



Il Coordinamento Para-tetraplegici del Piemonte (CP), nel contesto delle celebrazioni della Giornata Nazionale della persona con lesione midollare, il giorno **15 aprile 2014**, in collaborazione con i Dirigenti medici e gli Operatori professionali dell'USU di Torino ha organizzato un **INCONTRO di INFORMAZIONE** sul tema **"STAMINALI: UN INGANNO O UNA SPERANZA?,"** presso la Sala Polifunzionale dell'USU - Via Zuretti, 24.

Il CP condivide la posizione della FAIP (Federazione Associazioni Italiane Paratetraplegici) contro la "ricerca che illude": condanna la "ricerca" che millanta risultati eccezionali ed alimenta l'illusione che possa avvenire il "miracolo" di tornare a "stare in piedi" senza alcun fondamento scientifico. La FAIP ed il CP sostengono invece la ricerca seria e valicata, quella che, sulla base di evidenze scientifiche certe, punta al miglioramento concreto della qualità della vita delle persone che convivono con gli esiti di una lesione midollare.

Di seguito riportiamo i contributi dei due ricercatori intervenuti che ringraziamo per la grande disponibilità e chiarezza espressa.



PROF. ALESSANDRO VERCELLI

Dipartimento di Neuroscienze, Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), NIT, Università di Torino

LA TERAPIA CELLULARE PER LE LESIONI DEL MIDOLLO SPINALE

Nell'ultima decade, le cellule staminali sono state proposte per la terapia di diverse malattie del sistema nervoso, basandosi sul fatto che possono rilasciare fattori trofici e modulatori dell'immunità per stimolare la crescita degli assoni, modificare l'ambiente e ridurre l'infiammazione. Secondo alcuni, le cellule staminali potrebbero anche rimpiazzare le cellule degenerate, sia neuroni sia cellule di glia (per esempio l'oligodendroglia, che avvolge le fibre nervose).

In realtà, le cellule staminali sono molto diverse le une dalle altre, e per usarle come prodotti medicinali devono essere ben indagate, testate e prodotte in modo standardizzato. Differiscono tra loro per origine, stadio di sviluppo e di differenziamento, e per destino cellulare (cioè cellule mature a cui danno origine).

Le cellule staminali embrionarie sono isolate ai primi stadi di sviluppo dell'embrione, possono duplicarsi in continuazione senza invecchiare, possono dar origine a diversi tipi cellulari, possono essere manipolate geneticamente: quindi possono diventare neuroni o cellule di glia, però sono potenzialmente capaci di dar origine a tumori (proliferare indiscriminatamente) una volta trapiantate.

I **precursori** sono cellule staminali che già sono orientate verso la produzione di cellule nervose: sono ancora in grado di duplicarsi e di dare origine a tumori. I precursori delle cellule che avvolgono le fibre nervose del nervo olfattivo sono un tipo particolare di cellule, che presentano aspetti interessanti perché sono molto plastiche e oltrepassano le cicatrici di glia.

Anche le cellule di Schwann (le cellule che producono l'avvolgimento degli assoni nei nervi periferici) sono state utilizzate per trapianti.

Le **cellule staminali derivate dal sangue o dal midollo osseo** sono più facilmente accessibili (si trovano anche negli adulti e possono essere donate), il loro trapianto è stato ampiamente sperimentato nei malati leucemici da almeno mezzo secolo, e rilasciano anch'esse dei fattori trofici e immunomodulatori, ma non rimpiazzano gli elementi nervosi degenerati.

Più recentemente, la **possibilità di riprogrammare cellule adulte** in coltura cellulare per poi trasformarle nel tipo cellulare desiderato ha aperto nuovi orizzonti, in quanto sarebbe possibile prendere delle cellule del malato stesso (per esempio nel

sotocute) e, con procedure complesse e laboriose, trasformarle nel tipo di cellule desiderato per trapiantarle nello stesso malato evitando il rischio di rigetto.

Come si può vedere da questo elenco, le opzioni sono già molte e molto differenti tra loro già nella scelta del tipo di cellule da trapiantare.

Per quanto riguarda le lesioni del midollo spinale, le cellule staminali possono essere trapiantate a tempi diversi dalla lesione (in fase acuta, subacuta o cronica?), inoltre in punti diversi (nella lesione, sopra o sotto la lesione?) e in associazione con altre terapie che favoriscano la ricrescita delle fibre nervose e modifichino la cicatrice gliale.

I risultati sui modelli sperimentali animali (roditori soprattutto) hanno messo in luce spesso dei miglioramenti sia dal punto di vista morfologico (cioè degli aspetti anatomici e istologici del problema) sia dal punto di vista del comportamento motorio e sensitivo. Per questo, mentre si continua a sperimentare nei roditori i meccanismi cellulari e biologici per cui la terapia cellulare può essere efficace, si sta cercando di passare a modelli di animali più vicini all'uomo, come i suini o i primati.

Esiste poi un grosso problema di standardizzazione delle cellule da trapiantare, cioè è molto difficile raggiungere i livelli di riproducibilità di altri farmaci.

La ricerca scientifica ha però i suoi tempi, che spesso non sono compatibili con i bisogni dei singoli malati che vorrebbero delle risposte rapide e sono spesso disposti a sottoporsi a terapie non ben sperimentate pur di avere una speranza di guarigione, anche sull'onda delle notizie che spesso compaiono sui giornali non scientifici su terapie potenzialmente "miracolose". Pertanto spesso i pazienti (o le loro famiglie) chiedono di saltare le diverse fasi della sperimentazione pre-clinica, e sono disposti a sottoporsi, nelle strutture pubbliche o piuttosto in quelle private, a terapie che in realtà non hanno ancora una ragionevole aspettativa di efficacia e di sicurezza.

Se il rapporto rischio/beneficio risulta già così molto alto in pazienti affetti da malattie incurabili e che comportano una breve aspettativa di vita, a maggior ragione diventa altissimo nei pazienti con lesione midollare, quando l'aspettativa di vita è comunque lunga e anche i possibili effetti collaterali (come i tumori) hanno più tempo per verificarsi.

Vista la vasta popolazione affetta dagli esiti dei **traumi del midollo spinale** con paralisi e perdita della sensibilità delle parti del corpo innervate dal midollo spinale sotto il livello della lesione, si è pensato di utilizzarle in fase acuta (subito dopo la lesione) o cronica. Gran parte degli studi clinici con terapia cellulare mediante l'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali (MSC), di qualsivoglia origine, ha dimostrato soprattutto una assenza di effetti sfavorevoli per i pazienti, fatta salva per la comparsa di dolore neuropatico o di febbre moderata, spesso solamente transitoria. Per esempio molti studi, cinesi e indiani, hanno riportato un effetto positivo sul recupero funzionale nella lesione del midollo spinale, soprattutto dopo trapianto in pazienti acuti. In questi studi però manca il gruppo di controllo, cioè un gruppo a cui sia stata effettuata la procedura senza trapianto delle MSC: a tal proposito, giova ricordare che nelle lesioni del midollo spinale spesso si ha comunque un recupero funzionale,



almeno parziale, nel breve-medio periodo post-lesionale. Quindi la mancanza di un gruppo di controllo di paragone, e il semplice riscontro di un miglioramento rispetto alle condizioni al momento del trapianto, non sono sufficienti a suffragare l'efficacia della terapia.

I migliori risultati dal punto di vista del recupero funzionale vengono riportati da gruppi cinesi, che come è noto hanno la più ampia casistica, ma sono stati tutti pubblicati su riviste cinesi e mai sottoposti al vaglio della comunità scientifica e medica internazionale.

Dal punto di vista degli effetti avversi, vanno citate a seconda della via di somministrazione:

- a) un pneumotorace e tre reazioni allergiche per la cateterizzazione della arteria radicolare spinale toracica (Yoon e al., 2007);
- b) una mielite trasversa con encefalomielite acuta diffusa dopo iniezione intratecale (nei ventricoli cerebrali) (Kishk e al., 2010).

Inoltre l'iniezione intraparenchimale (cioè dentro al midollo stesso) ha un più alto numero di effetti collaterali: 20% di incidenza di dolore neuropatico e 69% di febbre (Yoon e al., 2007). Per l'iniezione intratecale, sono stati riportati cefalea e dolore neuropatico, e febbre di breve durata (Metha e al., 2008). Altri invece riferiscono una bassissima percentuale (5,9%) di casi di dolore neuropatico (Kumar e al., 2009).

Allo stato attuale, tranne gli studi svolti in India e in Cina, riportati in riviste poco accessibili e che spesso non rispondono agli standard internazionali per quanto riguarda il sistema di revisione tra pari dei dati presentati, gli effetti avversi dipendono, almeno in parte, dalla via di somministrazione.

Soprattutto per l'iniezione intraparenchimale, l'effetto avverso più comune è il dolore neuropatico, riferito praticamente in tutti gli studi come frequente, ma sopportabile dal paziente. L'iniezione intratecale comporta invece spesso la comparsa di cefalea. L'iniezione endovenosa di MSC ha comportato la trombizzazione (con conseguente chiusura) dei piccoli vasi polmonari. Gli effetti avversi più gravi sono legati alla procedura chirurgica (pneumotorace durante cateterizzazione, cisti) oppure alla comparsa di reazioni allergiche o ancora un caso di encefalomielite diffusa. Non è descritta invece la comparsa di tumori.

Trapianti di cellule staminali mesenchimali o del midollo osseo hanno riportato miglioramenti in due pazienti (Moviglia e al., 2006) o 5 pazienti (Saito e al., 2008, 2012). Si tratta spesso di

miglioramenti riferiti soggettivamente dai pazienti e non oggettivabili da indagini radiologiche o funzionali (Ra e al., 2011), e in alcuni studi gli effetti collaterali sembrano importanti (Ra e al., 2011): infezioni respiratorie e urinarie, febbre, dolore alle spalle e al collo, mal di testa, dolore neuropatico, incontinenza urinaria... Nel 2000 si è sviluppato un trial di fase I in Israele e Belgio con monociti, che ha riportato assenza di effetti collaterali e recupero motorio e sensitivo in tre pazienti (Knoller et al., 2005), per cui si è passati a uno studio multicentrico randomizzato di fase II che però è stato abbandonato per ragioni finanziarie.

Trattasi di studi di fase I e II, su campioni esigui e spesso non omogenei di pazienti per i quali i test statistici non sono risultati significativi per risultati positivi.

Molti trial sono per ora statisticamente non affidabili per il campione piccolo, per l'eterogeneità dei pazienti e spesso per la mancanza di gruppi di controllo.

Le **cellule staminali neurali** presentano un maggior rischio di rigetto e di proliferazione incontrollata, cioè di genesi di tumori, rispetto alle MSC, soprattutto in pazienti che hanno una lunga aspettativa di vita.

Più di 400 pazienti affetti da lesioni spinali hanno ricevuto un trapianto con cellule olfattive (Dobkin e al., 2006; Feron e al., 2005; Huang et al., 2003; Lima e al., 2006).

Feron e colleghi hanno riferito assenza di complicazioni nei tre anni successivi, senza però ottenere miglioramenti (Feron e al., 2005).

Lima e colleghi in uno studio non in cieco e non randomizzato hanno riportato invece miglioramenti in 11 pazienti cronici su 20, con uno in peggioramento, dopo intensa riabilitazione (Lima e al., 2006).

Alcuni studi effettuati con cellule di Schwann hanno riportato assenza di effetti collaterali e un miglioramento sensorimotorio e del controllo autonomo, ma senza avere gruppi di controllo con gli stessi parametri di età e condizioni (tipo la scala ASIA) (Saber e al. 2008 e 2011; Zhou e al., 2012).

Recentemente, il progetto Miami per la cura della paralisi ha iniziato uno studio di fase I con le cellule di Schwann su pazienti subacuti (NCT01739023).

Trapianti di cellule olfattive hanno dimostrato la sicurezza del trapianto, ma una generale assenza di beneficio (Dobkin e al., 2006, Feron e al., 2005, Huang e al., 2003, Lima e al., 2006).

La compagnia statunitense Geron ha recentemente reclutato pazienti con lesione spinale per testare la sicurezza di precursori di oligodendrociti derivati da embrioni (NCT01217008). Questo trial clinico è stato prima approvato, poi bloccato per timori di

formazioni di cisti, e nell'ottobre 2010 approvato nuovamente, sebbene con qualche controversia (Bretzner e al., 2011; Solbakk e Jan Zoloth, 2011). Nell'ottobre 2011, la Geron ha presentato i primi risultati, senza effetti collaterali, ma anche senza recupero funzionale e ha bloccato la sperimentazione adducendo problemi finanziari.

Al momento attuale **mancono dati clinici su trapianti con staminali riprogrammate**, ma per ora esse sollevano ancora molte preoccupazioni riguardo il potenziale tumorale.

PER TIRAR LE SOMME

Esiste ormai una vasta letteratura di studi su pazienti trapiantati con cellule staminali, sia per curare le lesioni del midollo spinale, sia per curare altre malattie neurodegenerative.

Per ora, il risultato più significativo che hanno dimostrato questi studi, in caso di una tecnica chirurgica affidabile, di una buona pratica nella preparazione delle cellule e nella standardizzazione del prodotto cellulare da trapiantare, è stato l'assenza di gravi effetti collaterali avversi, almeno per alcune delle cellule staminali proposte. Molto rari sono invece i risultati clinicamente significativi, in termini di recupero funzionale motorio, sensitivo o autonomo. Soprattutto, gli studi che riportano risultati clinicamente importanti sono studi privi di valore statistico, in cui un eventuale miglioramento sembra o soggettivo (cioè riferito dal paziente stesso) oppure legato al recupero post-traumatico fisiologico. Non è forse un caso che molti trial sono stati interrotti adducendo motivi finanziari, come se il rapporto costo/beneficio (cioè investimento/ricavi possibili per una compagnia) fosse estremamente sfavorevole.

Questo dovrebbe far riflettere chi vuole investire in termini economici e di sicurezza personale per sperimentare sulla propria persona queste terapie, soprattutto quando questa viene proposta al di fuori di strutture del sistema sanitario nazionale.

Ancora molto deve essere compreso in termini di meccanismi biologici e molecolari di duplicazione, crescita e funzionamento delle cellule staminali, e il passaggio alla clinica sembra un "salto nel buio". Inoltre, molto deve ancora essere fatto per la produzione di cellule staminali come medicinali.

Molto si è insistito recentemente sul termine di "cura compassionevole", ma in ogni caso questo termine non può essere utilizzato per i pazienti affetti da lesioni del midollo spinale. Inoltre il concetto stesso di "cura" implica che esista, per praticare una determinata terapia, una ragionevole evidenza della sua efficacia.



BIBLIOGRAFIA

Bretzner, F., Gilbert, F., Baylis, F., Brownstone, R.M., 2011. Target populations for first-in-human embryonic stem cell research in spinal cord injury. *Cell Stem Cell* 8, 468-475.

Dobkin, B.H., Curt, A., Guest, J., 2006. Cellular transplants in China: observational study from the largest human experiment in chronic spinal cord injury. *Neurorehabil. Neural Repair* 20, 5-13.

Feron, F., Perry, C., Cochrane, J., Licina, P., Nowitzke, A., Urquhart, S., Geraghty, T., Mackay-Sim, A., 2005. Autologous olfactory ensheathing cell transplant in human spinal cord injury. *Brain* 128, 2951-2960.

Huang, H.Y., Chen, L., Wang, H.M., Xiu, B., Li, B.C., Wang, R., Zhang, J., Zhang, F., Gu, Z., Li, Y., Song, Y.L., Hao, W., Pang, S.Y., Sun, J.Z., 2003. Influence of patients' age on functional recovery after transplantation of olfactory ensheathing cells into injured spinal cord injury. *Chin. Med. J. (Engl)* 116, 1488-1491.

Karamouzian S, Nematollahi-Mahani SN, Nakhaee N, Eskandary H., 2012. Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients. *Clin Neurol Neurosurg* 114, 935-939.

Kishk NA, Gabr H, Hamdy S et al. 2010. Case control series of intrathecal autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy for chronic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*, 24, 702-708.

Knoller, N., Auerbach, G., Fulga, V., Zelig, G., Attias, J., Bakimer, R., Marder, J.B., Yoles, E., Belkin, M., Schwartz, M., Hadani, M., 2005. Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase I study results. *J. Neurosurg. Spine* 3, 173-181.

Kumar AA, Kumar SR, Narayanan R, Arul K, Baskaran M. 2009. Autologous bone marrow derived mononuclear cell therapy for spinal cord injury: A phase I/II clinical safety and primary efficacy data. *Exp Clin Transplant*, 7, 241-248.

Lima, C., Pratas-Vital, J., Escada, P., Hasse-Ferreira, A., Capucho, C., Peduzzi, J.D., 2006. Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J. Spinal Cord Med.* 29, 191-203.

Mehta, T., Feroz, A., Thakkar, U., Vanikar, A., Shah, V., Trivedi, H. 2008. Subarachnoid placement of stem cells in neurological disorders. *Transplant Proc*, 40, 1145-114.

Moviglia, G.A., Fernandez, Vina, R., Brizuela, J.A., et al. 2006. Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients. *Cytherapy* 8, 202-209.

Pal, R., Venkataramana, N.K., Bansal, A., et al. 2009. Ex vivo-expanded autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in human spinal cord injury/paraplegia: a pilot clinical study. *Cytherapy* 11, 897-911.

Ra, J.C., Shin, I.S., Kim, S.H., et al. 2011. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev*;20, 1297-1308.

Saberi, H., Firouzi, M., Habibi, Z., et al. 2011. Safety of intramedullary schwann cell transplantation for postrehabilitation spinal cord injuries: 2-year follow-up of 33 cases. *J Neurosurg Spine* 15, 515-525.

Saberi, H., Moshayedi, P., Aghayan HR, et al. 2008. Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous schwann cell transplantation: an interim report on safety considerations and possible outcomes. *Neurosci Lett* 443, 46-50.

Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., et al. 2012. Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. *Restor Neurol Neurosci* 30, 127-136.

Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., et al. 2008. Spinal cord injury treatment with intrathecal autologous bone marrow stromal cell transplantation: the first clinical trial case report. *J Trauma* 64, 53-59.

Solbakk, J.H., Zoloth, L., 2011. The tragedy of translation: the case of "First Use" in human embryonic stem cell research. *Cell Stem Cell* 8, 479-481.

Yoon, S.H., Shim, Y.S., Park, Y.H. et al. 2007. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells* 25, 2066-2073.

Zhou, X.H., Ning, G.Z., Feng, S.Q., et al. 2012. Transplantation of autologous activated schwann cells in the treatment of spinal cord injury: six cases, more than five years of follow-up. *Cell Transplant* 21 (Suppl1), S39-47.



PROF. ANNALISA BUFFO

Dipartimento di Neuroscienze, Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), NIT, Università di Torino

POTENZIAMENTO DELLE CAPACITÀ RIPARATIVE ENDOGENE DEL TESSUTO NERVOSO PER LA CURA DELLE LESIONI MIDOLLARI

Negli ultimi venti anni la ricerca in ambito neurobiologico ha grandemente contribuito a determinare cambiamenti epocali della concezione del sistema nervoso e a produrre avanzamenti fondamentali nella comprensione dei processi degenerativi, infiammatori e anti-rigenerativi che avvengono dopo lesioni come quelle traumatiche midollari.

Il cambiamento epocale al quale mi riferisco è la scoperta che nel cervello adulto dei mammiferi, uomo incluso, sono presenti cellule proliferanti che posseggono le caratteristiche fenotipiche di cellule staminali neurali e di progenitori tipici dell'embriogenesi (Doetsch e coll., 1999; Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009; Nishiyama e coll., 2009).

Questa scoperta, che ha impiegato una ventina d'anni ad affermarsi nella comunità scientifica, ha sovvertito il paradigma che per circa un secolo ha considerato impossibile la generazione di nuove cellule nel cervello adulto.

È ora invece ben dimostrato nell'animale che le cellule staminali adulte producono nuovi neuroni in territori specializzati del cervello mentre altre, distribuite più diffusamente, producono cellule gliali, il secondo componente cellulare del sistema nervoso, indispensabile per il suo corretto funzionamento.

Anche nel sistema nervoso dell'uomo è prodotta nuova glia nella vita adulta. In particolare, esiste una continua benché lenta generazione di quegli elementi della glia che sono responsabili della produzione della mielina, l'avvolgimento dei prolungamenti neuronali responsabile della conduzione degli impulsi nervosi ad alta velocità (Knoth e coll., 2010; Spalding e coll., 2005). Inoltre, in alcune regioni del cervello umano (ad esempio nell'ippocampo, cruciale per l'apprendimento e la memorizzazione) la presenza di progenitori e cellule staminali è associata alla produzione di nuovi neuroni, come è stato dimostrato di recente con tecniche istologiche o basate su datazioni al carbonio radioattivo, incorporato dalle cellule neoprodotte durante le esplosioni nucleari sperimentali terminate negli anni '60 del secolo scorso (Eriksson e coll., 1998, Knoth e coll., 2010; Spalding e coll., 2013).

Questi fenomeni di genesi di nuovi neuroni (neurogenesi) sono

tuttora in fase di studio e potrebbero essere ben più diffusi di quanto si creda. Per esempio, potrebbero coinvolgere altri territori incluso il midollo spinale.

In effetti, una continua neurogenesi è stata proposta di recente per lo striato umano, la parte di cervello colpita fortemente nel morbo di Huntington (Ernst e coll., 2014).

L'affermarsi progressivo dell'idea che il sistema nervoso adulto non sia un tessuto perenne, ma presenti un certo grado di turnover cellulare tipico dei tessuti come la cute e le mucose, ha immediatamente stimolato i ricercatori a capire se la produzione di questi nuovi neuroni potesse servire a scopo rigenerativo, cioè a sostituire neuroni degenerati spontaneamente o dopo una lesione.

La ricerca degli ultimi decenni su modelli animali e in parte sull'uomo ha così rivelato che l'attività di questi progenitori e la produzione di nuovi neuroni aumenta a seguito di danni di natura diversa come lesioni vascolari (ischemia, emorragia cerebrale), traumatiche o infiammatorie.

Negli animali il danno cerebrale scatena fenomeni proliferativi locali anche nel midollo spinale. Alcuni di essi potrebbero riflettere l'induzione di proprietà staminali in elementi silenti e attivati dalla lesione. Tuttavia, mentre è chiaro che, se attivate, queste cellule midollari producono nuova glia e mielina, la loro capacità di produrre nuovi neuroni rimane da dimostrare in maniera definitiva (Meletis e coll., 2008; Bernabé-Heider e coll., 2010).

Le ricerche condotte sugli animali e sull'uomo, in realtà, hanno dimostrato una vera azione rigenerativa delle risposte neurogeniche.

I nuovi neuroni si dirigono verso le zone danneggiate ma, anche quando prodotti in grande quantità, non si integrano nei circuiti preesistenti, ne sopravvivono. Inoltre, nella loro breve vita non assumono spontaneamente il fenotipo dei neuroni perduti da sostituire.



In altre parole, i neuroni neogenereati non si adattano alle esigenze del tessuto danneggiato.

Infine, la loro capacità di migrazione è limitata: per esempio i neuroni prodotti all'interno degli emisferi non riescono a raggiungere il midollo spinale.

Spontaneamente, quindi, questi fenomeni non appaiono adeguati a sostenere fenomeni rigenerativi efficaci e diffusi, come occorrerebbe nel caso di perdita di un numero significativo di cellule nervose.

La scarsa capacità dei giovani neuroni prodotti dopo un danno di migrare verso i siti di lesione, di sopravvivere e di assumere il fenotipo dei neuroni da sostituire ha stimolato i ricercatori a usare approcci farmacologici e biotecnologici di terapia genica per favorirne la sopravvivenza e potenziarne l'attività.

Questi esperimenti, in corso ormai da una decina di anni, hanno dato per ora risultati modesti e non del tutto chiari, tali da non prospettare ancora l'avvio di protocolli traslazionali nell'uomo.

I ricercatori hanno tratto ispirazione anche dall'importante e recente scoperta che è possibile riprogrammare in vitro cellule somatiche, anche umane, come i fibroblasti della cute e trasformarle in cellule staminali embrionali per poi ricavarne tipi neuronali specifici (cellule staminali indotte pluripotenti, Takahashi e coll., 2006, 2007).

Ancor più rilevante è stata la scoperta della possibilità di trasformare direttamente i fibroblasti in neuroni attraverso un processo di transdifferenziamento (Caiazza e coll., 2011).

Infatti, la conoscenza dei codici molecolari che determinano la produzione di specifici tipi neuronali del midollo spinale e dei centri superiori è molto avanzata e permette non solo di fantasticare, ma anche di cimentarsi con successo in approcci di questo tipo.

Queste strategie sono state in effetti utilizzate con successo per produrre nuovi neuroni da cellule della glia in diverse aree del sistema nervoso centrale sano o danneggiato di modelli animali (Guo e coll., 2013, Niu e coll., 2013; Torper e coll., 2013).

Non è chiaro, però, quanti neuroni possano essere prodotti in questo modo e se la loro produzione in situ riesca a ripristinare funzioni perse a seguito del danno a circuiti specifici.

C'è molta strada da percorrere per escludere o confermare la possibilità di utilizzare fenomeni neurogenici locali per ricostituire porzioni danneggiate del sistema nervoso. Di certo, l'insieme dei dati sperimentali qui sopra brevemente riportati conferma una significativa refrattarietà del tessuto nervoso a integrare nuovi elementi cellulari.

Questa caratteristica trova le proprie basi molecolari nella presenza di segnali inibitori che stabilizzano la struttura del sistema nervoso inibendone le modificazioni accidentali.

Come vedremo più avanti, su questa caratteristica si può pensare di sviluppare una strategia che aiuti il sistema nervoso ad auto-ripararsi dopo un danno.

L'attenzione dedicata alle possibili valenze rigenerative dei fenomeni neurogenici nel sistema nervoso adulto ha lasciato per ora irrisolto il quesito della loro funzione fisiologica.

Numerosi studi condotti sui roditori hanno chiarito che i neuroni neoprodotti non sono destinati a sostituire cellule danneggiate, ma partecipano alla formazione di nuove memorie, alla discriminazione di stimoli sensoriali e alla regolazione del comportamento emotivo e sociale (Braun e Jessberger 2014; Stuchlik A., 2014).

L'introduzione di nuovi neuroni in circuiti specifici (e la loro eliminazione dopo un certo tempo) costituisce quindi una forma di plasticità neurale ben regolata attraverso la quale il cervello svolge funzioni specifiche. Come tale è modulata in maniera molto rigorosa da stimoli esperienziali come la stimolazione sensoriale e l'attività motoria e, a livello molecolare, dai segnali inibitori sopra citati che impediscono cambiamenti aberranti delle circuiterie.

Nel sistema nervoso adulto esistono tutta una serie di meccanismi di controllo che impediscono la perdita di circuiti fondamentali per la sopravvivenza dell'organismo o la formazione di connessioni inutili o dannose tra neuroni.

Gli stessi meccanismi agiscono ancor più fortemente dopo un danno, impedendo la rigenerazione delle fibre e del tessuto nervoso perduto. In questo contesto, essi agiscono come parte di una risposta esclusiva, che cerca cioè di preservare il tessuto sano e di separarlo dal tessuto danneggiato.

Tra le molecole inibitorie, una delle più studiate e potenti è Nogo-A.

Nogo-A venne scoperto alle fine degli anni ottanta del secolo scorso da due ricercatori svizzeri, Martin Schwab e Pico Caroni, come componente della mielina capace di provocare il collasso del cono di crescita (Caroni e Schwab, 1988), che è la struttura che, come una sonda, guida la crescita delle fibre nervose intatte e danneggiate.

Studi successivi condotti su animali intatti mostrarono che Nogo-A stabilizza i circuiti nel sistema nervoso sano e regola in maniera negativa i cambiamenti nella forza e nell'anatomia dei contatti tra i neuroni. Questi ultimi sono infatti consentiti solo quando la forza degli stimoli esperienziali "vince" l'opposizione dei segnali che fanno capo a Nogo-A.

Questi stessi meccanismi frenano anche l'attività delle cellule staminali neurali e la produzione di nuovi neuroni (Rolando e coll., 2012).

Già negli anni novanta (Thallmair e coll., 1998) esperimenti in modelli animali di lesione spinale mostrarono che la neutralizzazione di Nogo-A permette un certo grado di ricrescita delle fibre nervose lese che si associa a un buon recupero delle funzioni locomotorie.

Questi primi esperimenti sono stati seguiti da altre scoperte (come quella del recettore per Nogo-A o di diversi agenti farmacologici neutralizzanti) e da studi che hanno inizialmente creato un po' di confusione (risultati positivi non completamente confermati), ma che nel complesso hanno fornito nuove chiavi di lettura dell'effetto della neutralizzazione di questo segnale.



In particolare, si è chiarito che i processi infiammatori possono interferire con l'azione della neutralizzazione di Nogo-A e che il recupero di funzioni perse a causa delle lesioni (ischemia o lesione midollare) nei modelli animali dipende in buona parte dalla riorganizzazione dei circuiti sani, favorita dall'inibizione di Nogo-A, più che dalla ricrescita delle fibre sezionate (Buffo e coll., 2000, Schwab e Strittmatter, 2014).

Inoltre, si è dimostrato che la crescita di nuove connessioni determina la formazione di nuovi contatti che il sistema nervoso stabilizza solo se sono attivi, cioè utilizzati dall'organismo per servire specifiche funzioni (Pizzorusso e coll., 2002).

Questo spunto ha suggerito che associare la terapia farmacologica anti-Nogo-A a un training riabilitativo potesse potenziare la formazione di nuove connessioni capaci di sostenere il recupero di funzioni perse a seguito di un danno.

In un lavoro pubblicato di recente sulla rivista Science e guidato da Martin Schwab (Wahl e coll., Science, 2014) si dimostra l'efficacia del training riabilitativo se preceduto da una terapia farmacologica che promuova la crescita delle fibre nervose danneggiate (in particolare un trattamento anti Nogo-A).

Gli esperimenti sono stati eseguiti su un modello animale di ischemia cerebrale e hanno l'obiettivo di fornire la prova di principio che il sistema funziona.

In particolare, dopo aver indotto l'ischemia, gli animali sono stati trattati con un anticorpo anti-Nogo-A per due settimane. Un'intensa terapia riabilitativa (gli animali sono stati addestrati a raggiungere il cibo con l'arto anteriore danneggiato) è stata associata al trattamento con anti-Nogo-A sia simultaneamente (in un gruppo di animali) sia sequenzialmente (in un altro gruppo di animali), cioè dopo la terapia con l'agente neutralizzante.

Nel gruppo sottoposto a terapia riabilitativa sequenziale si ha un recupero della funzionalità motoria molto soddisfacente, mentre ciò non avviene se la terapia anticorpale è associata alla terapia riabilitativa in modo simultaneo.

Dal punto di vista neuro-anatomico, le cellule nervose "responsabili" del recupero funzionale si trovano in una regione non lesionata della corteccia.

I risultati dello studio suggeriscono che il recupero funzionale nel "gruppo sequenziale" dipenda da una estensiva e precisa reinnervazione della regione spinale lesionata da parte di fibre che originano dalla zona sana del lato opposto e che poi raggiungono la zona lesionata da riparare.

Questi dati suggeriscono la presenza di un periodo temporale cruciale (periodo critico), durante il quale il sistema danneggiato si trova in una condizione di maggiore reattività, e perciò reagisce favorevolmente alla terapia farmacologica e al training riabilitativo.

Gli interventi terapeutici devono perciò seguire un percorso temporale preciso per massimizzare gli effetti della terapia riabilitativa.

In un primo tempo, la soppressione dell'azione del fattore inibitorio di Nogo-A tramite immunoterapia può ridurre i freni sulla plasticità strutturale indotta dalla lesione attraverso meccanismi che coinvolgono fattori di crescita, modifiche delle proprietà elettriche dei motoneuroni, alterazioni nell'equilibrio energetico

neuronal e reclutamento o formazione di nuovi circuiti che portano a ipereccitabilità e risposte prolungate a stimoli esterni. In analogia con quanto avviene durante lo sviluppo del sistema nervoso, i nuovi circuiti possono essere deboli e imprecisi. La terapia riabilitativa può intervenire a questo punto per aiutare a selezionare e stabilizzare le connessioni che servono a svolgere la funzione esercitata eliminando quelle superflue.

Gli anticorpi anti Nogo-A sono in fase di studio clinico in pazienti con sclerosi laterale amiotrofica, sclerosi multipla e lesioni al midollo spinale (www.clinicaltrials.gov; per informazioni generali: www.christopherreeve.org).

I risultati del trial clinico di fase II sui danni traumatici sono attesi entro breve.

Quest'approccio, dunque, si propone come più avanzato nel percorso verso la terapia rispetto a quelli focalizzati primariamente sulla produzione di nuovi neuroni in situ.

L'attesa di dati che dimostrino che questa possibile "cura" è efficace anche sull'uomo e non solo sui roditori è molta, e riflette le cocenti delusioni portate da molti altri trial clinici che hanno testato soprattutto agenti neuroprotettivi o anti-infiammatori (Filli e coll., 2012).

Ritengo quindi opportuno che anche questi ultimi studi, benché importanti, non siano presentati in maniera miracolistica. Per esempio, una terapia davvero efficace per le lesioni midollari non può non includere la limitazione dei fenomeni degenerativi secondari, il potenziamento della ricrescita delle fibre nervose danneggiate (che l'inibizione di Nogo-A coinvolge solo in parte) e la limitazione dei fenomeni di cavitazione (perdita di tessuto) e di formazione di cicatrici impenetrabili.

Soprattutto sul secondo e terzo aspetto (ricrescita delle fibre e limitazione della cicatrizzazione) la ricerca pre-clinica ha indicato altri interessanti candidati molecolari (per esempio, gli stabilizzatori del citoscheletro, Hellal e coll., 2011) che hanno già iniziato l'iter per approdare agli studi clinici.

Certo, i tempi della ricerca pre-clinica e poi clinica appaiono inconciliabili con le urgenze dei pazienti (per esempio, sfioriamo ormai i 30 anni per lo studio di Nogo-A).

Decisioni non sostenute da chiari risultati positivi, però, possono costituire un rischio molto elevato e portare a danni permanenti.

La complessità del sistema che ci si propone di curare è tale che è del tutto irrealistico aspettarsi soluzioni miracolistiche. Piuttosto, i risultati riportati segnalano già oggi come prioritaria l'esigenza di fare delle attente considerazioni sui i tempi di inizio della riabilitazione in relazione alle terapie farmacologiche già in atto.

In particolare, efficaci sinergie possono essere stabilite valutando le finestre temporali di crescita e plasticità dei circuiti cerebrali, ma anche la vulnerabilità del tessuto nervoso traumatizzato.



BIBLIOGRAFIA

Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, Takebayashi H, Pfrieger FW, Meletis K, Frisén J. (2010) Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell*. 7:470-82.

Braun SM, Jessberger S. (2014) Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. *Development*. 141:1983-6.

Buffo A1, Zagrebelsky M, Huber AB, Skerra A, Schwab ME, Strata P, Rossi F (2000) Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured purkinje cell axons. *J Neurosci*. 22:2275-86.

Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzkova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, Sotnikova TD, Menegon A, Roncaglia P, Colciago G, Russo G, Carninci P, Pezzoli G, Gainetdinov RR, Gustincich S, Dityatev A, Broccoli V. (2011) Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*. 476:224-7.

Caroni P, Schwab ME. (1988) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron*. 1:85-96.

Doetsch F, Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. (1999) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96: 11619-11624, 1999.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 4:1313-7.

Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisén J. (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. 156:1072-83.

Filli L, Schwab ME. (2012) The rocky road to translation in spinal cord repair. *Ann Neurol*. 72:491-501.

Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y, Wang F, Chen G. (2014) In Vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell*. 14:188-202.

Hellal F, Hurtado A, Ruschel J, Flynn KC, Laskowski CJ, Umlauf M, Kapitein LC, Strikis D, Lemmon V, Bixby J, Hoogenraad CC, Bradke F. (2011) Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury. *Science*. 331:928-31.

Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G. (2010) Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One*. 5:e8809.

Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. 2009; 32:149-84.

Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M, Evergren E, Tomilin N, Shupliakov O, Frisén J. (2008) Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol*. 6:e182.

Nishiyama A., Komitova M., Suzuki R., Zhu X. (2009) Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 10: 9-22, 2009.

Niu W, Zang T, Zou Y, Fang S, Smith DK, Bachoo R, Zhang CL. (2013) In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat Cell Biol*. 15:1164-75.

Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 298:1248-51.

Rolando C1, Parolisi R, Boda E, Schwab ME, Rossi F, Buffo A (2012) Distinct roles of Nogo-a and Nogo receptor 1 in the homeostatic regulation of adult neural stem cell function and neuroblast migration. *J Neurosci*. 32:17788-99.

Schwab ME, Strittmatter SM. (2014) Nogo limits neural plasticity and recovery from injury. *Curr Opin Neurobiol*. 27C:53-60.

Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisén J. (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*. 153:1219-27.

Spalding KL, Bhardwaj RD, Buchholz BA, Druid H, Frisén J. (2005) Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell*. 122:133-43.

Stuchlik A. (2014) Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front Behav Neurosci*. ;8:106.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131:861-72.

Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126:663-76.

Thallmair M, Metz GA, Z'Graggen WJ, Raineteau O, Kartje GL, Schwab ME. (1998) Neurite growth inhibitors restrict plasticity and functional recovery following corticospinal tract lesions. *Nat Neurosci*. 1:124-31.

Torper O1, Pfisterer U, Wolf DA, Pereira M, Lau S, Jakobsson J, Björklund A, Grealish S, Parmar M (2013) Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:7038-43.