

CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA DELLA CELLULA STAMINALE: STAMINALITÀ, METABOLISMO E INTERAZIONE CON I BIOMATERIALI

Giuseppina Nocca

Istituto Biochimica Clinica, Università Cattolica Sacro Cuore, Roma

La perdita o l'insufficienza funzionale di un organo o di un tessuto rappresentano uno degli aspetti più invalidanti, frequenti e costosi nell'ambito della sanità; il problema non è solamente limitato alla mancanza di organi in toto, ma coinvolge anche deficit tissutali localizzati, difficilmente risolvibili con l'ausilio dei soli e usuali trattamenti chirurgici o farmacologici (1). L'uomo da sempre cerca di risolvere – al meglio delle proprie capacità e possibilità – queste compromissioni, come documentato dai tanti reperti rinvenuti (sia di epoca egizia che etrusca) di individui sepolti con le loro “protesi”: conchiglie al posto dei denti, canini legati a filo d'oro tra due incisivi (antesignano dei moderni “ponti”), mummia egizia con alluce in legno, solo per citarne alcuni.

Con il passare dei secoli, con l'aumentare delle conoscenze scientifiche e delle scoperte tecnologiche, l'uomo ha cominciato a cercare di sostituire anche porzioni di tessuto osseo sia con trapianti omologhi che eterologhi, con risultati non sempre positivi. Colpisce il fatto che i primi innesti di tessuto osseo siano stati effettuati nel XVII secolo prima che fosse descritta per la prima volta la struttura ossea e che si cominciasse a parlare di callo osseo, impianto e riassorbimento.

Oggi la tecnica migliore a disposizione per ripristinare la funzionalità di organi persi o gravemente lesionati è il trapianto, tale metodica, tuttavia, risente della strutturale insufficienza di donatori e comporta, per il ricevente, la necessità di utilizzare, per tutta la vita, farmaci immunosoppressori con i ben noti effetti collaterali. In questo panorama, a cavallo tra gli anni '80 e '90 del secolo scorso, si inseriscono la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale, potenzialmente in grado di risolvere le problematiche legate al trapianto.

La medicina e la chirurgia rigenerativa sono un settore interdisciplinare di ricerche e applicazioni cliniche focalizzate prevalentemente sulla prospettiva di riparare, sostituire e/o rigenerare cellule, tessuti e/o organi al fine di ripristinare alcune funzioni anatomiche, fisiologiche e biochimiche deteriorate per cause differenti, come difetti congeniti, malattie, traumi e invecchiamento. La caratteristica più importante della medicina rigenerativa consiste nell'idea di utilizzare contemporaneamente una combinazione di numerosi approcci tecnologici, spesso convergenti, sia già esistenti che recentemente messi a punto. Quando possibile, questi nuovi approcci terapeutici dovrebbero limitarsi a stimolare e sostenere le capacità proprie di guarigione dell'organismo umano, includendo, senza limitazioni, l'uso di molecole solubili, terapie geniche, terapie basate sull'uso di cellule staminali e/o progenitrici, ingegneria tissutale e riprogrammazione cellulare e/o tissutale.

Nel primo simposio di ingegneria tissutale nel 1988 in California, fu formulata la seguente definizione: “L'applicazione dei principi e dei metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale” (2). Caratteristica principale dell'ingegneria tissutale è la multidisciplinarietà (ingegneria, chimica, fisica, biologia, biotecnologie e medicina) e la sua strategia principale si avvale di cellule viventi (e/o loro prodotti) e di supporti innovativi, per sviluppare sostituti tissutali bioattivi in alternativa agli impianti inerti. Gli studi iniziali cercarono

di riprodurre i tessuti e gli organi naturali nella forma, nelle proprietà e nella funzione ma, in poco tempo, fu evidente che la complessità dei tessuti biologici era tale da rendere quasi impossibile il passaggio dai sistemi *in vitro* a quelli *in vivo*. Durante la prima decade, quindi, si è approfondita la conoscenza sulle potenzialità dell'utilizzo di cellule, fattori biochimici e *scaffold* biocompatibili per la ricostruzione tissutale. Viste le difficoltà incontrate nel primo decennio, nel 1998 si è avuto il passaggio da ingegneria tissutale a ingegneria tissutale funzionale il cui obiettivo è ristabilire la funzione del tessuto o organo, identificando le esigenze meccaniche e strutturali del tessuto da ripristinare.

Rigenerazione ossea

Attualmente il trattamento chirurgico per perdite ossee estese si avvale di due alternative:

- Innesto di tessuto autologo; definito come *gold standard* per la rigenerazione, rappresenta una soluzione sicura per la compatibilità e l'assenza di risposta immunitaria, ma è anche disagiata per il paziente per la necessità di un secondo intervento e per il rischio di morbilità associato al prelievo. Inoltre è spesso difficile sopperire alla quantità di tessuto necessaria alla sostituzione della porzione mancante, o la qualità dell'osso recuperato non consente buoni risultati al reimpianto.
- Innesto di tessuto allogenico; grazie all'esistenza di banche dell'osso, è disponibile anche l'innesto di questa tipologia di tessuto, che tuttavia ha mostrato essere spesso soggetto a scarso rimodellamento e insufficiente rivascolarizzazione, funzionando quindi da mero supporto. Non sono da sottovalutare anche problematiche quali il rigetto e il rischio di infezioni legato all'impianto di tessuti di origine omologa.

La rigenerazione ossea si inserisce, quindi, come interessante prospettiva con due possibili modalità: la prima, *in vitro seeding*, dove le cellule del paziente si seminano sul biomateriale che viene posto in un bioreattore che simula l'ambiente biologico, creando condizioni colturali ottimali per la crescita cellulare. Il costrutto così ottenuto verrà poi impiantato nel paziente dove dovrebbe essere gradualmente riassorbito e sostituito da tessuti vitali grazie all'apporto vascolare e nervoso. Le applicazioni cliniche già in uso comprendono cartilagine, cute e sistema vascolare. La seconda, *in vivo (tissue guided regeneration)* modalità in cui la rigenerazione viene ottenuta direttamente nel paziente. Questo approccio associa agli *scaffold* materiali in forma di polveri, soluzioni o microparticelle caricate capaci di promuovere la riparazione locale. Molecole o fattori che attivano la proliferazione cellulare, come le *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), possono essere coniugate chimicamente al materiale e rilasciate nei tessuti a velocità controllata, per diffusione o frammentazione del supporto. Tali materiali bioattivi sono in grado di indurre localmente cellule dell'ospite a rilasciare fattori di crescita, che a loro volta stimolano cellule coinvolte nella rigenerazione del tessuto *in situ*.

Per la realizzazione del tessuto osseo sono, quindi, quattro gli elementi fondamentali:

1. le cellule (differenziate o staminali), che si dividono in autologhe (prelevate dallo stesso individuo su cui sarà eseguito l'impianto), allogeniche (provenienti da un donatore della stessa specie) e xenogeniche (ottenute da un donatore di un'altra specie);
2. i mediatori biochimici, cioè i fattori di crescita (es. *Epidermal growth factor*, *Fibroblast growth factor*, ecc.);
3. il bioreattore, ossia un dispositivo per colture cellulari che ha lo scopo di garantire l'apporto e il mantenimento di specifiche concentrazioni di nutrienti e gas:

4. lo *scaffold*. I biomateriali per gli *scaffold* dovrebbero idealmente essere: biocompatibili, biodegradabili, e favorire: adesione, migrazione, proliferazione, differenziamento cellulare, sintesi matrice extracellulare, invasione vascolare.

L'uso delle cellule staminali in medicina rigenerativa, presuppone il costante mantenimento delle loro proprietà di staminalità durante i prolungati periodi di proliferazione *in vitro*. I marcatori specifici dello stato indifferenziato sono fondamentali per controllare la stabilità **dei** fenotipi cellulari nel corso del tempo e confrontare le linee cellulari tra i diversi laboratori. Infatti, le linee di cellule staminali umane, coltivate per lunghi periodi di tempo, mostrano cambiamenti nella stabilità del cariotipo, espressione di marcatori di superficie cellulare, fattori di trascrizione e attività telomerasica (3, 4).

Negli ultimi anni diversi parametri sono stati caratterizzati per essere direttamente correlati alle funzioni delle cellule staminali e l'attività mitocondriale è stata considerata particolarmente importante per sostenere la vitalità cellulare. I mitocondri, infatti, non solo forniscono energia alle cellule con la maggior parte del loro ATP (*Adenosine TriPhosphate*) ma forniscono anche GTP (*GuanosinTriPhosphate*), oltre a controllare il turnover degli amminoacidi e realizzare la beta-ossidazione degli acidi grassi (5). Inoltre, questi organelli subcellulari, insieme al reticolo endoplasmatico, servono anche come un serbatoio di calcio cellulare. Alcuni studi recenti hanno analizzato l'attività mitocondriale e l'alterazione del tasso di consumo di ossigeno (6-11).

Negli ultimi anni sono stati ottenuti nuovi risultati interessanti e, in particolare, alcuni studi hanno documentato che ogni fase cellulare dipende da uno specifico stato metabolico (5, 12). Infatti, il metabolismo delle cellule staminali embrionali pluripotenti (*pluripotent Embryonic Stem Cells* – pESCs) si basa su un elevato livello di glicolisi, mentre durante la differenziazione cellulare il consumo di glucosio attraverso il percorso glicolico diminuisce e aumenta la fosforilazione ossidativa mitocondriale (6, 13, 14). Inoltre, durante la differenziazione delle cellule staminali, i mitocondri modificano il loro numero, la morfologia e la localizzazione (11, 13-15). È interessante notare che quando le cellule differenziate vengono trasformate in cellule staminali pluripotenti indotte (*induced Pluripotent Embryonic Stem Cells* – iPSCs), esse passano il loro metabolismo dalla fosforilazione ossidativa alla glicolisi (15), la cui inibizione blocca il processo di de-differenziazione (16). Alcune cellule staminali adulte, come le cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells* – MSC) e le cellule staminali ematopoietiche a lungo termine, richiedono un basso livello di ossigeno per mantenere condizioni indifferenziate. Queste cellule vivono in nicchie, in condizioni ipossiche e utilizzano principalmente la glicolisi per ottenere ATP, limitando quindi la produzione di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species* – ROS) e danni conseguenti a DNA (*DeoxyriboNucleic Acid*) e RNA (*RiboNucleic Acid*) (13, 14).

La relazione tra il metabolismo aerobico e anaerobico è molto varia e complessa ma, pur con le dovute cautele, tutti questi risultati sembrano indicare che la pluripotenza cellulare (staminalità) è legata a una moderata attività di fosforilazione ossidativa legata alle condizioni ipossiche che le cellule staminali continuano a vivere. Tuttavia, molti aspetti metabolici delle cellule staminali (sia delle cellule adulte che embrionali) non sono ancora ben compresi e, per questi motivi, non è sempre possibile ottenere cellule *in vitro* differenziate terminalmente dalle cellule progenitrici.

La determinazione di queste caratteristiche potrebbe aiutarci a stabilire se le cellule staminali siano in stato quiescente e quando sono pienamente in grado di differenziarsi. Questa conoscenza potrebbe permettere la scoperta dei legami dei profili metabolici con differenti marcatori di superficie delle cellule staminali (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166) e di segnalazione cellulare; in questo modo sarebbe possibile controllare le eventuali deviazioni dal comportamento normale delle cellule staminali in coltura permettendo l'eliminazione delle cellule difettose dannose per il perseguimento del differenziamento cellulare propedeutico alle applicazioni delle cellule staminali in medicina rigenerativa.

Tutte queste proprietà si ottengono grazie all'interazione tra cellule e biomateriale. Se le cellule, infatti, non riescono a riconoscere e a interagire con il substrato nessun processo successivo (proliferazione, migrazione e differenziamento cellulare) può avvenire (17-19). Pertanto nella progettazione di materiali per l'ingegneria dei tessuti, la comprensione dei meccanismi che regolano tale interazione sono di fondamentale importanza.

Le interazioni che possono instaurarsi tra cellula materiale possono essere di tipo elettrostatico o idrofobico ma da esse non derivano risposte biologiche. Affinché ciò avvenga, è necessario che l'interazione cellula-materiale porti alla trasduzione dei segnali in modo da indurre una risposta biologica (20). L'interazione deve quindi essere tra un ligando e un recettore in grado di stimolare le vie di trasduzione del segnale. L'adesione cellulare è un processo che si compie in due fasi: nella prima si ha la formazione dei legami (ionici e/o forze di Van der Waals) tra cellule e substrato; nella seconda, vengono coinvolte le proteine della matrice extracellulare (*Extra Cellular Matrix*) e del citoscheletro (21). Se consideriamo la situazione *in vivo*, infatti, la cellula riconosce l'ambiente che la circonda (cioè le proteine ECM) – e interagisce con esso. Da questa interazione deriva l'adesione e, quindi, una cascata di segnali intracellulari che permettono la crescita, la proliferazione e il differenziamento. La ECM, quindi, è coinvolta direttamente nella regolazione delle principali funzioni cellulari (20, 21).

Nella ECM sono presenti numerosi tipi di proteine, tra cui i proteoglicani e le proteine fibrose; all'interno di quest'ultima possiamo distinguere un gruppo con funzione strutturale (in cui si ritrovano collagene ed elastina) e un altro con funzione adesiva (fibronectina e laminina). Il sito di adesione cellulare è un sito di ancoraggio in cui le proteine della ECM si legano indirettamente all'actina del citoscheletro actina attraverso una complessa rete di proteine transmembrana chiamate integrine (22). Queste proteine svolgono numerose funzioni, da una parte, infatti, legandosi alle proteine della ECM, attivano numerose vie di trasduzione del segnale (sia le vie con recettori con attività di tirosina-chinasi, o serin-treonina chinasi, ecc.), dall'altra sono associate alle proteine del citoscheletro (actina, tensina, vinculina, ecc.) esse sono quindi in grado di integrare l'ambiente extracellulare con quello intracellulare, da cui il loro nome.

Le integrine sono una famiglia di glicoproteine eterodimeriche transmembrana, costituite da due subunità, α e β , unite con interazioni deboli (22). La maggior parte delle proteine della ECM, presenta una sequenza conservata dei tre amminoacidi Arg-Gly-Asp (*Arginylglycylaspartic acid*), RGD, che può interagire direttamente con le integrine, comunque, questo non è un motivo universale. Proprio a causa della fondamentale importanza che ha l'interazione cellula – biomateriale, ormai quest'ultimo non può più essere solo biocompatibile e biodegradabile quindi nella progettazione di un biomateriale bisogna considerare anche la presenza di segnali biochimici (bioattivazione). La bioattivazione si può indurre con trattamenti superficiali, o con l'introduzione nel materiale di molecole biologicamente attive (inclusi fattori di crescita, inibitori di crescita, fattori angiogenici e/o agenti immunosoppressori). La bioattivazione dei materiali più comunemente praticata attualmente avviene per mezzo di peptidi specifici legati covalentemente al materiale.

La conoscenza dei fattori coinvolti nell'adesione cellulare ha rappresentato un'importante evoluzione nella progettazione di biomateriali che consentano una modulazione del legame con le cellule.

Una superficie bioattivata può diventare paragonabile a una ECM in grado di fornire gli stimoli biologici adatti a guidare la formazione di nuovo tessuto permettendo adesione e specificità di interazione migliorando l'osteconduttività degli *scaffold*.

Bibliografia

1. Tosca MC, Marazzi M, Antonioli B, Galuzzi M, Mingotto F, Bertuzzi F, Aragona S, Scalise A. *Cellule staminali*. Bologna: Esculapio; 2016.
2. Fox C, Fred C, Skalak R. (Ed). *Tissue engineering*. Proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe. New York, USA: Liss; 1988.
3. Brimble SN, Zeng X, Weiler DA, et al. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev* 2004;13(6):585-97.
4. Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* 2004;229(2):259-74.
5. Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(4):243-56.
6. Cho YM, Kwon S, Pak YK, et al. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348(4):1472-8.
7. Lonergan T, Brenner C, Bavister B. Differentiation-related changes in mitochondrial properties as indicators of stem cell competence. *J Cell Physiol* 2006;208(1):149-53.
8. von Heimburg D, Hemmrich K, Zachariah S, Staiger H, Pallua N. Oxygen consumption in undifferentiated versus differentiated adipogenic mesenchymal precursor cells. *Respir Physiol Neurobiol* 2005;146(2-3):107-16.
9. Piccoli C, Ria R, Scrima R, et al. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *J Biol Chem* 2005;280(28):26467-76.
10. Plotnikov EY, Marei MV, Podgornyi OV, Aleksandrova MA, Zorov DB, Sukhikh GT. Functional activity of mitochondria in cultured neural precursor cells. *Bull Exp Biol Med* 2006;141(1):142-6.
11. Lonergan T, Bavister B, Brenner C. Mitochondria in stem cells. *Mitochondrion* 2007;7(5):289.
12. Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 2012;11(5):596-606.
13. Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 2011;9(4):298-310.
14. Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 2013;140(12):2535-47.
15. Xu X, Duan S, Yi F, Ocampo A, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metab* 2013;18(3):325-32.
16. Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, et al. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab* 2011 Aug 3;14(2):264-71.
17. Giancotti FG and Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285(5430):1028-32.
18. Schoenwaelder SM and Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11(2):274-86.
19. Humphries MJ and Newham P. The structure of cell-adhesion molecules. *Trends Cell Biol* 1998;8(2):78-83.
20. Zamir E and Geiger B. Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Science* 2001;114:3577-9

21. Zamir E and Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Science* 2001;114:3583-90
22. Schwartz MA, Schaller MD and Gisberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:549-99.