

## SCLEROSI MULTIPLA

Si tratta di una **malattia autoimmune** cronica che colpisce il sistema nervoso centrale (SNC), ovvero il cervello e il midollo spinale, attraverso

- **Infiammazione** -> che porta alla formazione di lesioni nei tessuti nervosi
- **demielinizzazione** -> che deriva da aggressioni autoimmuni alla guaina mielinica delle fibre nervose
- **degenerazione neuronale** -> che deriva direttamente da stati infiammatori prolungati o attraverso processi patologici secondari.

In questa patologia, il sistema immunitario attacca erroneamente i nervi del cervello e del midollo spinale che sono rivestiti da una guaina protettiva detta Mielina, ovvero una guaina isolante che riveste le fibre nervose (assoni) e che permette la trasmissione veloce ed efficace degli impulsi elettrici tra i neuroni.

Quando questa mielina viene danneggiata (demielinizzazione), la trasmissione del segnale nervoso rallenta o si interrompe completamente e, inoltre, il processo infiammatorio può danneggiare anche gli assoni stessi, portando così ad una perdita neuronale irreversibile.

La demielinizzazione comporta una grande varietà di sintomi neurologici, come:

- Debolezza muscolare o paralisi
- Disturbi visivi
- Formicolii ed Intorpidimento
- Problemi Cognitivi (es. memoria e concentrazione)

La SM viene indicata con **due forme principali** considerate più rilevanti dal punto di vista terapeutico, ovvero:

1. **SM recidivante-remittente** (RRMS) --> È la forma più comune all'inizio. Si alternano periodi di peggioramento (ricadute) a periodi di miglioramento parziale o completo (remissioni).
2. **SM progressiva** (SPMS o PPMS) --> Dopo anni, molti pazienti entrano in una fase detta secondariamente progressiva (SPMS), in cui il peggioramento diventa graduale e costante, anche senza ricadute. Esiste anche una forma chiamata primariamente progressiva (PPMS), in cui la malattia è progressiva fin dall'inizio, senza remissioni.

Gli ATTUALI APPROCCI TERAPEUTICI per la sclerosi multipla comprendono:

- interventi farmacologici che si basano sull'utilizzo di **farmaci immunomodulanti** (che regolano attività del sistema immunitario) e **immunosoppressori** (che bloccano o rallentano l'infiammazione riducendo le ricadute), in modo da orchestrare l'attività del sistema immunitario per ridurre la progressione della SM e migliorare i sintomi
- terapia fisica
- misure riabilitative

tutti volti ad attenuare l'attività della malattia, alleviarne i sintomi e a migliorare il benessere generale del paziente.

Questo tipo di terapia è però **meno efficace nella forma progressiva** della malattia in quanto qui non è l'infiammazione a giocare un ruolo cruciale come avviene in quella recidivante – remittente ma si ha un processo degenerativo continuo, dovuto alla perdita progressiva di mielina e di conseguente danno ai neuroni che portano ad una degenerazione neurale (neurodegenerazione), anche se l'attacco infiammatorio attivo si riduce.

Quindi, essendo che le terapie attuali si concentrano sul modificare la risposta immunitaria per ridurre l'infiammazione ed evitare così danni alla mielina, **NON** esiste una terapia efficace nel caso della SM progressiva che permetta invece di **ripristinarla** o comunque **stimolarne la riparazione**.

La **riparazione insufficiente della mielina** è uno dei principali motivi per cui la malattia continua a progredire, anche se l'infiammazione è controllata.

Inoltre, molte terapie immunomodulanti comportano **effetti collaterali** significativi: come problemi cardiovascolari, danni epatici e alterazioni del sistema immunitario ed essendo le somministrazioni frequenti e complesse (come le iniezioni), risultano essere un problema anche i loro costi.

➔ Nel complesso, le attuali strategie terapeutiche possono fornire un certo sollievo sintomatico, ma sono gravate da diverse limitazioni e difficoltà.

Per ovviare a questi limiti si è alla ricerca di TERAPIE INNOVATIVE e negli ultimi anni le **terapie con le cellule staminali** si sono distinte come una delle aree di maggiore innovazione nella gestione della SM.

Le cellule staminali, caratterizzate dalla loro intrinseca capacità di autorigenerarsi e pluripotenza, sono promettenti per la rigenerazione del tessuto nervoso danneggiato, la modulazione delle risposte immunitarie e la promozione di un ambiente favorevole ai meccanismi di riparazione endogeni.

A differenza delle tradizionali modalità terapeutiche, la terapia con cellule staminali prevede il trapianto di cellule staminali in grado di differenziarsi in diversi tipi di cellule nervose, facilitando così la rigenerazione tissutale.

Inoltre, queste cellule secernono fattori neurotrofici che migliorano la sopravvivenza e la funzionalità del tessuto nervoso adiacente. In particolare, le cellule staminali mostrano effetti immunomodulatori che attenuano i processi infiammatori, offrendo un nuovo approccio per mitigare la progressione delle lesioni della SM.

Sono stati esplorati diversi tipi di cellule staminali per il loro potenziale terapeutico:

**CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE (HSCs)** → Risiedono principalmente nel midollo osseo e possiedono la capacità di differenziarsi in vari tipi di cellule del sangue, inclusi eritrociti, leucociti e piastrine.

Esistono due trapianti delle HSC:

- Trapianto **autologo** (aHSCT) quando si usano le cellule del paziente stesso (preferito per il trattamento delle malattie mediate dal sistema immunitario poiché comporta un rischio di mortalità inferiore).
- Trapianto **allogeneico** (allo-HSCT) quando si usano le cellule di un donatore

Trapiantando HSC è possibile:

- ripristinare o riparare sistemi immunitari danneggiati, ripristinando così la normale funzione immunitaria
- modulare l'attività del sistema immunitario
- attenuare le risposte infiammatorie, quindi proteggere i tessuti neurali danneggiati

Hanno un limitato potenziale neurogenico che rende complessa la loro differenziazione in linee neuronali e gliali.

**CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSCs)** → Sono presenti in diversi tessuti biologici come il midollo osseo, il tessuto adiposo e la placenta ed hanno il potenziale per l'auto-rinnovamento e la differenziazione in cellule mesodermiche tra cui osteoblasti, adipociti e condrociti.

Hanno dimostrato che le BM-MSC (cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo) fungono da terapia cellulare efficace per il trattamento dell'infiammazione del sistema nervoso centrale (SNC) e delle malattie neurodegenerative in quanto esse:

- possiedono proprietà antinfiammatorie
- promuovono la differenziazione delle cellule staminali neurali
- stimolano la rigenerazione nelle aree danneggiate del SNC

questi effetti benefici sono probabilmente mediati da meccanismi di segnalazione paracrina e dalla migrazione mirata verso il tessuto neurale danneggiato.

La loro minore efficienza nel differenziarsi in specifici tipi di cellule neurali ne limita l'applicazione nella riparazione neurale (per questo i ricercatori stanno cercando di migliorare l'efficienza del differenziamento delle MSC in cellule neurali, ottimizzando le condizioni di coltura e controllando i percorsi di differenziazione).

**CELLULE STAMINALI NEURALI (NSCs)** → sono cellule pluripotenti, cioè possono trasformarsi in tre tipi fondamentali di cellule del sistema nervoso:

- neuroni (che trasmettono segnali),
- astrociti (che supportano e nutrono i neuroni),
- oligodendrociti (che formano la mielina)

il che le posiziona come substrato cellulare ottimale per terapie orientate alla neurologia.

Hanno capacità di:

- secrezione di fattori neurotrofici
- differenziazione in cellule neurali e gliali

consentendo così la neurogenesi e il ripristino dei territori danneggiati del SNC.

Inoltre, le NSC hanno dimostrato una propensione a migrare verso regioni demielinizzate infiammate del SNC (e trasformarsi in oligodendrociti per aiutare a ripristinare la mielina).

Il loro fattore limitante critico è la limitata riserva di esse presente naturalmente nel cervello, e per questo non bastano per rigenerare o riparare in modo efficaci i danni.

Per ovviare a questo problema, i progressi nella tecnologia stanno svelando dei percorsi per ottenere le NSC da cellule staminali embrionali e pluripotenti indotte.

**CELLULE STAMINALI EMBRIONALI (ESCs)** → Le cellule staminali embrionali (ESCs) sono cellule pluripotenti ottenute dalla massa interna dell'embrione allo stadio di blastocisti (circa 5 giorni dopo la fecondazione), sono in grado di auto rinnovarsi e di differenziarsi in qualsiasi tipo cellulare, inclusi i neuroni.

Oggi vengono coltivate in laboratorio con tecniche che permettono di mantenerle indifferenziate (cioè in stato staminale), oppure di guidarle a differenziarsi in specifici tipi cellulari. Le hESCs (quelle Umane) sono molto promettenti per curare malattie del sistema nervoso (come la sclerosi multipla) perché:

- possono essere guidate in laboratorio a diventare neuroni,
- si integrano nel tessuto nervoso dopo il trapianto,
- favoriscono la rigenerazione e la riparazione delle lesioni, ad esempio nel midollo spinale.

**CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE (iPSC)** → Le iPSC sono ingegnerizzate a partire da cellule somatiche adulte per acquisire una pluripotenza simile alle cellule staminali embrionali: attraverso l'introduzione di 4 fattori di trascrizione (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) le cellule mature come fibroblasti o cellule ematopoietiche vengono riprogrammate in uno stato pluripotente.

Le iPSC mostrano promettenti capacità neuroprotettive e rigenerative.

Così come le ESC, essendo pluripotenti e potendosi perciò differenziare in qualsiasi tipo di cellula, se questa potenzialità non viene controllata può accadere che le cellule:

- si differenziano in modo aberrante (in modo anomalo, scorretto o non previsto)
- formano dei teratomi (tumori)

Le cellule staminali utilizzate nelle terapie per malattie neurodegenerative come la sclerosi multipla possono essere suddivise in base alla loro capacità di differenziarsi in cellule del sistema nervoso. Le cellule staminali neurali (NSCs), le cellule staminali embrionali (ESCs) e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) hanno un **potenziale diretto di differenziarsi in neuroni, astrociti e oligodendrociti**, rendendole promettenti **per la rigenerazione** del sistema nervoso. Le cellule staminali mesenchimali (MSCs), pur avendo un potenziale limitato di differenziarsi in cellule neuronali, sono particolarmente utili grazie alle loro **proprietà immunomodulanti e anti-infiammatorie**, che possono **ridurre il danno neurale derivante dall'infiammazione**. Le cellule staminali ematopoietiche (HSCs), pur non essendo neurogeniche, svolgono un ruolo fondamentale nell'**influenzare il microambiente immunitario e proteggere i tessuti nervosi danneggiati**. In sintesi, mentre alcune cellule staminali promuovono direttamente la rigenerazione neurale, altre agiscono indirettamente proteggendo i neuroni attraverso il rafforzamento dell'ambiente immunitario e neuroprotettivo.

Le cellule staminali dimostrano un'efficacia **neuroprotettiva** attraverso la secrezione di fattori di crescita e molecole bioattive, che contribuiscono alla riduzione delle risposte infiammatorie, alla riduzione dello stress ossidativo nelle cellule neuronali e alla riparazione delle lesioni del midollo spinale.

Il trapianto di queste cellule prevede:

- la raccolta di cellule staminali ematopoietiche
- preparazione del paziente e successivo trapianto delle cellule staminali
- terapia immunosoppressiva ad alto dosaggio per ridurre l'attività del sistema immunitario nei pazienti (per creare ambiente più favorevole al trapianto).

## TRAPIANTO DI NCSS IN PAZIENTI CON SM PROGRESSIVA (STEMS)

Si tratta di uno studio clinico di FASE 1 ('first-in-human', prima fase di sperimentazione sull'uomo di un farmaco o terapia cellulare) in cui lo scopo è quindi quello di valutare la SICUREZZA della terapia cellulare.

E' stato condotto presso l'istituto scientifico San Raffaele di Milano per valutare appunto la fattibilità, sicurezza e tollerabilità di un trapianto intratecale (direttamente nel liquido cerebrospinale) di cellule progenitrici neurali fetali umane (hfNPCs) in 12 pazienti con PMS (sclerosi multipla progressiva).

**L'obiettivo primario dello studio era valutare la fattibilità, sicurezza e tollerabilità della somministrazione intratecale di hfNPC in pazienti con PMS.**

### COSA SONO E PERCHE' VENGONO UTILIZZATE

Le cellule progenitrici neurali sono progenitori derivati dalle NSC (cellule staminali neurali) che possono poi differenziarsi nei tre tipi fondamentali di cellule del sistema nervoso: Neuroni, Astroцити ed Oligodendrociti.

Tra le cellule staminali sono state scelte queste in particolare perché:

- Esse derivano da un tessuto neurale fetale umano e sono in grado di mantenere **un'identità neurale stabile** durante l'espansione in vitro (questo le rende più affidabili e prevedibili rispetto, ad esempio, a cellule staminali mesenchimali (MSCs) o a cellule pluripotenti indotte (iPSCs), che potrebbero invece differenziare in modi meno controllabili e perdere identità neurale oppure differenziare in modo eterogeneo).
- Sono **già state utilizzate** in modelli animali (modelli murini) e hanno mostrato che le hfNPC **modulano la risposta infiammatoria** e favoriscono la **neuroprotezione**

### ORIGINE DELLE CELLULE

Le hfNPCs utilizzate in questo studio sono state ottenute da una singola corteccia cerebrale (telencefalo e diencefalo) di un feto umano di 10-12 settimane di gestazione, a seguito di una interruzione volontaria di gravidanza.

Dopo che il sangue materno è stato testato per escludere la presenza di eventuali infezioni (come HIV, epatiti, sifilide),

- il tessuto cerebrale è stato tagliato e trattato con **enzimi proteolitici** (Trypsina) per separare le cellule
- le cellule sono state coltivate in un terreno di crescita con fattori di crescita per stimolare la loro proliferazione
- dopo 15-25 giorni le cellule cresciute sono state raccolte e **ricoltivate** e questo passaggio di coltura è stato ripetuto ogni 10-15 giorni.

Queste cellule erano già state testate in precedenza su topi.

### CARATTERISTICHE PAZIENTI

I pazienti partecipanti allo studio erano di età compresa tra i 18 e i 55 anni, con una durata media della malattia di 14 anni e un punteggio EDSS medio di 7.25.

[**EDSS** = expanded disability status scale, è una scala utilizzata per **quantificare il grado di disabilità** nei pazienti con sclerosi multipla. Questa scala va da 0 (nessuna disabilità) a 10 (morte per SM), con incrementi di 0.5), quindi un punteggio EDSS più alto indica un livello di disabilità maggiore].

Nella tabella Caratteristiche basali dei pazienti.

### STUDY DESIGN

Dopo che i partecipanti hanno fornito il consenso scritto:

1. sono stati suddivisi in **quattro coorti di trattamento (TC)** e ù
2. sono stati sottoposti ad un **controllo basale** per raccogliere dati comparativi (tramite esami come: esami neurologici completi, Risonanza magnetica, puntura lombare per analizzare 10 ml di liquido cerebrospinale ed esami del sangue)
3. a cui è seguita una **somministrazione** endovenosa **per premedicazione** di 'Metilprednisolone', un derivato del cortisone che permette di ridurre le reazioni allergiche gravi ed immediate (come lo shock anafilattico) per ridurre possibili reazioni di ipersensibilità di tipo I.
4. Successivamente è stata sottoposta una **singola somministrazione intratecale** (dove circola direttamente il CSF, in questo caso tramite iniezione lombare) di hfNPCs, sospese in 10 ml di mezzo di iniezione (una soluzione fisiologica contenente lo 0,028% di albumina sierica umana) con **dosaggi crescenti** (la definizione delle dosi si è basata su studi preclinici condotti su roditori e primati non umani).

Dopo l'infusione, i pazienti sono stati mantenuti in posizione di Trendelenburg per 30 minuti e monitorati per 24 ore (posizione sdraiata con testa più in basso rispetto al bacino, sollevando le gambe).

5. Mentre, per prevenire un rigetto imprevisto delle hfNPC, nonostante la loro relativamente bassa immunogenicità, i pazienti hanno ricevuto una **terapia immunosoppressiva**, a partire da 7 giorni prima del trapianto fino alla settimana 96.
6. A 3 mesi dal trapianto è stata fatta un **analisi comparativa del CSF** al basale e a 3 mesi dal trapianto per poter osservare se ci sono stati segnali biologici di cambiamento.

7. Sono state poi eseguite diverse altre **analisi multimodali** (analisi con metodi differenti) come visite neurologiche, valutazione dei sintomi, risonanze magnetiche ecc. per monitorare la **sopravvivenza** delle cellule trapiantate, i **cambiamenti nello stato neurologico** del paziente ed eventuali **eventi avversi** (AE).  
Per un totale di **22 follow up** nell'arco di **96 settimane** (2 anni).

Essendo uno studio clinico di fase 1 si è utilizzato il **protocollo** più classico **3+3**, che serve per capire quanto una nuova terapia è tollerabile in termini di sicurezza:

1. Si parte con 3 pazienti nella prima coorte (es. TC-A).
2. Ogni paziente viene monitorato per almeno 14 giorni per vedere se ha effetti collaterali gravi, chiamati DLT (Dose-Limiting Toxicity = tossicità che limita la dose).
3. Se nessuno dei 3 pazienti ha una DLT → si passa alla coorte successiva con una dose più alta dopo 3 mesi.
4. Se 1 solo paziente su 3 ha una DLT → si aggiungono altri 3 pazienti alla stessa coorte (arrivando a 6 pazienti).
  - Se solo 1 su 6 ha una DLT → si può ancora andare avanti con la dose più alta.
  - Se 2 o più su 6 hanno DLT → quella dose è troppo alta, quindi si torna alla dose precedente, che viene considerata la massima dose tollerata.

#### ENDPOINT PRIMARIO DI SICUREZZA

L'endpoint primario di sicurezza, quindi i risultati legati all'obiettivo principale legato alla valutazione della SICUREZZA del trattamento, è stato valutato con statistiche descrittive, riportando **il numero e la gravità degli AE** all'interno di ciascuna coorte, mostrando in generale che le procedure dello studio sono state ben tollerate, senza particolari complicazioni procedurali acute rilevanti.

**Non sono state rilevate differenze significative** negli eventi avversi (AEs) **tra le varie coorti di trattamento** TC (vedi Tabella 2) e **non** sono stati segnalati **eventi avversi dose-limitanti** (DLTs)

Tutti gli eventi avversi a breve (entro 24 ore) e a medio termine (entro 14 giorni) riportati sono stati lievi, in particolare mal di testa transitorio e rigidità muscolare al collo, correlati probabilmente alla procedura dello studio e quindi alla puntura lombare, data la stretta correlazione temporale.

**Non** sono stati riportati **eventi avversi (AE) di grado 3** o superiore possibilmente correlati alla procedura, fatta eccezione per un caso di **ricaduta di sclerosi multipla** definita come evento avverso grave (SAE), a causa del **peggioramento** (seppur transitorio) **del punteggio EDSS** (EDSS da 6,5 a 7,5), anche se era atteso (in base alla storia clinica del paziente) e non correlato al trattamento.

Ad oggi, ad almeno 3 anni dall'ultimo paziente trattato, la sopravvivenza dei pazienti è del 100%.

#### ENDPOINT SECONDARIO

##### **Risultati neurologici e neurofisiologici**

Sebbene questo studio sia stato progettato per valutare la sicurezza e la tollerabilità del trapianto, sono stati raccolti comunque dei **dati preliminari per la fase 2** che si occupa invece di valutare **l'efficacia del trattamento**, oltre a monitorare la **sicurezza a lungo termine**.

Nel gruppo di pazienti è stato osservato una **TENDENZA AL RALLENTAMENTO** del tasso medio di variazione dell'EDSS (la sua pendenza) tra i 4 anni precedenti al trapianto e nei 2 anni successivi.

Nel grafico abbiamo:

- Asse y: punteggio EDSS (+ alto = maggiore disabilità)
- Asse x: tempi in anni, con lo 0 che rappresenta il momento del trapianto
- Ogni colore rappresenta probabilmente un paziente diverso o un gruppo di dati raccolti in un certo anno
- La linea nera rappresenta la variazione MEDIA di EDSS nel tempo (cioè la 'pendenza')

Il grafico mostra che **prima del trapianto** la disabilità aumentava a un certo ritmo (+0.24 punti/anno), mentre **dopo** il trapianto l'aumento di EDSS è stato un po' più lento (+0.13 punti/anno), ma la **differenza non è statisticamente significativa** ( $p = 0.23$ ).

Questo suggerisce una **tendenza al rallentamento** della progressione della disabilità, ma **non abbastanza forte** da poter essere considerata certa con i dati disponibili.

[Se fosse stata  $p < 0.05$ , avremmo potuto dire con un alto grado di confidenza che la riduzione della progressione dell'EDSS dopo il trapianto non è dovuta al caso, ma è probabilmente legata all'effetto del trattamento].

##### **Valutazione MRI**

Durante il follow up di 2 anni, è stata utilizzata la risonanza magnetica strutturale (MRI) per monitorare i cambiamenti nel volume cerebrale dei pazienti ed è stato osservato che:

**sei pazienti (50%)** hanno **sviluppato nuove lesioni cerebrali** in T2, anche se quantità di hfNPC iniettate non è risultato correlato al numero o al volume di queste nuove lesioni cerebrali in T2\*.

Inoltre, le misurazioni del volume cerebrale totale e della sostanza grigia (GM) tramite MRI rappresentano dei biomarcatori di neurogenerazione nei pazienti con sclerosi multipla e, solitamente, la degenerazione e la conseguenza atrofia della GM sono più pronunciate nelle fasi avanzate della malattia e strettamente associate al peggioramento di questa, mentre i risultati ottenuti dalle analisi hanno mostrato una correlazione statisticamente significativa tra la percentuale di variazione annuale del volume cerebrale e della GM ed il numero di hfNPC iniettate: si osserva che i pazienti che hanno ricevuto **dosi più elevate** di cellule staminali hanno sperimentato una **minore perdita di volume cerebrale**. In particolare, si è osservata una riduzione significativa dell'atrofia sia nella materia grigia (che contiene i corpi cellulari dei neuroni) sia, in misura minore, nella materia bianca (che contiene le connessioni tra i neuroni). Però, l'atrofia cerebrale è un processo cronico, e le variazioni a 2 anni (un tipico follow-up negli studi clinici sulla PMS) potrebbero non essere sufficienti per valutare correttamente un fenomeno così lento anche se, comunque, la riduzione dell'atrofia cerebrale nei pazienti trattati con hfNPC **suggerisce** che queste cellule potrebbero avere un effetto **neuroprotettivo**.

Le cellule staminali neurali infatti, una volta trapiantate, **potrebbero rilasciare sostanze che proteggono i neuroni esistenti e promuovere la riparazione dei tessuti danneggiati**.

Questo **effetto** sembra essere **dose-dipendente**, cioè più cellule vengono trapiantate, maggiore è la protezione osservata.

### **Analisi CSF**

Confrontando invece le analisi immunologiche e proteomiche del CSF (liquido cerebrospinale) tra il basale e dopo 3 mesi dal trapianto, è stato riscontrato un **aumento dei livelli di proteine** capaci di **favorire un rimodellamento neuroprotettivo** del microambiente del sistema nervoso centrale:

- aumentata espressione (**sovra-regolazione**) di alcuni **fattori trofici** → ovvero l'organismo sta producendo più sostanze che aiutano le cellule a sopravvivere, crescere e funzionare correttamente. Si tratta infatti di sostanze naturali, come proteine od ormoni, che supportano la salute dei neuroni e la formazione di nuove connessioni. Un loro aumento può indicare che il corpo sta cercando di riparare un danno e c'è un tentativo di rigenerare tessuti o cellule.
  - **GFNF**: è un fattore neurotrofico che favorisce la sopravvivenza, la crescita e la differenziazione di specifiche popolazioni neuronali
  - **VEGF-C**: converte le cellule staminali neurali quiescenti in cellule progenitrici, stimolando la neurogenesi
  - **SCF**: contribuisce al mantenimento e alla proliferazione delle cellule staminali.
- aumentata espressione (**sovra-regolazione**) di **molecole immuno-correlate** → sono proteine o segnali coinvolti nella regolazione dell'attività del sistema immunitario. Aiutano quindi il sistema immunitario a funzionare correttamente, aiutandolo a distinguere ciò che è pericoloso da quello che non lo è ed agire di conseguenza.
  - Ligando FAS: coinvolto nell'eliminazione selettiva di cellule immunitarie potenzialmente dannose
  - IL-10: una citochina anti-infiammatoria, che può aiutare a ridurre l'infiammazione nel sistema nervoso
- **riduzione** (downregulation) di alcune **chemochine pro-infiammatorie**, come IL-8 → sono delle proteine prodotte dalle cellule in risposta ad un danno o ad un'infezione, con lo scopo di richiamare le cellule immunitarie nel sito dell'infiammazione.

Sebbene non si possa escludere che i risultati siano stati influenzati dai trattamenti immunomodulatori concomitanti, si può ipotizzare che le hfNPC trapiantate abbiano esercitato un ruolo neuroprotettivo.

Abbiamo inoltre riscontrato

- un'aumentata espressione (**sovra-regolazione**) di **citochine** che, sebbene siano molecole di natura pro-infiammatoria, è stato dimostrato che possono anche esercitare funzioni pro-rigenerative:
  - IL-15: regola la proliferazione e differenziazione delle cellule staminali neurali (NPC), e la sua carenza porta a una ridotta generazione di neuroblasti nell'asse tra la zona subventricolare (SVZ) e il flusso migratorio rostrale.
  - GM-CSF: ha un'attività neurotrofica (supporta la sopravvivenza, la crescita e il differenziamento dei neuroni) e neurogenica (stimola la formazione di nuovi neuroni), in quanto inibisce l'apoptosi sia delle NPC che dei neuroni.

Sebbene non si possa escludere che l'aumento di questi non sia semplicemente dovuto a

- una risposta infiammatoria, a causa dell'evoluzione naturale della malattia essendo questa basata proprio una componente infiammatoria di base
- una risposta al trapianto stesso
- trattamenti immunomodulatori concomitanti

si può ipotizzare che le hfNPC trapiantate abbiano esercitato un ruolo neuroprotettivo.

In cinque pazienti (001, 007, 011, 012 e 013) è stato inoltre possibile estrarre, dai campioni di CSF raccolti 3 mesi dopo il trattamento, una quantità sufficiente di DNA genomico che ha permesso di eseguire **l'analisi del microchimerismo** (= presenza di un piccolo numero di cellule geneticamente diverse da quelle dell'organismo ospite): **in UNO di questi 5 pazienti (012), è stata rilevata la presenza di cellule derivanti dal donatore**, pari allo 0,68% del materiale analizzato (vedi Fig. 2 nei dati estesi).

Questo potrebbe dimostrare che le **cellule possono mantenere la loro vitalità ed esercitare un effetto paracrino\*** (bystander effect) anche a mesi di distanza dal trapianto.

Tuttavia, non è possibile fare **ipotesi sulla durata** della loro vitalità poiché il disegno dello studio (con pochi timepoint e senza un follow-up a lungo termine) non ha permesso di raccogliere campioni di liquido cerebrospinale oltre i 3 mesi dal trapianto. Inoltre, il risultato positivo del test di microchimerismo in un paziente – uno dei tre che hanno ricevuto la dose più alta di cellule – sebbene interessante, ha solo un valore descrittivo e potrebbe rappresentare uno spunto per studi futuri.

In conclusione, lo studio ha dimostrato che la terapia con cellule progenitrici neurali fetali umane (hfNPC) nella sclerosi multipla progressiva (PMS) è FATTIBILE, SICURA e BEN TOLLERATA.

I risultati preliminari ed esplorativi sulle variazioni del volume cerebrale e del liquido cerebrospinale (CSF) giustificano la realizzazione di studi clinici futuri con la dose più alta di cellule su una coorte più ampia di pazienti.

Resta da chiarire se il trapianto di hfNPC possa avere un effetto paracrino\* duraturo nell'uomo, in grado di influenzare l'andamento clinico della fase progressiva della sclerosi multipla.

\*La MRI è una tecnica che **usa campi magnetici e onde radio** per ottenere **immagini dettagliate del corpo**.

Nella risonanza magnetica ci sono **diverse "sequenze" di immagini**, tra cui una si chiama **T2**.

Le **lesioni T2** sono **macchie bianche** che si vedono nella sequenza T2 ed indicano delle **aree danneggiate** o infiammate nel cervello o nel midollo spinale che nella SM sono legate a **perdita di mielina o infiammazione**.

\*con effetto PARACRINO si intende che le cellule rilasciano delle molecole segnale (come fattori trofici, citochine, chemochine ecc) che non agiscono direttamente sulla cellula che le ha prodotte ma sulle cellule vicine.

Questo effetto paracrino indica che se anche le cellule trapiantate non si integrano totalmente nel tessuto nervoso e non possono sostituire direttamente le cellule danneggiate, possono influenzare positivamente l'ambiente locale:

- modulando la risposta immunitaria (quindi riducendo l'infiammazione)
- stimolando la sopravvivenza e la riparazione delle cellule nervose
- promuovendo la rigenerazione del tessuto nervoso danneggiato tramite il rilascio di fattori neuroprotettivi e pro-rigenerativi

Le cellule e le strutture coinvolte nella rigenerazione sono:

- oligodendrociti, le cellule che producono mielina
- neuroni
- barriera emato-encefalica (BBB), in quanto alcuni segnali paracrini aiutano a stabilizzare e riparare la barriera danneggiata dalla malattia.