

MEDICINA RIGENERATIVA MARALDI  
TERAPIA STEM CELL NELLA SCLEROSI MULTIPLA

### 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, demielinizzazione e degenerazione neuronale**.

In questa patologia, il sistema immunitario attacca erroneamente alcune parti del cervello e del midollo spinale: i nervi del cervello e nel midollo sono rivestiti da una guaina protettiva chiamata Mielina, ovvero la guaina isolante che riveste le fibre nervose (gli assoni) e 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 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.

### COSA COMPORTA

Questo provoca una grande varietà di sintomi neurologici, come:

- Debolezza muscolare o paralisi
- Disturbi visivi
- Intorpidimento/formicolii
- Problemi cognitivi (memoria, concentrazione)

### TERAPIE ATTUALI

Le terapie attuali per la SM si suddividono in base alla tipologia:

- Nella *forma recidivante-remissiva* (+ comune) si utilizzano dei **farmaci immunomodulanti** (che regolano attività del sistema immunitario) e **immunosoppressori** che bloccano o rallentano l'infiammazione riducendo le ricadute
- Nella *forma progressiva* invece l'infiammazione diminuisce nel tempo ma il danno neurologico continua in modo lento e costante (questo perché una volta che la mielina è danneggiata, il SN non riesce più a ripararla efficacemente, il che porta alla morte dei neuroni stessi\*) e le cellule degenerano senza infiammazione attiva. In questo caso, i farmaci usati nella forma recidivante funzionano poco o per nulla, in quanto agiscono sul sistema immunitario ma non rigenerano il tessuto nervoso danneggiato e per questo non riescono a bloccare del tutto la progressione della disabilità.

\* La disfunzione nella riparazione e nel recupero delle cellule nervose, quindi, è uno dei motivi principali per cui la malattia continua a progredire, anche in assenza di infiammazione attiva.

In sostanza, anche se inizialmente l'infiammazione gioca un ruolo chiave, nella fase progressiva della SM, la mancanza di riparazione della mielina e i danni diretti ai neuroni diventano i principali fattori che portano alla progressione della malattia.

### LIMITI TERAPIE

#### EFFICACIA LIMITATA NELLE FORME PROGRESSIVE:

Questi farmaci risultano essere efficaci principalmente nelle fasi di SM recidivante-remissiva, ovvero dove l'infiammazione gioca un ruolo cruciale. Nella forma progressiva invece l'attacco infiammatorio attivo si riduce ma si ha un processo degenerativo continuo, dovuto alla perdita progressiva di mielina e di conseguenza ai danni ai neuroni che portano ad una degenerazione neurale (neurodegenerazione) (non più controllata dall'infiammazione).

Questo perché anche senza infiammazione acuta i neuroni continuano a morire lentamente.

### LIMITATA CAPACITA' DI RIPARARE LA MIELINA

Le attuali terapie si concentrano principalmente sul modificare la risposta immunitaria per ridurre l'infiammazione e prevenire danni alla mielina. Tuttavia, una volta che la mielina è stata danneggiata, non esiste una terapia efficace in grado di ripristinarla o stimolare 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.

### EFFETTI COLLATERALI E TOLLERABILITÀ'

Molte terapie immunomodulanti comportano effetti collaterali significativi, che possono includere disturbi gastrointestinali, infezioni, alterazioni del sistema immunitario, problemi cardiovascolari e danni epatici. Questi effetti possono limitare l'uso di alcune terapie a lungo termine.

Alcuni farmaci richiedono monitoraggi regolari per evitare danni agli organi o immunosoppressione eccessiva.

#### SOMMINISTRAZIONE COMPLESSA E COSTOSA

Molte terapie per la SM richiedono somministrazioni frequenti o iniezioni. Alcuni farmaci devono essere somministrati tramite infusione endovenosa o iniezioni settimanali/mensili, il che può essere impegnativo per i pazienti.

I costi elevati dei farmaci sono un altro problema significativo, in particolare per i pazienti che necessitano di trattamenti a lungo termine.

#### RICERCA DI NUOVE TERAPIE – terapie con cellule staminali

L'esplorazione di trattamenti innovativi come le terapie con cellule staminali rappresenta una prospettiva promettente per una gestione più efficace della sclerosi multipla.

Negli ultimi anni, le terapie cellulari si sono distinte come una delle aree di maggiore innovazione nella gestione della sclerosi multipla. Diversi tipi di cellule staminali sono stati esplorati per il loro potenziale terapeutico nella SM

- **Cellule staminali ematopoietiche (HSCs)** → Le cellule staminali ematopoietiche (HSC) risiedono principalmente nel midollo osseo e hanno la capacità di differenziarsi in vari tipi di cellule del sangue, come eritrociti, leucociti e piastrine. Nella pratica clinica, il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) viene utilizzato con successo per ripristinare o riparare sistemi immunitari danneggiati, restituendo una normale funzione immunitaria.

Esistono due tipi di trapianti delle HSC:

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

Nonostante i tentativi iniziali di utilizzare le cellule staminali ematopoietiche derivate dal midollo osseo per trattare disturbi neurologici, i risultati sono stati insoddisfacenti a causa della limitata capacità neurogenica di queste cellule, che rende complessa la loro differenziazione in neuroni e glia. Negli ultimi anni, c'è stato un rinnovato interesse per il ruolo immunomodulatore delle HSC nel trattamento dei disturbi neurologici.

Trapiantando HSC sane per modulare l'attività del sistema immunitario e attenuare le risposte infiammatorie, è possibile proteggere i tessuti cerebrali danneggiati dall'infiammazione mediata dal sistema immunitario. Questo approccio amplia le applicazioni delle HSC in neurologia, offrendo nuove opportunità per il trattamento di disturbi neurologici.

- **Cellule staminali mesenchimali (MSCs)** → si trovano in molti tessuti del corpo umano, come il midollo osseo, il tessuto adiposo e la placenta. Hanno la capacità di autorinnovarsi e di differenziarsi in diversi tipi di cellule del mesoderma, come osteoblasti (cellule ossee), adipociti (cellule del grasso) e condrocyti (cellule della cartilagine). Mostrano un grande potenziale rigenerativo, rendendole promettenti per molte terapie.

In particolare, le BM-MSCs (quelle del midollo osseo) sono tra le più studiate e hanno dimostrato di essere efficaci nel trattamento di infiammazioni del sistema nervoso centrale e di malattie neurodegenerative. Perché queste cellule:

- Riducono l'infiammazione
- Stimolano le cellule staminali nervose a differenziarsi
- Favoriscono la rigenerazione delle aree danneggiate del cervello o del midollo spinale

Tuttavia, un limite importante delle MSC è che non si trasformano facilmente in veri neuroni o cellule gliali, il che rende più difficile usarle per riparare direttamente i tessuti nervosi. Per questo, i ricercatori stanno cercando modi per migliorare la loro capacità di trasformarsi in cellule nervose, modificando le condizioni di coltura e guidando meglio il processo di differenziamento.

- **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),
- oligodendrocyti (che formano la mielina).

Grazie a questa capacità, le NSCs sono considerate ottime candidate per le terapie neurologiche.

Nel cervello umano, si trovano in due aree specifiche:

- la zona subventricolare (SVZ), vicino ai ventricoli laterali,
- la zona subgranulare (SGZ) dell'ippocampo.

Queste cellule non solo possono trasformarsi in cellule nervose, ma producono anche fattori trofici, sostanze che favoriscono la rigenerazione del sistema nervoso. Inoltre, Le NSCs hanno dimostrato di migrare spontaneamente verso le aree infiammate o demielinizzate del cervello (come nella sclerosi multipla) e trasformarsi in oligodendrociti per aiutare a ripristinare la mielina.

Un grande limite è che nel corpo umano ci sono pochissime NSCs disponibili, quindi non basta usarle dallo stesso paziente (trapianto autologo). Per questo si sta studiando il trapianto da donatori (allogenico).

Le NSCs allogeniche possono derivare:

- da feti umani (cervello o midollo spinale) ottenuti da interruzioni volontarie di gravidanza → ma questo solleva questioni etiche e religiose;
- dal liquido cerebrospinale di neonati con emorragie cerebrali o malformazioni del tubo neurale → in questo caso non ci sono problemi etici, perché si tratta di materiali che verrebbero comunque scartati;
- da biopsie o autopsie di tessuto cerebrale umano (adulto o fetale).

Infine, la ricerca sta sviluppando tecnologie per ottenere NSCs da cellule staminali pluripotenti, come: cellule staminali embrionali (ESCs) o cellule staminali indotte (iPSCs), cioè cellule adulte "riprogrammate" per diventare simili a quelle embrionali.

- **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). Hanno due caratteristiche fondamentali: capacità di autorinnovarsi all'infinito (cioè si possono moltiplicare senza differenziarsi) e capacità di trasformarsi in qualsiasi tipo di cellula del corpo umano, comprese cellule nervose, cardiache, epatiche, ecc.

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)** → sono cellule staminali ottenute riprogrammando cellule adulte (come fibroblasti o cellule del sangue) affinché ritornino a uno stato simile a quello delle cellule staminali embrionali, cioè pluripotente.
  - Possono differenziarsi in qualsiasi tipo cellulare, come le ESCs.
  - Sono ottenute da cellule del paziente stesso (es. pelle, sangue, urina), quindi ridotto rischio di rigetto immunitario.
  - Non derivano da embrioni → nessun problema etico

Possono essere utilizzate per riparare tessuti nervosi danneggiati, favorire la rigenerazione degli assoni e la migrazione di cellule gliali, ridurre l'infiammazione e proteggere i neuroni.

Immagine schema: Potenziale terapeutico delle cellule staminali nella sclerosi multipla.

Il diagramma schematico riassume in modo chiaro il potenziale terapeutico delle cellule staminali nella sclerosi multipla. Illustra le principali fonti dei diversi tipi di cellule staminali e i tre principali meccanismi attraverso cui esse esercitano i loro effetti terapeutici nel trattamento della SM: la differenziazione in vari tipi di cellule nervose, la secrezione di fattori trofici e l'immunomodulazione. Questo schema sottolinea come la terapia con cellule staminali rappresenti una strategia terapeutica promettente per la cura della sclerosi multipla.

- 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 hematopoietiche (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.

#### DETTAGLI DELLO STUDIO

- Trial clinico STEMS
- Condotto presso Istituto scientifico san Raffaele di Milano

- Studio iniziato tra Maggio 2017 e Maggio 2019 e concluso in Giugno 2021 (ultimo paziente visitato)
- ha valutato la sicurezza e la tollerabilità del trapianto intratecale di cellule progenitrici neurali fetal umane (hfNPCs) in pazienti con sclerosi multipla progressiva (PMS).
- ha coinvolto 12 pazienti di età compresa tra 18 e 55 anni e una durata della malattia tra 2 e 20 anni
- Le hfNPCs utilizzate derivavano dal telencefalo e diencefalo di un singolo feto umano di 10–12 settimane post-concezione, ottenute dopo interruzione volontaria di gravidanza. Le cellule sono state espansse in vitro secondo le normative GMP\* e sottoposte a rigorosi controlli di qualità.
- I pazienti sono stati suddivisi in quattro coorti di trattamento, ricevendo una singola somministrazione intratecale di hfNPCs con dosaggi crescenti
- Per prevenire reazioni immunitarie, i partecipanti hanno ricevuto un trattamento di immunosoppressione
- Il follow-up ha incluso 22 visite nell'arco di 96 settimane per monitorare la sicurezza, la sopravvivenza delle cellule trapiantate e i cambiamenti neurologici.
- I risultati hanno mostrato che il trattamento con hfNPCs è stato ben tollerato, senza eventi avversi gravi correlati alle cellule trapiantate. Analisi esplorative hanno evidenziato una riduzione del tasso di atrofia cerebrale nei pazienti che hanno ricevuto il dosaggio più elevato di hfNPCs, insieme a un aumento dei livelli di molecole anti-infiammatorie e neuroprotettive nel liquido cerebrospinale.
- Questi risultati preliminari supportano la fattibilità e la sicurezza del trapianto intratecale di hfNPCs in pazienti con PMS e giustificano ulteriori studi clinici per valutare l'efficacia terapeutica di questa strategia in coorti più ampie.
- Nonostante lo studio fosse orientato alla sicurezza della procedura, sono stati condotti degli esami esplorativi secondari in cui: Nel periodo di follow-up di 2 anni dopo il trapianto di cellule progenitrici neurali fetal (hfNPCs), la progressione della disabilità è risultata leggermente rallentata rispetto ai 4 anni precedenti al trattamento, ma la differenza non è risultata statisticamente significativa. Anche altri parametri clinici e neurofisiologici – come test motori e cognitivi, potenziali evocati motori e sensitivi e spessore delle fibre nervose retiniche – non hanno mostrato variazioni significative nei due anni successivi al trapianto, né correlazioni con il numero di cellule iniettate.

In sintesi: non sono emersi miglioramenti neurologici o neurofisiologici statisticamente significativi.

\*GMP = (Good Manufacturing Practices, ovvero Buone Pratiche di Fabbricazione) insieme di regole che servono a garantire che i prodotti farmaceutici e terapie avanzate (come le cellule staminali) siano prodotti in modo sicuro, controllato e di qualità costante.

#### DATI MRI OTTENUTI:

Lo studio ha utilizzato la risonanza magnetica strutturale (MRI) per monitorare i cambiamenti nel volume cerebrale dei pazienti nei due anni successivi al trapianto di hfNPC. I risultati hanno mostrato 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).

#### DISCUSSIONE DATI MRI:

La riduzione dell'atrofia cerebrale nei pazienti trattati con hfNPC **suggerisce** che queste cellule potrebbero avere un effetto **neuroprotettivo**. Le cellule staminali neurali, una volta trapiantate, **potrebbero rilasciare sostanze** che **proteggono i neuroni esistenti e promuovono la riparazione dei tessuti danneggiati**. Questo **effetto** sembra essere **dose-dipendente**, cioè più cellule vengono trapiantate, maggiore è la protezione osservata.

➔ Effetto neuroprotettivo dose-dipendente

#### DATI BIOLOGICI (CSF) OTTENUTI:

Tre mesi dopo il trapianto, l'analisi del liquido cerebrospinale dei pazienti ha mostrato un aumento delle proteine e delle cellule presenti. Inoltre, è stato osservato un cambiamento nel profilo delle molecole presenti nel CSF, con un aumento di sostanze neuroprotettive e antinfiammatorie. In un caso, è stata rilevata la presenza di cellule donatrici nel CSF, indicando che le hfNPC possono sopravvivere e integrarsi nel sistema nervoso centrale.

#### DISCUSSIONE DATI CSF:

L'aumento di proteine e cellule nel CSF dopo il trapianto potrebbe riflettere una risposta del sistema nervoso all'introduzione delle hfNPC. Il cambiamento nel profilo delle molecole, con un aumento di sostanze neuroprotettive e antinfiammatorie, suggerisce che le cellule trapiantate possono influenzare positivamente l'ambiente del sistema nervoso, promuovendo la protezione e la riparazione dei tessuti. La presenza di cellule donatrici nel CSF indica che le hfNPC possono sopravvivere e potenzialmente contribuire alla rigenerazione del sistema nervoso.

## CRITICITA' EMERSE

- **Eventi avversi gravi:** Un paziente ha avuto una ricaduta di sclerosi multipla 78 settimane dopo il trapianto. Tuttavia, questo episodio è stato considerato non correlato al trattamento con cellule staminali, poiché il paziente aveva una storia clinica di ricadute e aveva interrotto una precedente terapia immunosoppressiva sei mesi prima dello studio.
- **Progressione della Disabilità:** Nonostante la riduzione dell'atrofia cerebrale osservata, non sono stati riscontrati miglioramenti significativi nella disabilità dei pazienti, misurata tramite appropriate scale cliniche.
- **Nuove lesioni cerebrali:** Durante i due anni di follow-up, sei pazienti (50%) hanno sviluppato nuove lesioni cerebrali visibili alla risonanza magnetica. Queste lesioni non erano associate a sintomi clinici evidenti e non sono state considerate direttamente legate al trattamento, ma indicano che l'attività della malattia non è stata completamente soppressa.
- **Dimensioni del campione:** Lo studio ha coinvolto solo 12 pazienti, un numero troppo esiguo per trarre conclusioni definitive sull'efficacia del trattamento.
- **Assenza di gruppo di controllo:** Senza un gruppo di confronto (placebo o trattamento standard), è difficile attribuire con certezza gli effetti osservati al trapianto di cellule staminali.
- **Durata del follow-up:** Il monitoraggio dei pazienti è durato due anni, un periodo relativamente breve per valutare gli effetti a lungo termine e la sostenibilità dei benefici osservati.

#### Dati fMRI:

È stata osservata una differenza significativa nel tasso annuale di atrofia della materia grigia (GM) tra i gruppi a basso e alto dosaggio: nuove lesioni cerebrali T2\* si sono verificate in metà dei pazienti, ma non erano associate alla dose di cellule trapiantate (in quanto si sono osservate anche in chi ha ricevuto dosi alte, quindi nessuna correlazione significativa tra numero di cellule iniettate e nuove lesioni), mentre l'atrofia cerebrale (perdita di materia grigia e volume cerebrale totale), in particolare della materia grigia, è risultata inferiore nei pazienti trattati con dosi più alte di hfNPCs.

È emersa una **correlazione significativa tra numero di cellule iniettate e minore perdita di volume cerebrale**, suggerendo un potenziale **effetto neuroprotettivo dose-dipendente**.

\*Lesioni T2 sono aree del cervello che appaiono iperintense (cioè più luminose) nelle sequenze T2 della risonanza magnetica. Queste aree indicano danni al tessuto nervoso, come infiammazione, demielinizzazione o edema, tipici della sclerosi multipla (SM) (sono un marker di attività della malattia).

#### Dati Biologici (CSF)

##### Altre osservazioni:

- Dopo il trapianto delle cellule staminali nel liquido cerebrospinale (CSF), i ricercatori hanno notato una **leggera risposta infiammatoria**: il liquido conteneva un po' più proteine e cellule del solito (normale dopo una procedura del genere e non indica necessariamente un problema).
- **Non sono cambiati** invece gli **indicatori della produzione di anticorpi** nel cervello
- i segni tipici **dell'infiammazione cronica della sclerosi multipla** (le bande oligoclonali) sono **rimasti presenti**, quindi il trapianto non ha modificato questa componente della malattia.
- in un piccolo gruppo di pazienti, hanno cercato **tracce delle cellule trapiantate nel CSF**. In uno di loro, sono riusciti effettivamente a trovare ancora cellule del donatore dopo 3 mesi, il che suggerisce che alcune cellule sopravvivono per un po' dopo il trapianto.

In sintesi: dopo il trapianto c'è stata una risposta del corpo, ma non grave. Le cellule trapiantate possono restare attive per un po', ma non cambiano i segni classici della malattia nel CSF.

**DISCUSSIONE E OSSERVAZIONI:** I ricercatori hanno studiato l'effetto del trapianto di cellule staminali neurali fetal umane (hfNPC) in pazienti con sclerosi multipla progressiva (PMS).

Per valutare l'effetto biologico di questo trattamento, hanno analizzato il liquido cerebrospinale (CSF) dei pazienti prima del trapianto e dopo 3 mesi, concentrandosi su molecole immunologiche e proteine.

Cosa è cambiato nel liquido cerebrospinale dopo il trapianto?

- **Aumento di molecole protettive e rigenerative:**  
Dopo il trapianto, si è osservato un aumento (sovaregolazione) di fattori trofici, cioè molecole che aiutano i neuroni a sopravvivere, crescere e rigenerarsi:
  - GDNF: protegge i neuroni, stimola la crescita dei prolungamenti nervosi (neuriti) e la loro differenziazione.
  - VEGF-C: attiva cellule staminali neurali dormienti e stimola la formazione di nuovi neuroni, soprattutto nell'ippocampo, favorendo neurogenesi e plasticità neuronale.
  - SCF: contribuisce al mantenimento e alla proliferazione delle cellule staminali.
- **Modulazione della risposta immunitaria:** Sono aumentate anche molecole con un ruolo nel sistema immunitario
  - 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 di molecole infiammatorie:** È stata rilevata una diminuzione (sottoregolazione) di IL-8, una molecola che normalmente richiama cellule infiammatorie nel cervello.

Questa osservazione indica una riduzione dell'infiammazione nel sistema nervoso centrale dopo il trapianto.

Molecole ambigue: infiammatorie ma forse utili → Alcune molecole osservate, pur essendo pro-infiammatorie, potrebbero anche contribuire alla rigenerazione del tessuto nervoso:

- IL-15: stimola la proliferazione e differenziazione delle cellule progenitrici neurali (NPC). Quando è carente, la neurogenesi nella zona subventricolare (SVZ) diminuisce.
- GM-CSF: ha effetto protettivo sulle cellule NPC e sui neuroni, impedendo l'apoptosi (morte cellulare).
- Tuttavia, è possibile che GM-CSF derivi da cellule immunitarie (monociti/macrfagi) infiltrate nel cervello, che potrebbero aver causato infiammazione osservata tramite risonanza magnetica (MRI) nel 50% dei pazienti.
- Quindi, ha un doppio ruolo: potenzialmente rigenerativo, ma anche legato all'attivazione immunitaria.

- Trattamenti immunomodulatori ricevuti dai pazienti potrebbero aver influenzato i risultati.
- Assenza di gruppo di controllo: non c'è un confronto con pazienti che non hanno ricevuto il trapianto.
- Pochi punti temporali (solo prima e dopo 3 mesi): non si sa quanto durano gli effetti né quanto restano vive le cellule trapiantate.
- In un solo paziente (tra i 3 che avevano ricevuto la dose più alta), è stata trovata traccia genetica delle cellule trapiantate (microchimerismo): è un dato interessante, ma isolato e solo descrittivo.

#### Conclusioni

- Il trapianto di hfNPC è stato sicuro, ben tollerato e tecnicamente fattibile.
- Sono stati osservati segnali molecolari di possibile protezione e rigenerazione del tessuto nervoso.
- I risultati preliminari suggeriscono un potenziale effetto benefico, ma devono essere confermati da studi futuri più ampi, con dosi più alte e un follow-up più lungo.
- Non è ancora chiaro se le cellule abbiano un effetto duraturo (bystander effect) sul decorso della malattia.

## DISCUSSIONE:

Obiettivo principale: valutare sicurezza e dose massima tollerata del trapianto intratecale di cellule progenitrici neurali fetali umane (hfNPCs) in pazienti con sclerosi multipla progressiva (PMS).

La terapia con hfNPC è fattibile, sicura e ben tollerata in PMS.

I dati preliminari suggeriscono potenziali effetti neuroprotettivi e rimodellamento immunologico. Sono necessari studi controllati di fase successiva, con campioni più ampi e dosi elevate, per valutare l'efficacia clinica e la durata dell'effetto.

Analisi immunologiche e proteomiche del liquido cerebrospinale sono state eseguite al basale e a 3 mesi dal trapianto.

Abbiamo riscontrato una **sovraregolazione di alcuni fattori trofici** (GDNF, VEGF-C e SCF) e di **molecole immuno-correlate** (ligando di FAS e IL-10) e una **sottoregolazione di alcune chemiochine pro-infiammatorie**, come IL-8.

Sebbene non possiamo escludere che i nostri risultati possano essere stati influenzati dai trattamenti immunomodulatori concomitanti, è possibile ipotizzare che le hfNPC trapiantate possano aver svolto un ruolo neuroprotettivo. Il GDNF è un fattore neurotrofico che migliora la sopravvivenza, la crescita dei neuriti e la differenziazione di distinte popolazioni di neuroni.

[Il VEGF-C converte le cellule staminali neurali quiescenti in cellule progenitrici, stimolando la neurogenesi ippocampale e la plasticità neuronale].

Abbiamo anche riscontrato una sovraregolazione di citochine e chemochine, come IL-15 e GM-CSF. Sebbene di natura pro-infiammatoria, è stato dimostrato che queste molecole esercitano anche funzioni pro-rigenerative. IL-15 regola la proliferazione/differenziazione delle cellule NPC e la sua carenza porta a una ridotta generazione di neuroblasti nell'asse della corrente migratoria rostrale-zona subventricolare (SVZ)31. Analogamente, GM-CSF ha attività neurotrofica e neurogena, inibendo sia l'apoptosi delle cellule NPC che quella neuronale.

Tuttavia, non possiamo escludere che l'aumento di GM-CSF possa essere dovuto a monociti/macrafagi infiltranti il sistema nervoso centrale (SNC) nel sangue, che innescano una risposta infiammatoria che, a sua volta, potrebbe anche spiegare l'attività MRI osservata nel 50% dei nostri pazienti sottoposti a trapianto. Inoltre, la nostra analisi proteomica supporta un possibile ruolo pro-rigenerativo delle cellule staminali embrionali umane (hfNPC).

Rispetto al basale, l'analisi del pathway proteomico del liquido cerebrospinale ha evidenziato un arricchimento del pathway di organizzazione della matrice extracellulare (ECM) e del pathway di interazione membrana-ECM dopo il trattamento; tale evidenza potrebbe riflettere un possibile cross-talk tra hfNPC e la barriera ematoencefalica (BBB) nei pazienti trattati, come precedentemente dimostrato in studi preclinici.

Infine, l'analisi genetica condotta su proteine differenzialmente espresse nel liquido cerebrospinale ha mostrato un arricchimento positivo delle vie cellulari che rispondono ai fattori di crescita, nonché un chiaro coinvolgimento delle vie associate alla neuroplasticità, come l'adesione alla membrana, lo sviluppo assonale e la morfogenesi della proiezione cellulare. I nostri risultati sono in linea con precedenti evidenze in modelli murini di malattia di Alzheimer, che dimostrano come il trapianto di NPC riduca i deficit di memoria promuovendo la neurogenesi, la plasticità sinaptica e la stabilità dendritica.

Sebbene incoraggianti e coerenti con i dati preclinici, un effetto confondente nell'interpretazione delle analisi del liquido cerebrospinale potrebbe essere attribuito a **trattamenti concomitanti** e al **disegno non controllato dello studio**. I nostri risultati preclinici precedentemente pubblicati hanno chiaramente dimostrato che le cellule potrebbero mantenere la vitalità e continuare a esercitare il loro effetto bystander anche mesi dopo il trapianto. Tuttavia, non possiamo fare ipotesi su quanto a lungo le cellule rimangano vitali e potenzialmente efficaci perché il disegno dello studio (con pochi punti temporali e nessun follow-up a lungo termine) non ha consentito di ottenere campioni di liquido cerebrospinale oltre i 3 mesi dopo il trapianto. Inoltre, il risultato positivo del test microchimerico in un paziente, uno dei tre che hanno ricevuto la dose più elevata di cellule, sebbene interessante, ha solo un valore descrittivo e potrebbe rappresentare un spunto per studi successivi.

In conclusione, il nostro studio ha dimostrato che la terapia con hfNPC nella PMS è fattibile, sicura e tollerabile. I risultati esplorativi preliminari sulle variazioni del volume cerebrale e sul rimodellamento del liquido cerebrospinale giustificano futuri studi clinici con la dose più elevata di cellule in una coorte più ampia di pazienti. Resta da stabilire se il trapianto di hfNPC possa avere il potenziale di esercitare un effetto bystander a lungo termine negli esseri umani, influenzando il decorso clinico della fase progressiva della SM.

Le terapie attuali si concentrano principalmente ad offrire un certo sollievo sintomatico e ad arrestare la progressione della malattia, attraverso farmaci e fisioterapia, senza però offrire una soluzione curativa.

Per questo motivo, l'esplorazione di trattamenti innovativi come le terapie con cellule staminali rappresenta una prospettiva promettente per una gestione più efficace della sclerosi multipla.

Diversi tipi di cellule staminali sono stati esplorati per il loro potenziale terapeutico nella SM, tra cui:

- Cellule staminali ematopoietiche (HSCs) → derivate principalmente dal midollo osseo o dal sangue periferico, sono in grado di rigenerare le cellule del sistema immunitario.
- Cellule staminali mesenchimali (MSCs) → provengono da diversi tessuti (es. midollo osseo, tessuto adiposo, cordone ombelicale). Queste sono in grado di modulare la risposta immunitaria, rilasciare fattori neurotrofici, promuovere la riparazione mielinica e sostenere la sopravvivenza neuronale.
- Cellule staminali neurali (NSCs) → possono differenziarsi in neuroni, astrociti e oligodendrocyti ed offrono un approccio più diretto alla rigenerazione del tessuto nervoso danneggiato e alla rimielinizzazione.
- Cellule staminali embrionali (ESCs) → sono pluripotenti, con la capacità di differenziarsi in qualsiasi tipo cellulare e promettenti per la rigenerazione della mielina, ma sollevano preoccupazioni etiche e problemi di rischio tumorale (teratomi).
- Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) → sono ottenute riprogrammando cellule adulte (es. fibroblasti) per farle tornare a uno stato simile a quello embrionale e rappresentano una fonte potenzialmente illimitata di cellule paziente-specifiche, riducendo i rischi di rigetto immunitario.

## PAPER

Presentiamo i risultati dello studio STEMS( , uno studio clinico di fase 1 (ovvero la fase in cui l'obiettivo è quello di di testare sicurezza e tollerabilità del trattamento) condotto presso l'Ospedale San Raffaele di Milano, Italia, che valuta la fattibilità, sicurezza e tollerabilità del trapianto intratecale (cioè direttamente nel liquido cerebrospinale) di cellule precursori neurali fetal umane (hfNPCs) in 12 pazienti con PMS (con evidenza di progressione della malattia).

Questo studio si sofferma su pazienti con sclerosi multipla progressiva (PMS) in quanto si tratta di una fase avanzata e più difficile da trattare della malattia. I pazienti con PMS sperimentano un peggioramento progressivo e continuo della disabilità, e i trattamenti disponibili non sono molto efficaci per fermare o invertire il danno neurologico in questa fase. Le opzioni terapeutiche per la PMS sono limitate, quindi c'è un bisogno urgente di nuovi approcci, come il trapianto di cellule staminali.

Le cellule hfNPCs (cellule progenitrici neurali fetal umane) sono state scelte per il loro potenziale di neuroprotezione e riparazione dei danni nervosi, che potrebbe essere particolarmente utile nei pazienti con PMS. In queste fasi avanzate della malattia, il danno alle cellule nervose e la perdita di tessuti cerebrali sono più pronunciati, quindi le hfNPCs potrebbero offrire un'opportunità per riparare o proteggere le aree danneggiate del sistema nervoso centrale.