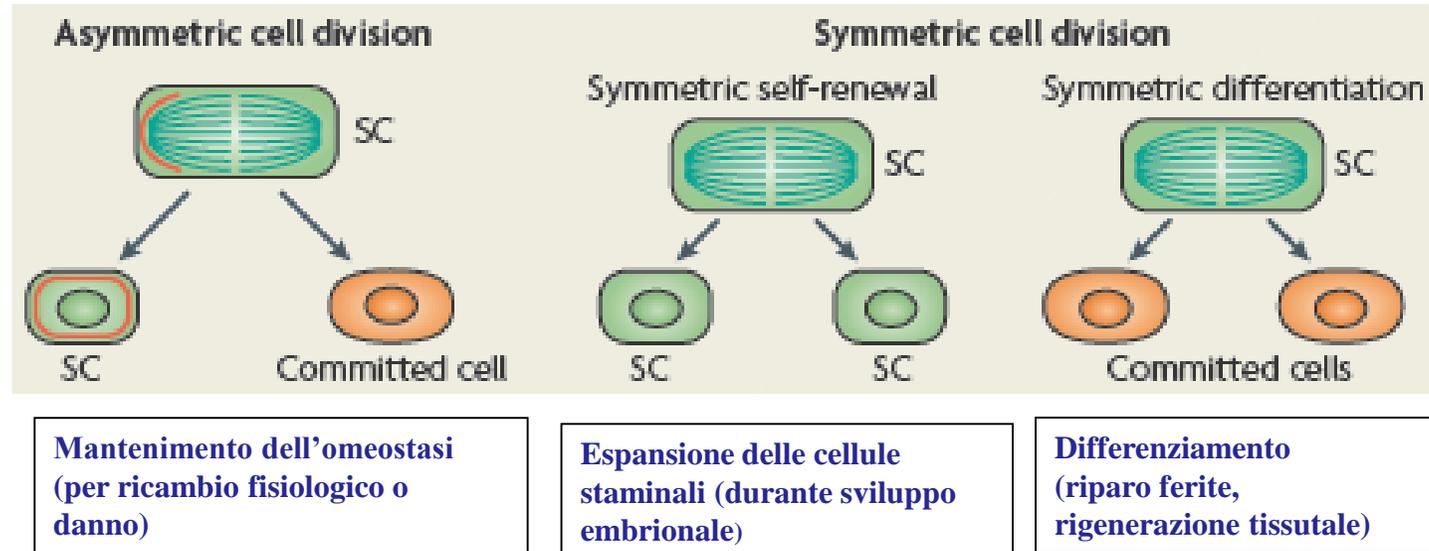
- 1) una cellula staminale e una cellula differenziata (**divisione asimmetrica**) maggior parte delle cellule staminali adulte
- 1) due cellule identiche tra di loro, staminali o differenziate (**divisione simmetrica**)

Meccanismi diversi

Equilibrio tra il numero di cellule staminali che si auto-rinnovano e quello delle cellule che si differenziano



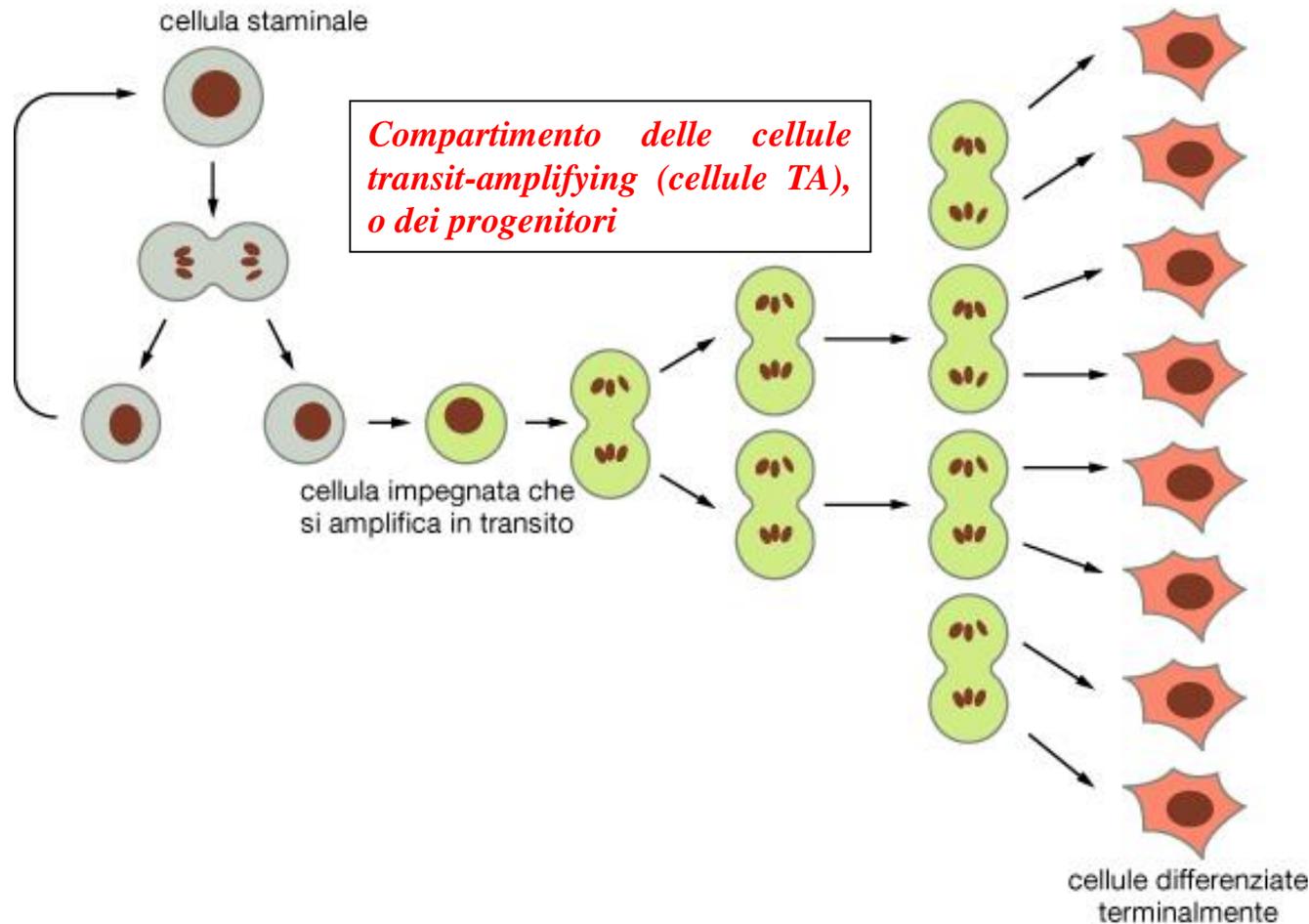
I compartimenti staminali possono utilizzare sia divisioni simmetriche che divisioni asimmetriche, a seconda delle necessità



**Come può esserci un alto
ricambio cellulare se le cellule
staminali proliferano poco?**

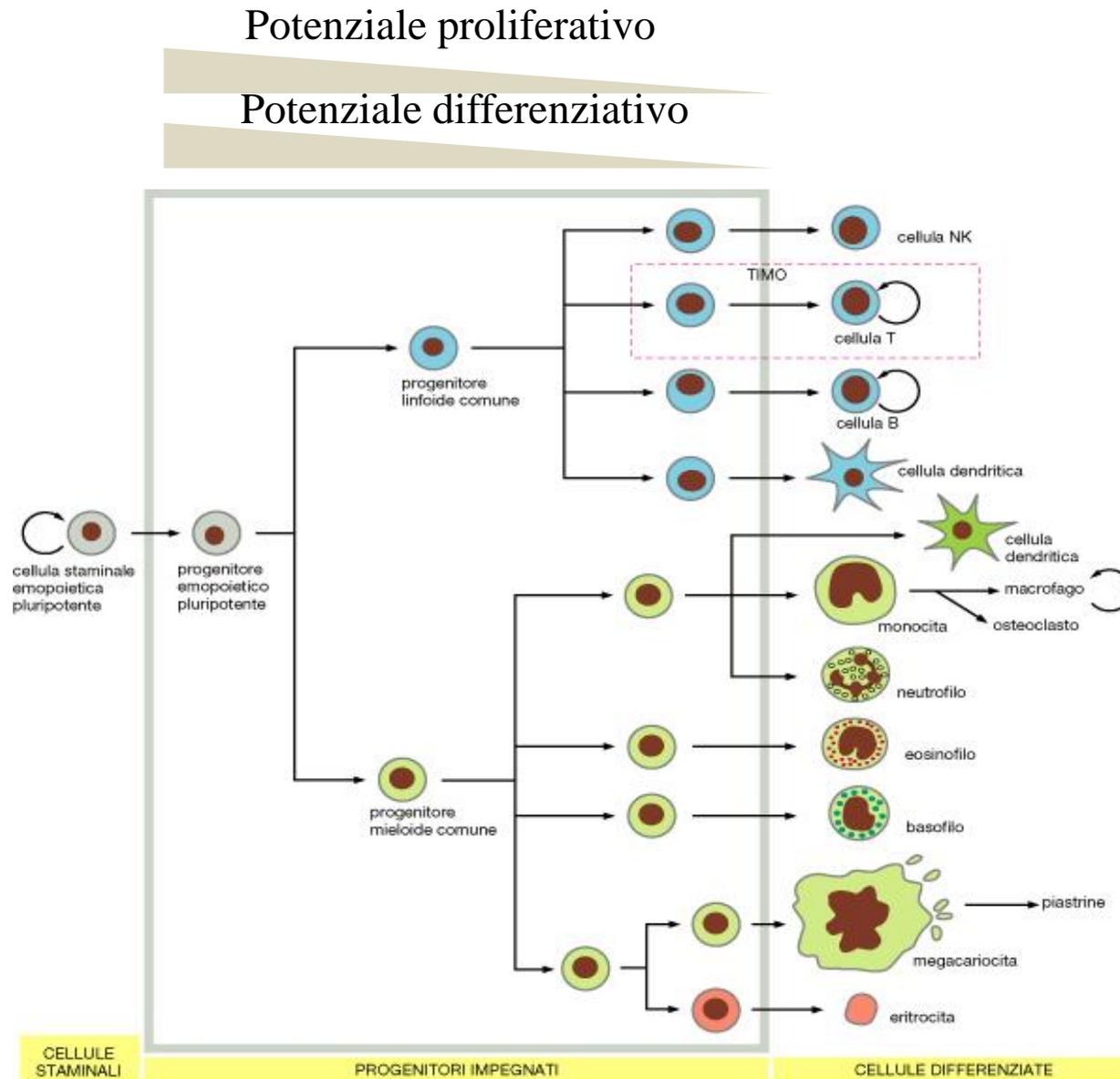
Il differenziamento è un processo graduale

In alcuni tessuti con alto tasso di rinnovamento esistono delle cellule intermedie tra le staminali e le differenziate



Le **cellule differenziate terminalmente** hanno perduto la capacità di proliferare

Il sistema emopoietico: una gerarchia di cellule staminali

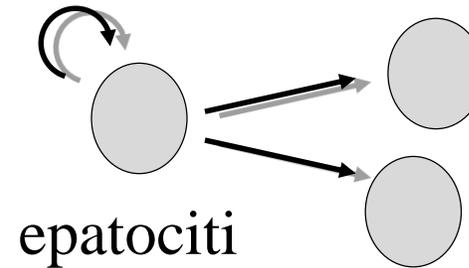


I progenitori possiedono un *commitment*, cioè un programma che li induce a differenziarsi in un determinato tipo cellulare

I progenitori hanno una capacità rigenerativa inferiore a quella delle cellule staminali di partenza

In alcuni tessuti esistono delle cellule proliferanti che NON sono cellule staminali:

1) Proliferazione di cellule differenziate



2) Cellule in amplificazione transiente

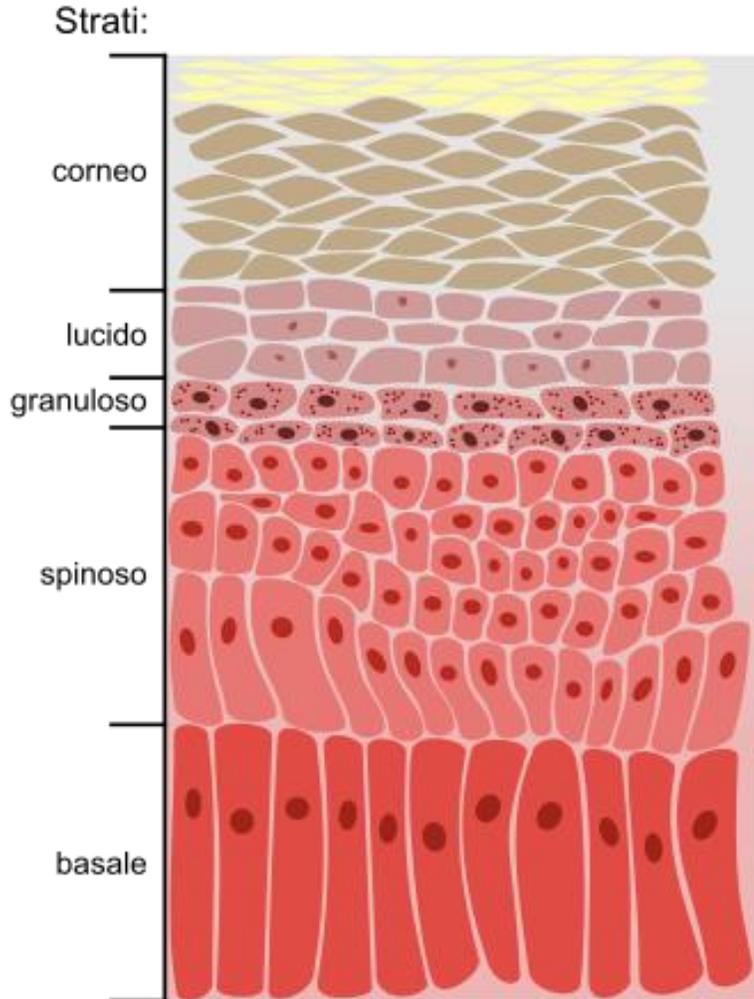
3) Cellule staminali/progenitori

Il rinnovamento dei tessuti e la loro rigenerazione dipendono soprattutto dalle cellule staminali adulte presenti nei tessuti.

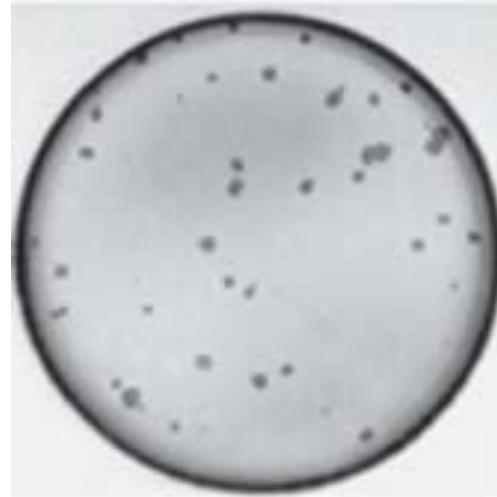
La **Medicina Rigenerativa** si occupa della **ricostruzione di tessuti danneggiati** mediante la coltura e/o il differenziamento delle cellule e la loro successiva applicazione *in vivo* (terapia cellulare) o mediante la modificazione genica delle cellule in coltura e il successivo trapianto *in vivo* (terapia genica)

Trapianto autologo di epidermide rigenerata in vitro

Epidermide



Keratinocyte culture



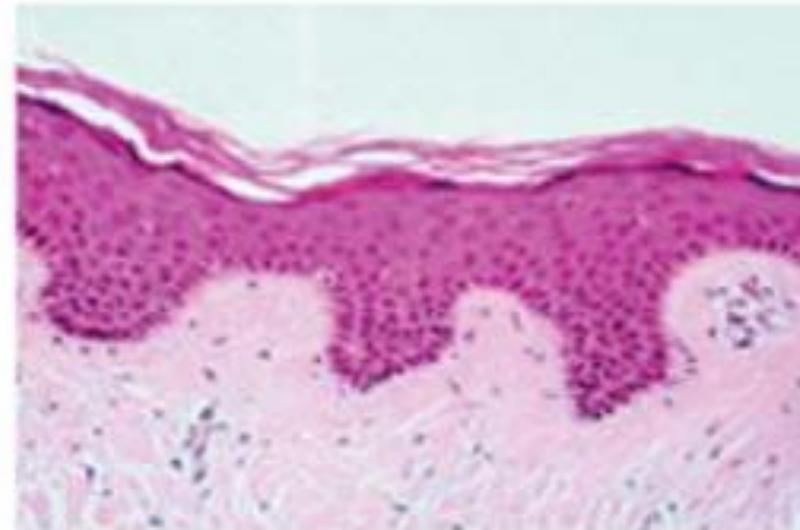
Epidermal sheet



Grafted sheet

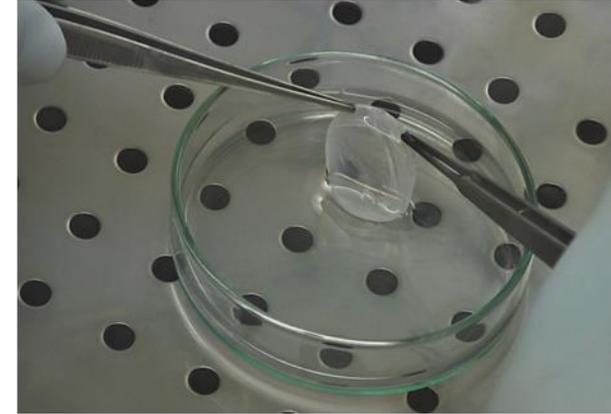


Histology of the graft



Trapianto autologo di cellule staminali limbari coltivate *in vitro*

Sono utilizzate per la rigenerazione della cornea e il recupero della capacità visiva in pazienti affetti da *patologie che compromettono il compartimento delle cellule staminali (limbus, tra cornea e congiuntiva)*, quali ustioni di vario tipo della cornea, alcune malattie immunitarie e infiammatorie (gravi cheratiti infettive, pemfigoide cicatriziale, etc)



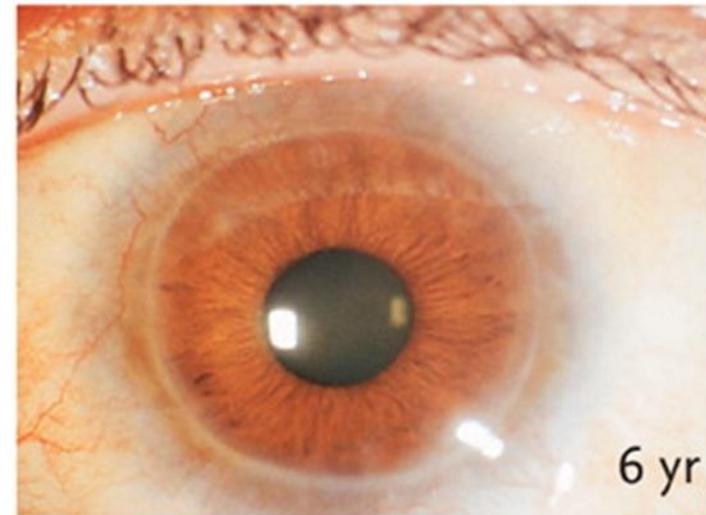
Lembo di cellule limbari coltivate

Before Treatment



**Patient
22**

After Treatment



6 yr

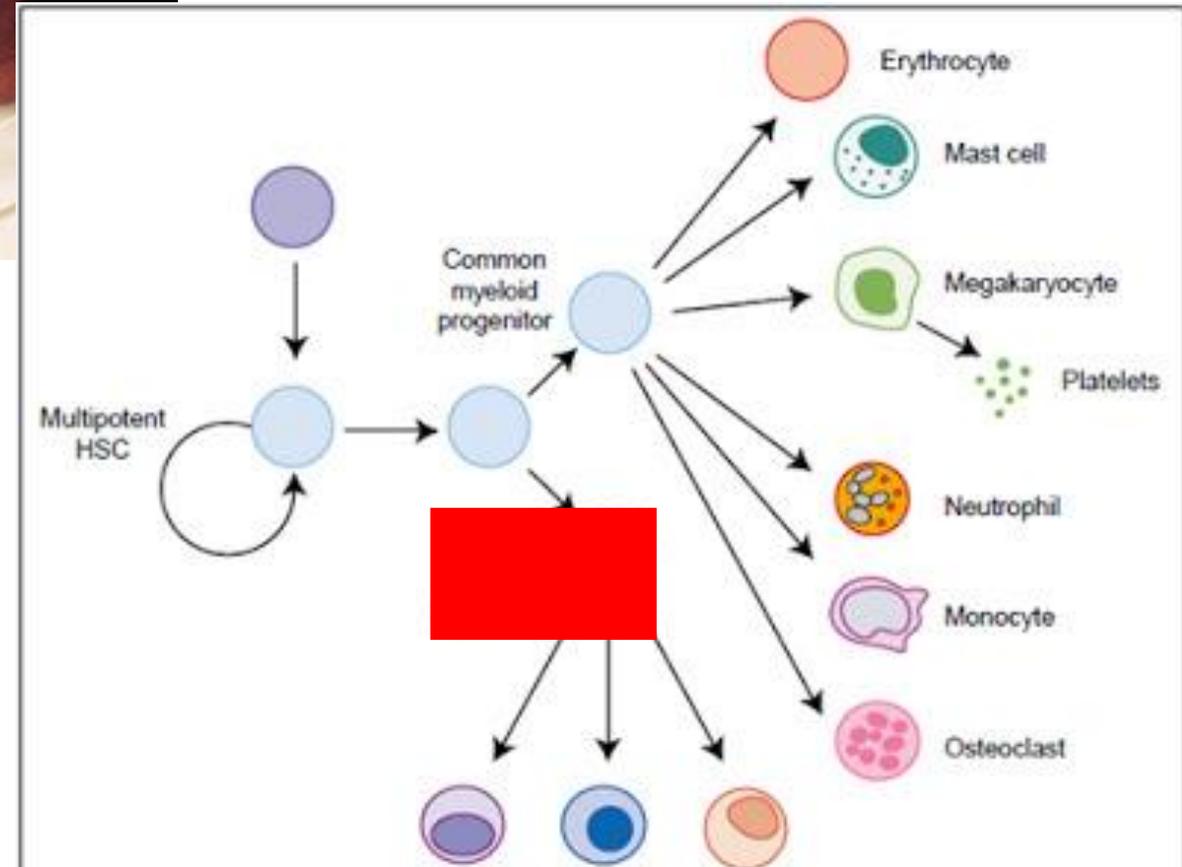


terapia genica

Terapia genica per curare l'immunodeficienza congenita (ADA-SCID)

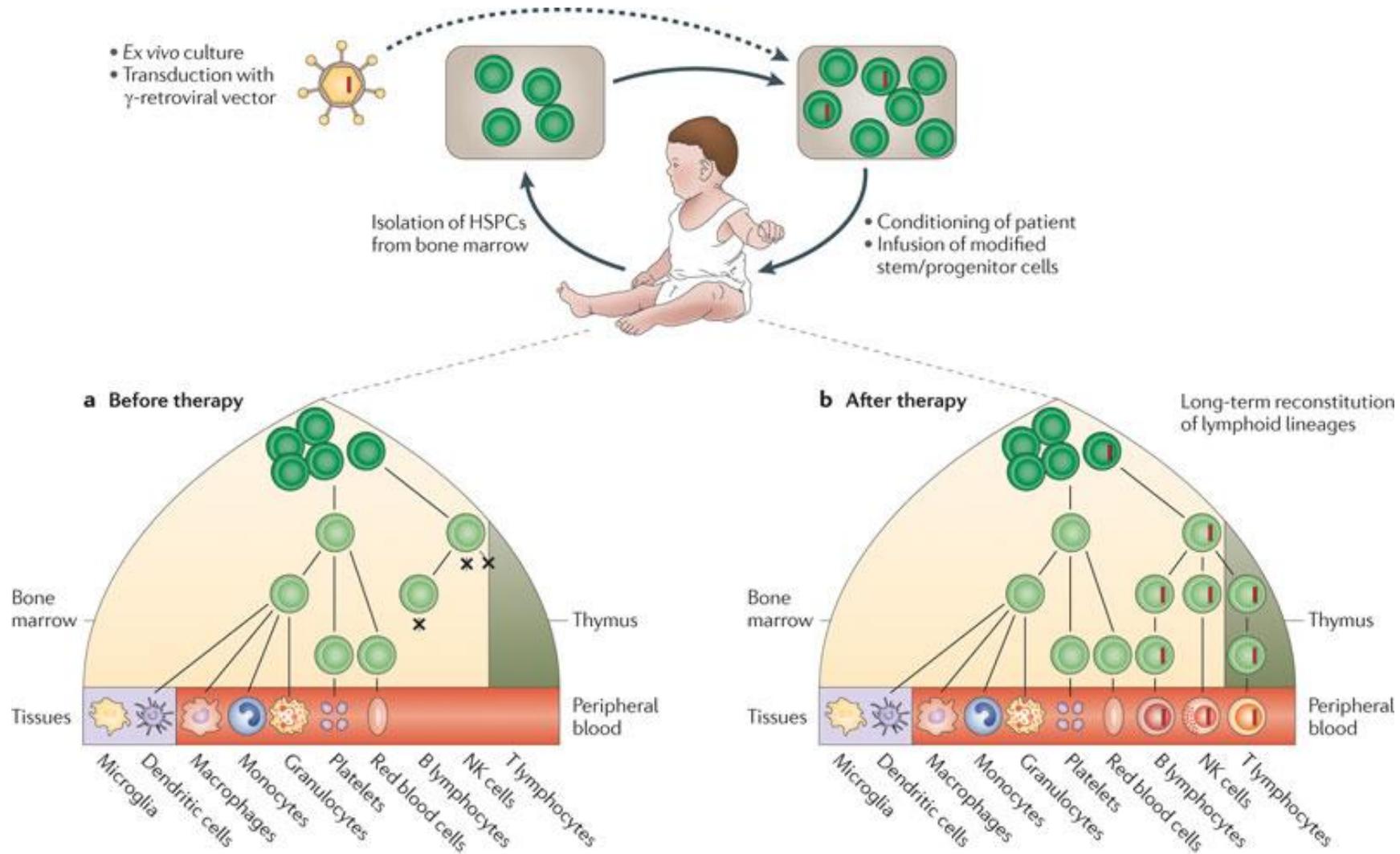
E' dovuta alla mutazione di un gene che impedisce lo sviluppo dei linfociti.

Non viene prodotto un enzima, l'adenosindeaminasi (ADA)

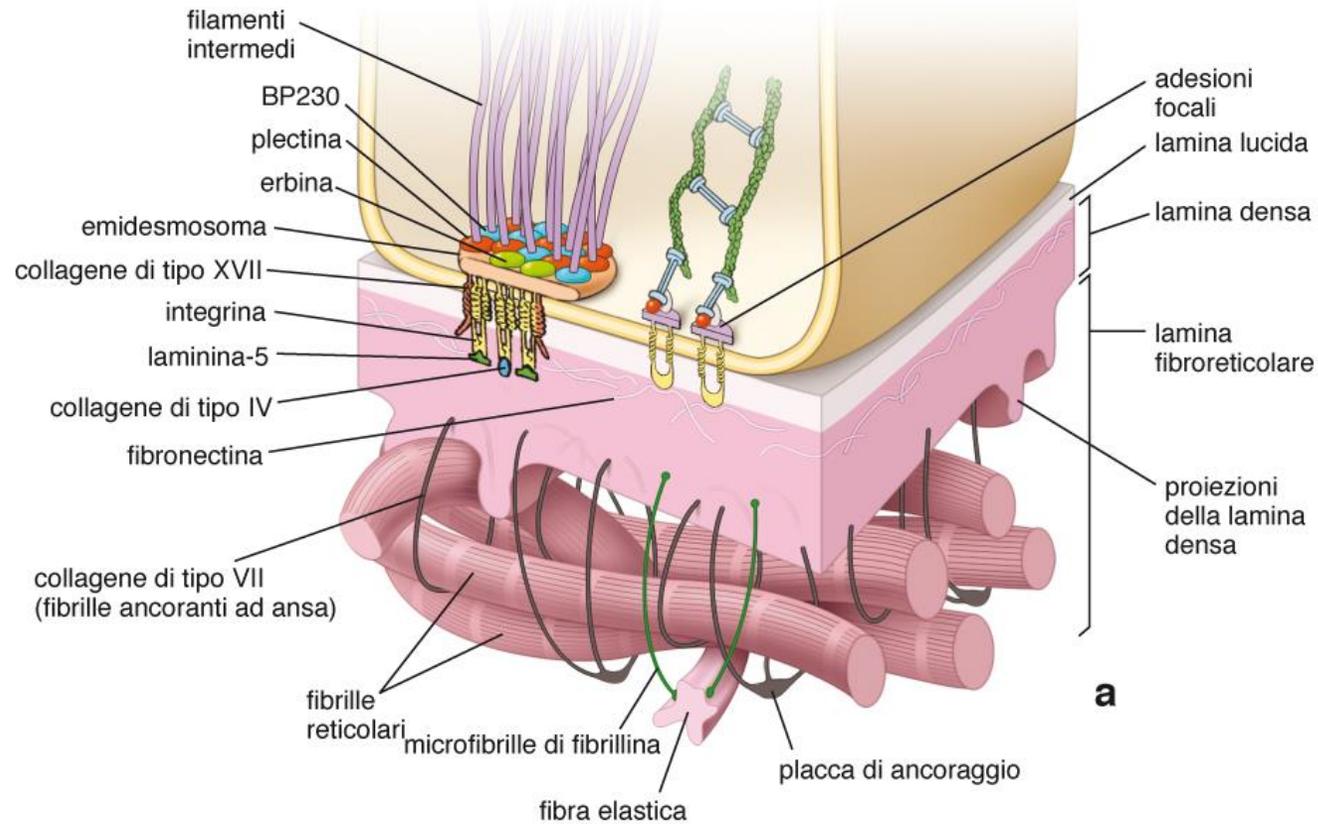


- **terapia antibiotica** ad ampio spettro,
- **trapianto di midollo** (difficoltà di reperire donatore compatibile),
- **terapia sostitutiva** con enzima endogeno
- **terapia genica** (decine di bambini trattati, tutti oggi viventi)

Primo esempio di terapia genica su cellule staminali: *viene modificata l'informazione genetica delle cellule* inserendo il gene normo-funzionante per l'enzima ADA (attraverso uno specifico vettore) nelle cellule staminali midollari, un processo che si definisce 'trasduzione'. A questo punto, le cellule trattate vengono reintrodotte nel paziente mediante una infusione endovenosa. È operativa presso l'Istituto San Raffaele di Milano.



Terapia genica per l'epidermolisi bullosa

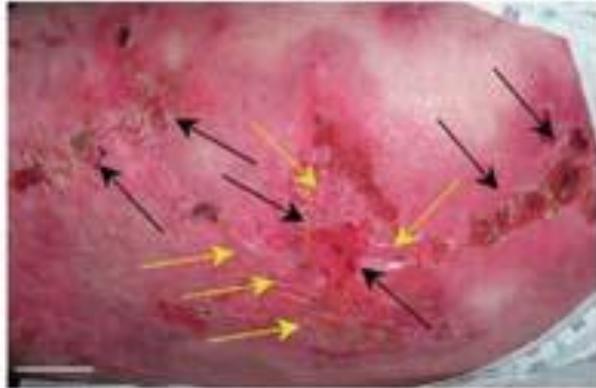


L'**epidermolisi bullosa** è una malattia genetica della pelle dovuta a varie mutazioni, tra cui a quella del gene per la laminina-5 che non permette una corretta formazione della lamina basale, con conseguente distacco dell'epidermide, (ferite, infiammazioni, infezioni, cancro alla pelle).

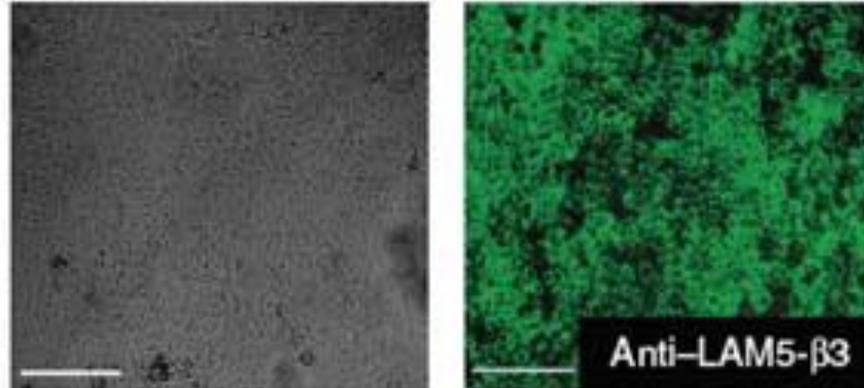


Colture di cellule staminali epidermiche geneticamente modificate (transgeniche) con l'inserimento della versione sana del gene sono state utilizzate con successo nella *prime sperimentazioni cliniche ex-vivo di terapia genica per la cura di una forma di epidermolisi bullosa non letale*

A. Before graft



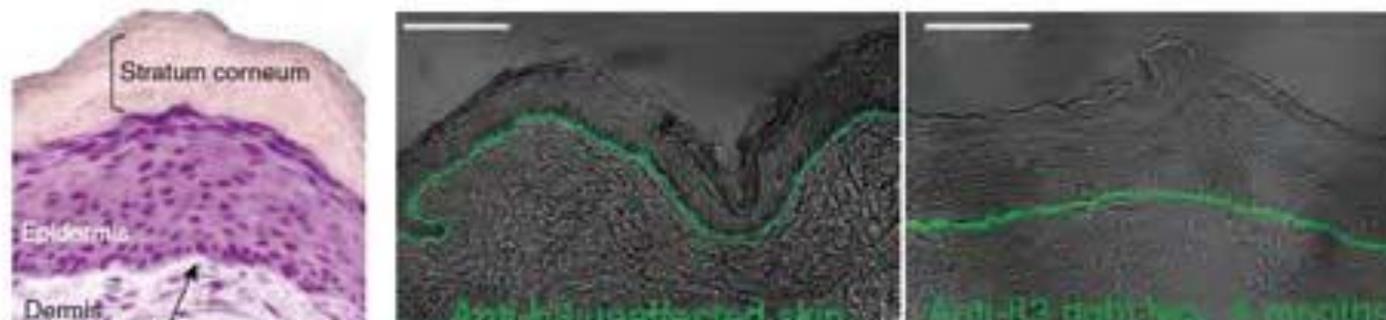
B. Ex vivo genetic correction



C. Genetically modified epidermal graft



D. Stable correction of laminin-5 deficiency



Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells

Tobias Hirsch^{1*}, Tobias Rothoelt^{2*}, Norbert Teig^{2*}, Johann W. Bauer^{3*}, Graziella Pellegrini^{4,5*}, Laura De Rosa^{5*}, Davide Scaglione⁶, Julia Reichelt³, Alfred Klausegger³, Daniela Kneisz³, Oriana Romano⁷, Alessia Secone Seconetti⁵, Roberta Contin⁵, Elena Enzo⁵, Irena Jurman⁸, Sonia Carulli⁹, Frank Jacobsen¹, Thomas Luecke¹⁰, Marcus Lehnhardt¹, Meike Fischer², Maximilian Kueckelhaus¹, Daniela Quaglino⁷, Michele Morgante⁸, Silvio Biciato⁷, Sergio Bondanza⁹ & Michele De Luca⁵

- 7 anni, forma devastante di epidermolisi bullosa (80% della superficie corporea priva di pelle): trapianto di epidermide ottenuta in vitro da cellule staminali transgeniche (uso compassionevole, terapeutico di farmaci sperimentali al di fuori degli studi clinici)
- Rigenerazione di 0,85m² di pelle
- Follow-up di 21 mesi: il rinnovo dell'epidermide è sostenuto da alcune cellule staminali transgeniche

