

**ANALISI CAMPIONI CRIOPRESERVATI PRELEVATI  
DALL'AZIENDA OSPEDALIERA  
"SPEDALI CIVILI DI BRESCIA"  
NELL'AMBITO DELL'INDAGINE  
RIGUARDANTE LA "STAMINA FOUNDATION"**

**Laboratorio di Biologia Cellulare e Terapie Oncologiche Avanzate  
Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno Infantili e dell'Adulto**

**Università di Modena e Reggio Emilia  
Azienda Ospedaliera Universitaria di Modena**

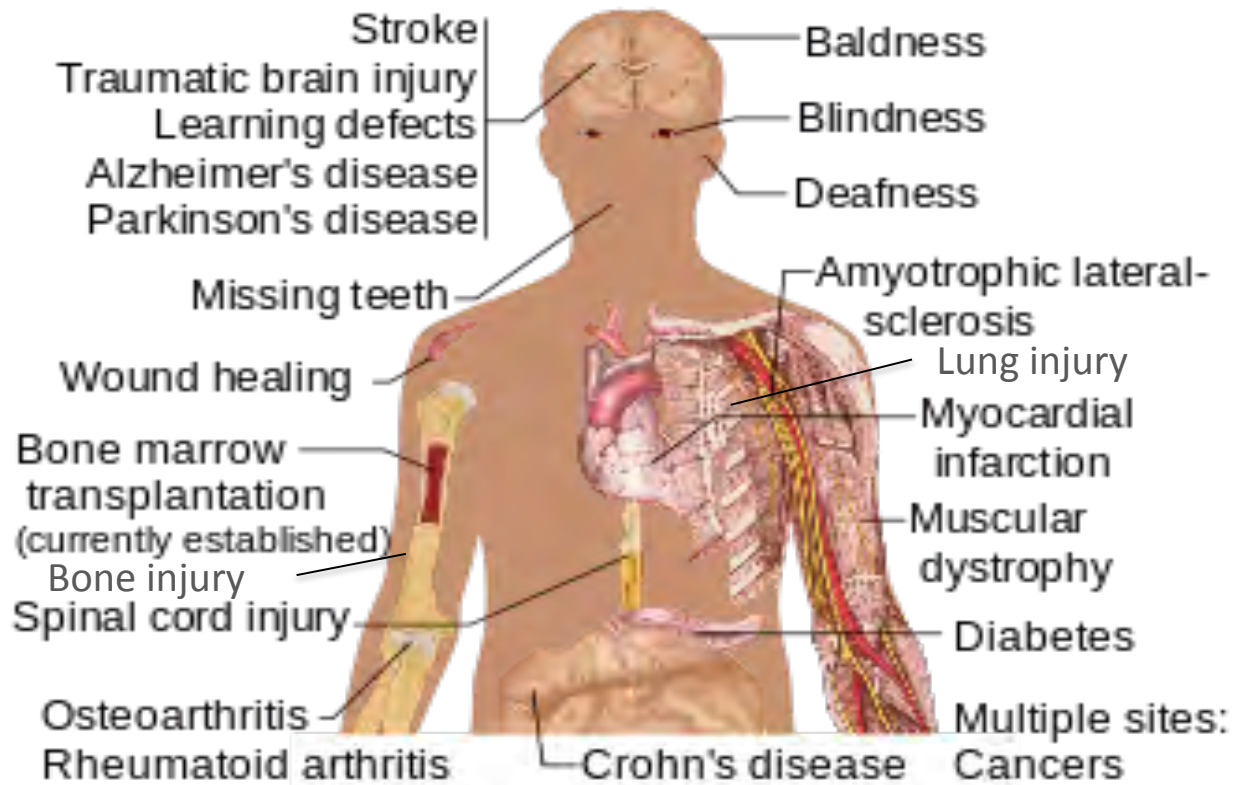
***Prof. Massimo Dominici***

**[massimo.dominici@unimore.it](mailto:massimo.dominici@unimore.it)**



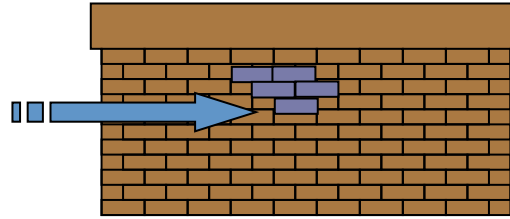
Azienda Ospedaliera – Universitaria di Modena

# Le Potenzialità delle Staminali

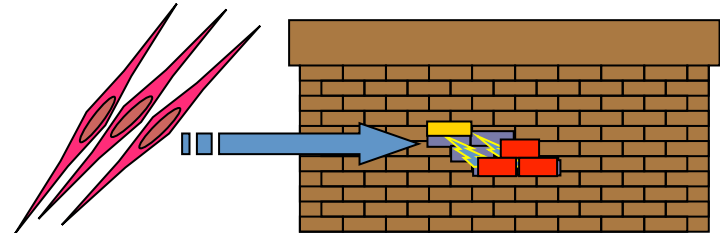
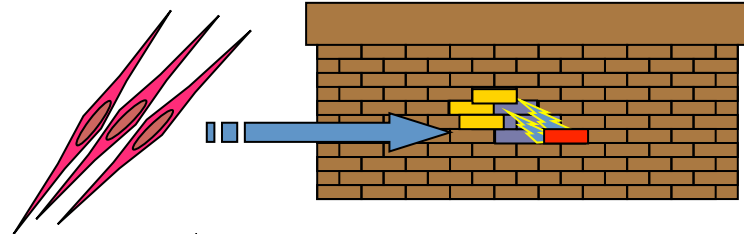
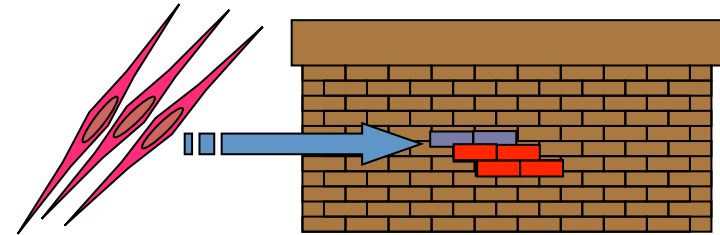


# Come Agiscono le Staminali?

*DANNO !*



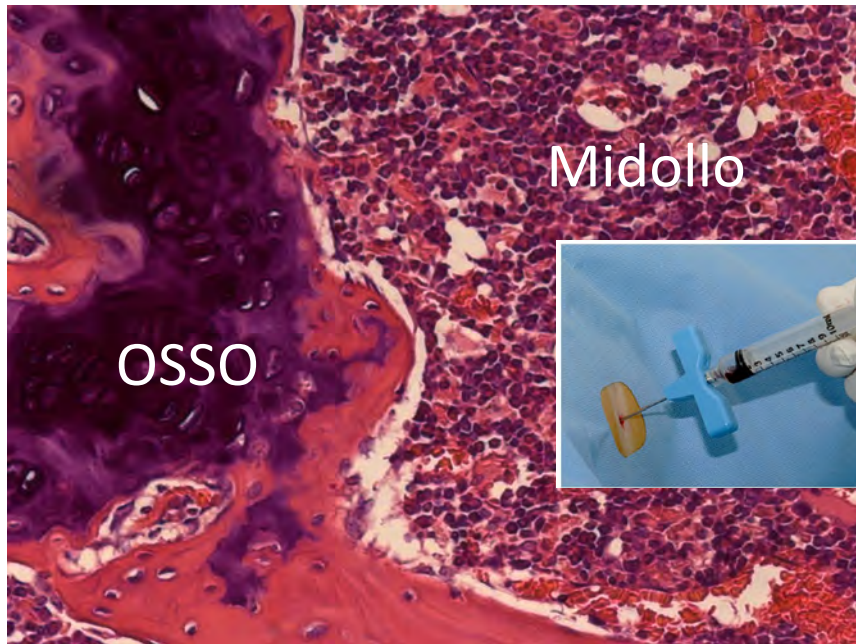
- Staminali mattone  
→ Differenziamento
- Staminali di supporto  
→ Rilascio di Molecole
- Entrambe



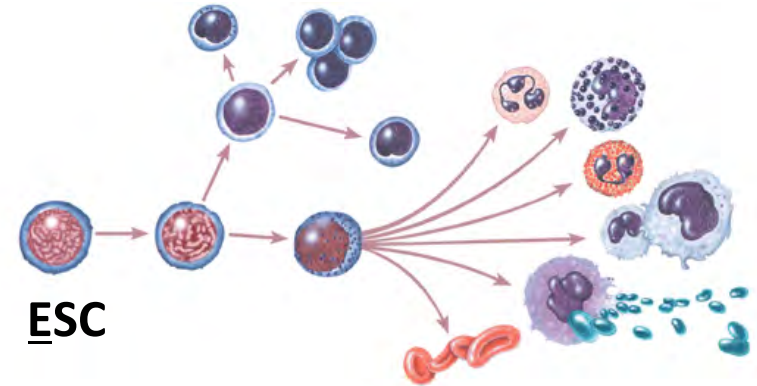
# IL MIDOLLO OSSEO

Cellule Staminali Ematopoietiche: ESC

Cellule Staminali Mesenchimali: MSC

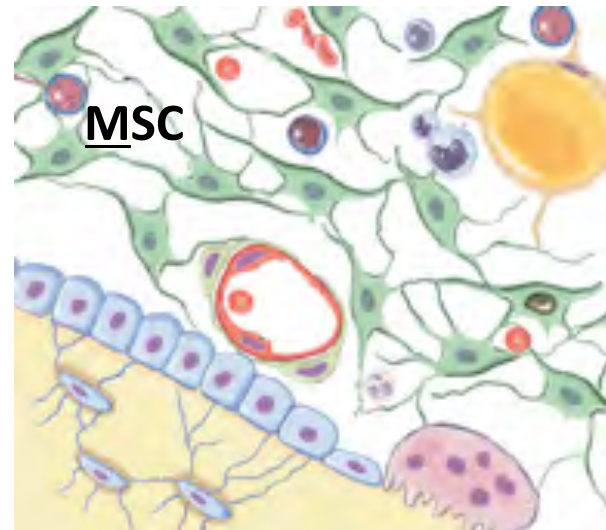


CELLULE IMMUNITA'+ SANGUE



ESC

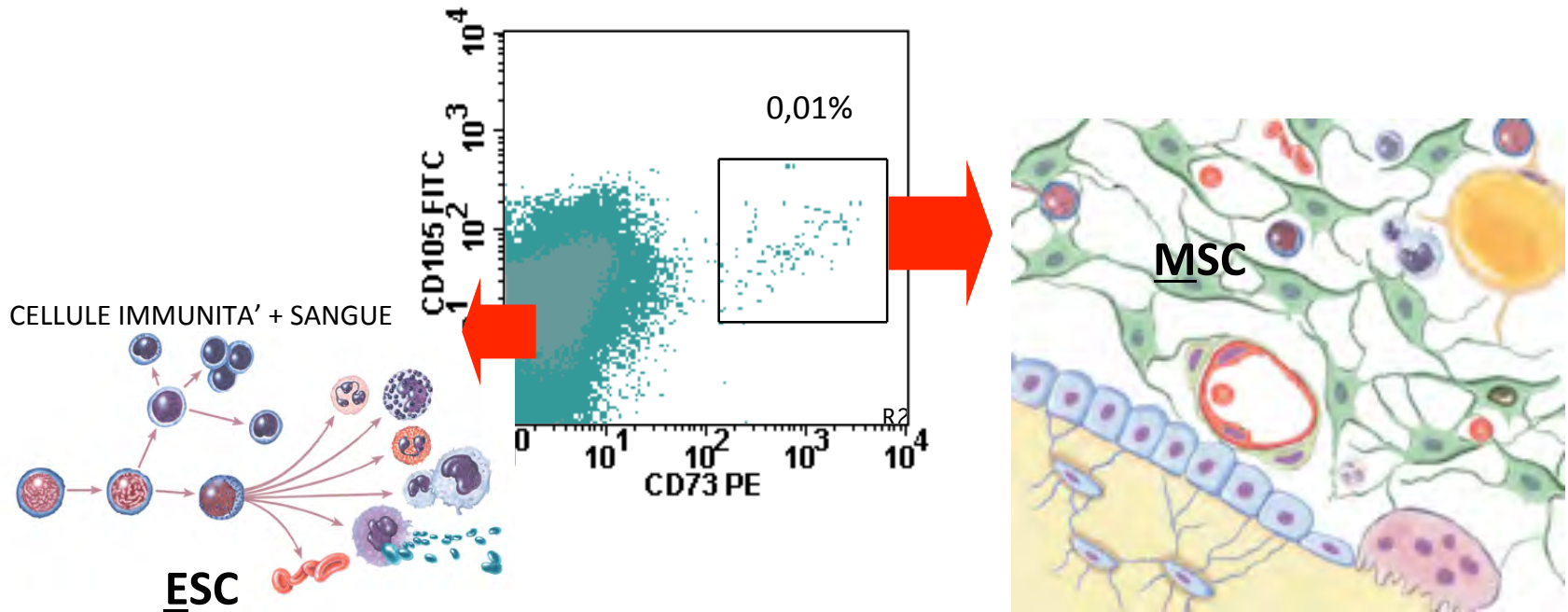
MSC



Midollo Osseo

# Le Staminali MSC sono Rare

ANALISI CITOMETRICHE  
SUBITO DOPO ESTRAZIONE



Il CD73, CD105, CD90  
Sono marcatori di  
Staminali MSC

# Ecco Cosa Accade in Vitro

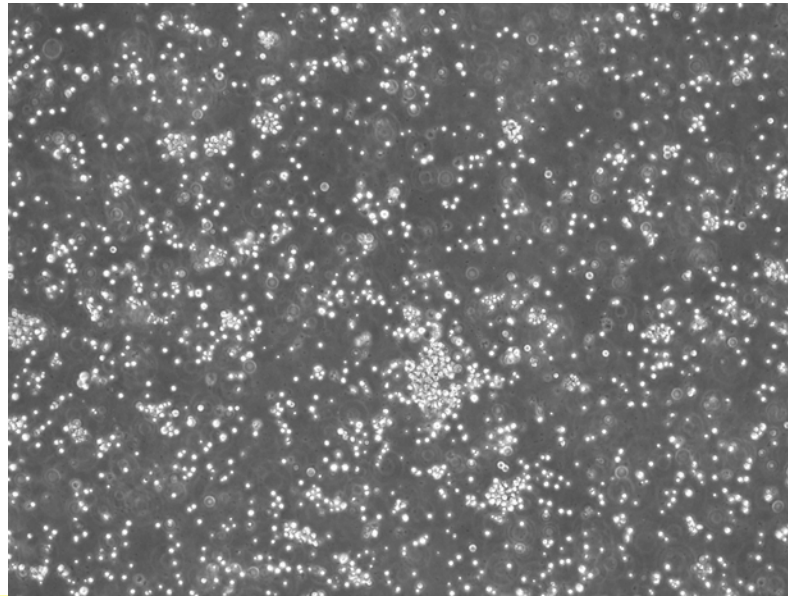
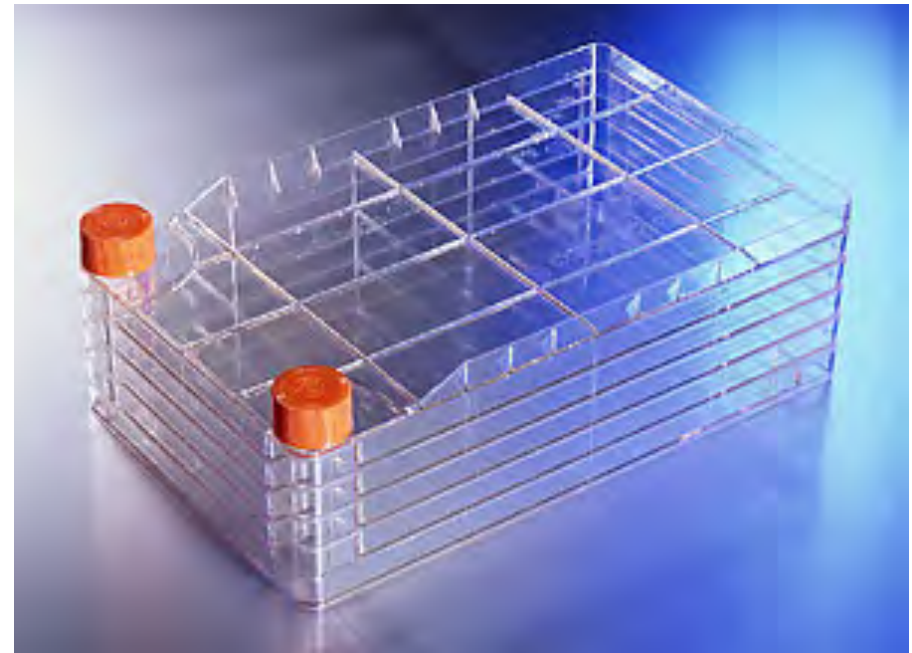
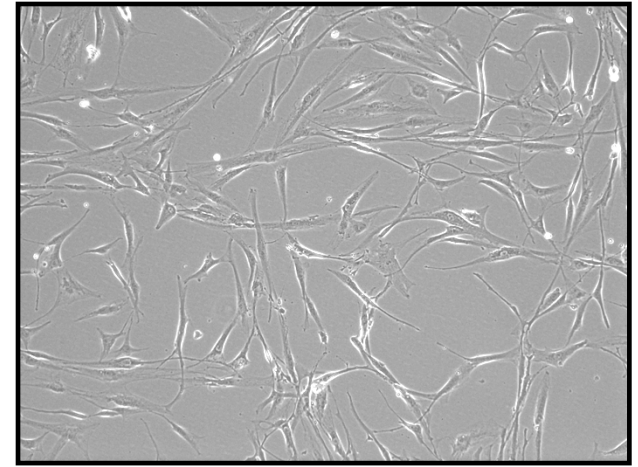


Immagine Microscopica (100X)

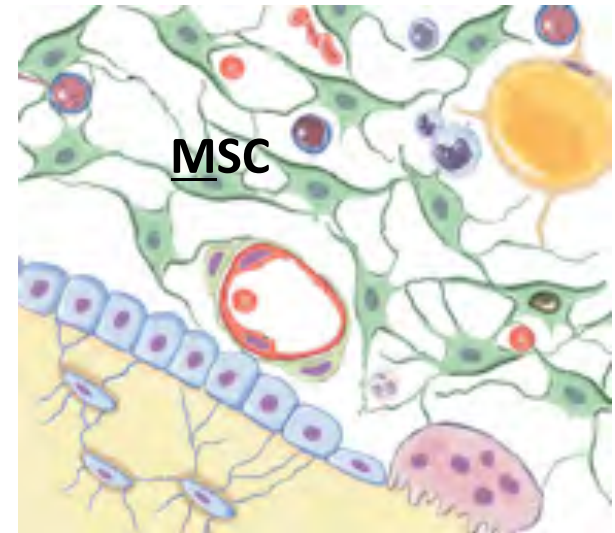
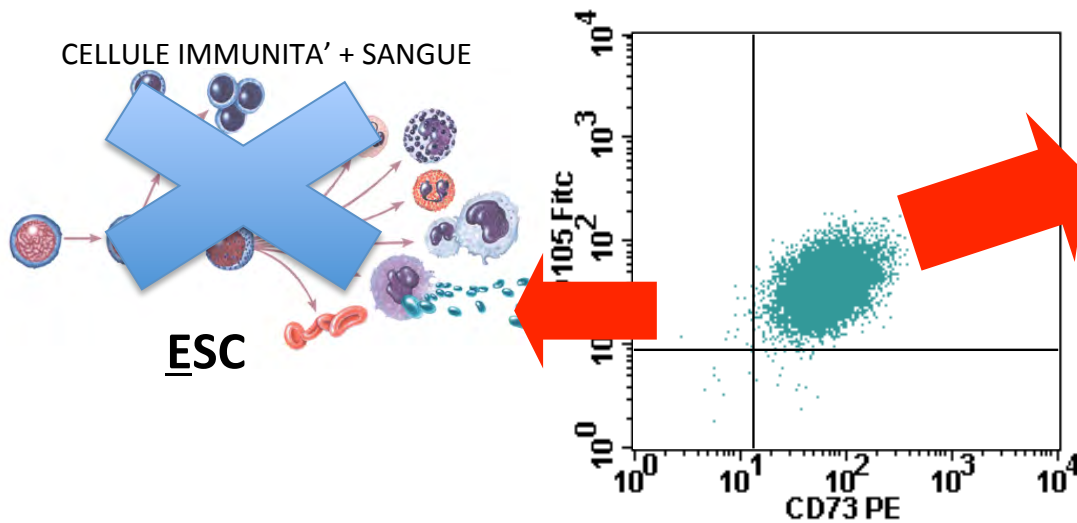


# Amplificazione in vitro



# Un'Appropriata Amplificazione in Vitro "Purifica" le Staminali Riducendo ed Eliminando Le Cellule dell'Immunità

ANALISI CITOMETRICHE  
DOPO AMPLIFICAZIONE



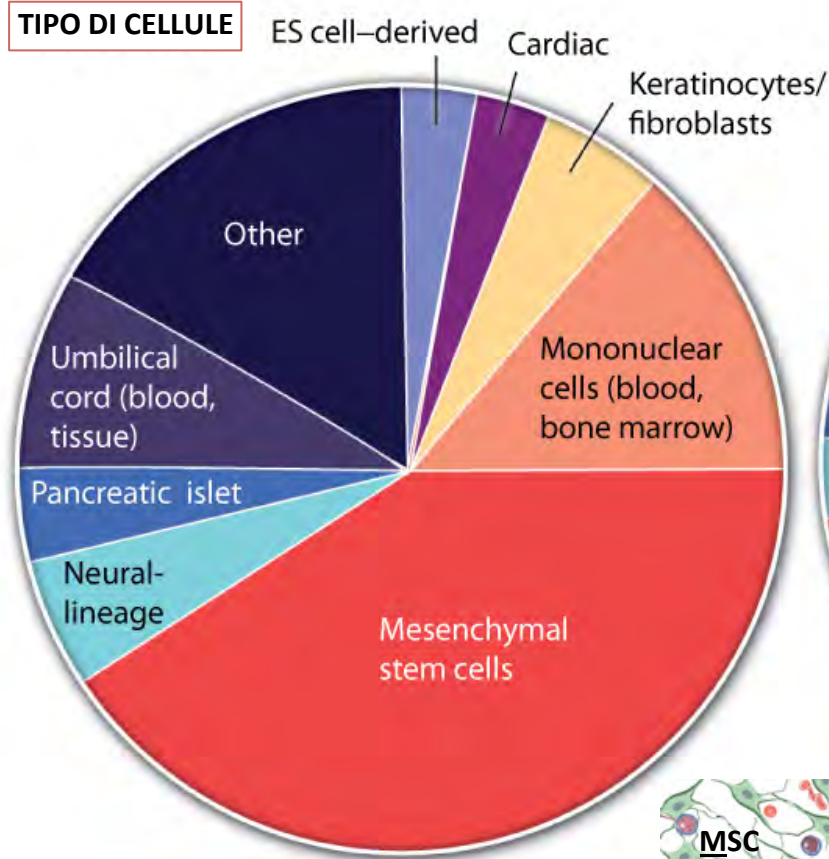
CD73, CD105, CD90:  
Sono marcatori di MSC



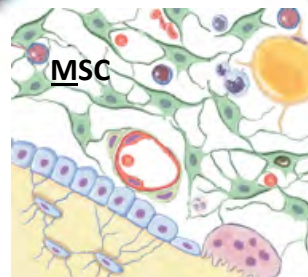
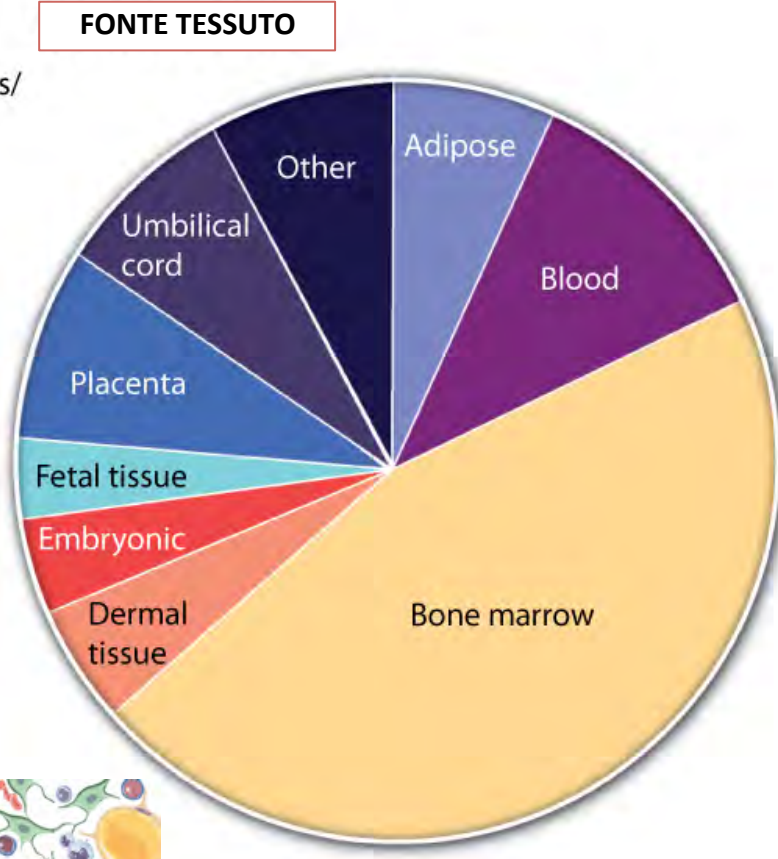
# L'Esperienza Americana-USA 2007-2011

(su ~115 casi sperimentali per la medicina rigenerativa )

TIPO DI CELLULE

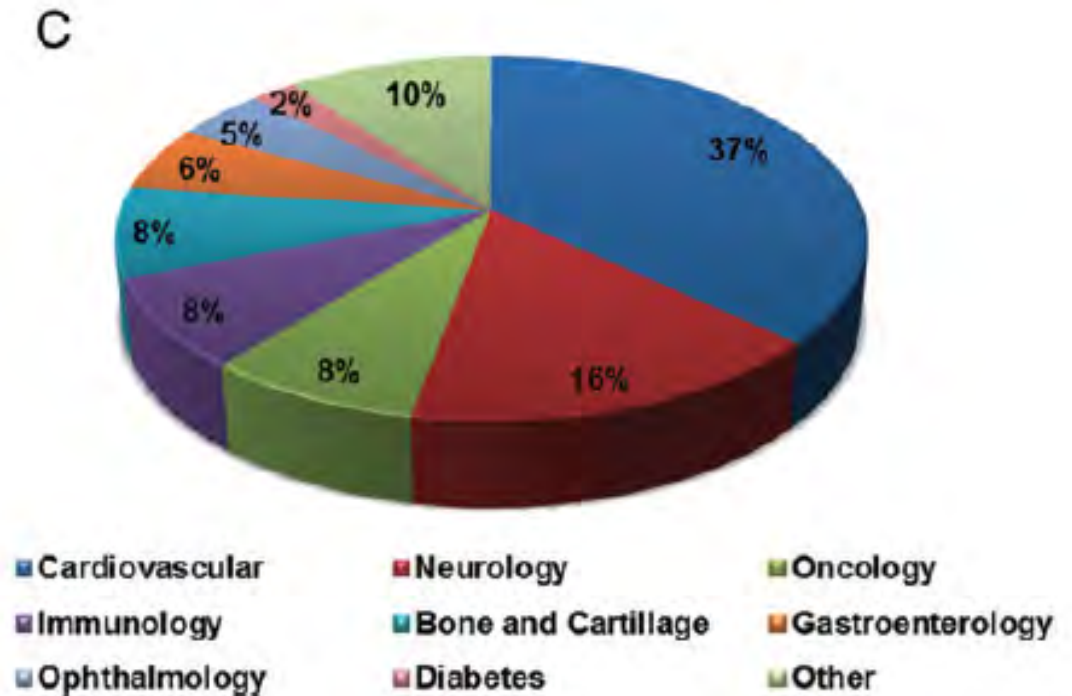
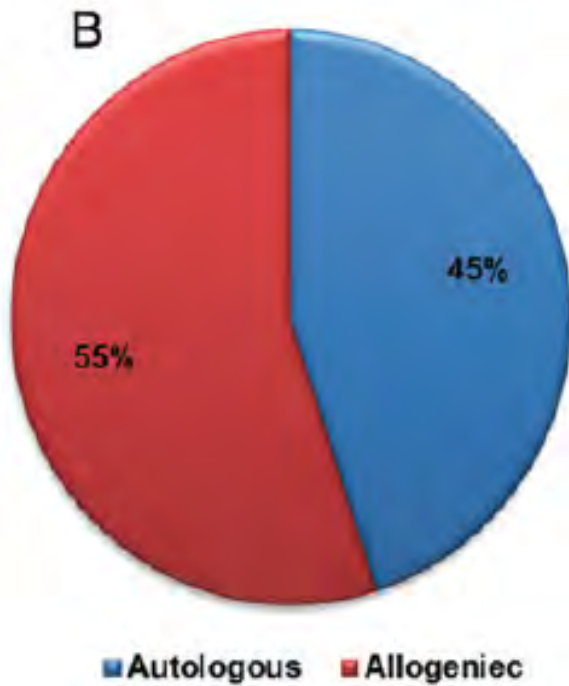


FONTE TESSUTO

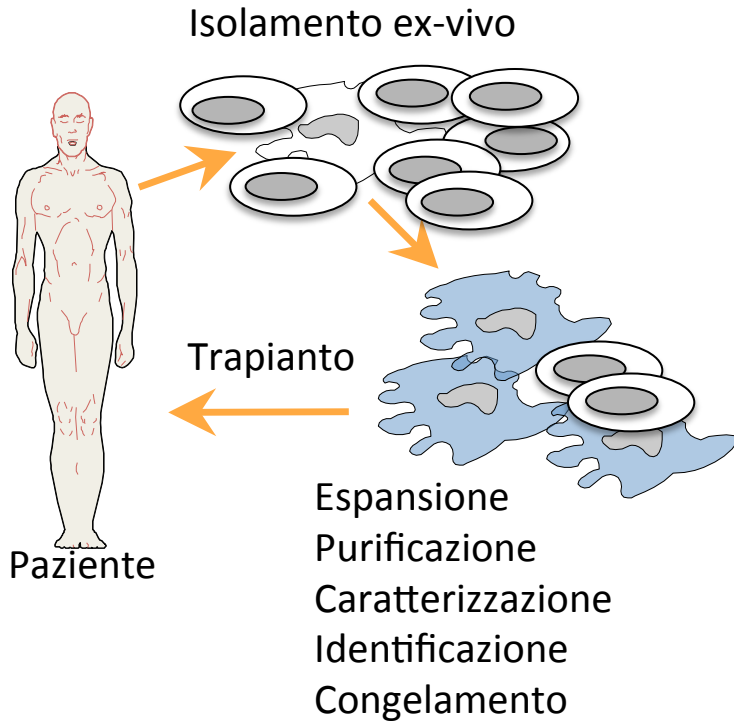


Infusioni singole o multiple di 1-5 milioni di cellule/kg se e.v.

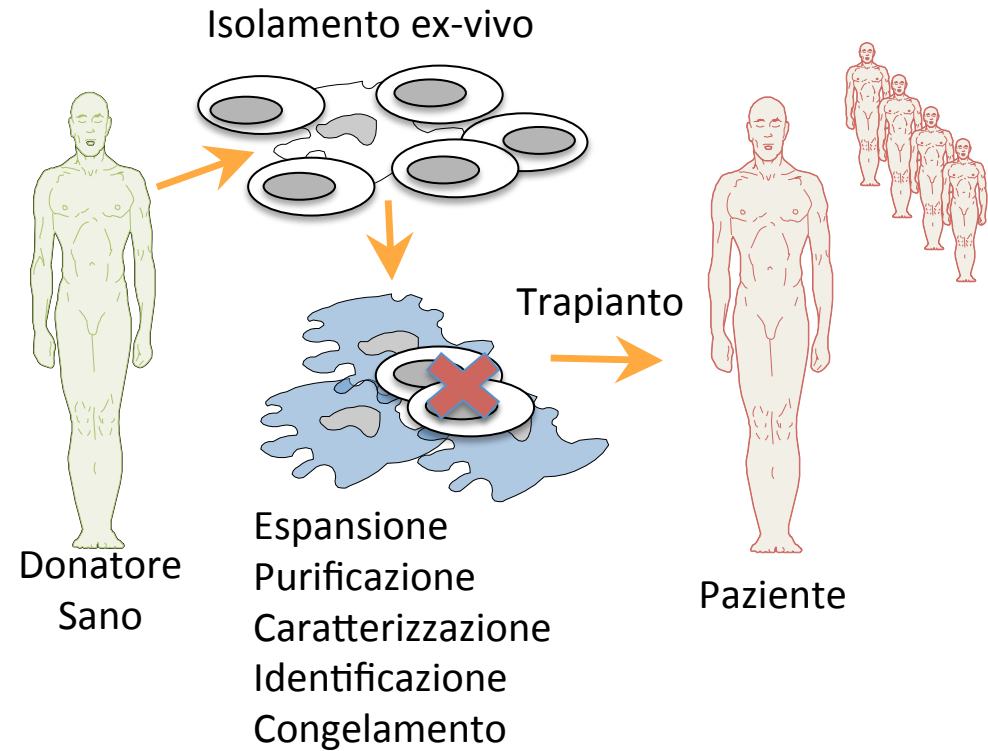
# Donatori ed Indicazioni Cliniche Nella Medicina Rigenerativa



# Trapianto Autologo ed Allogenico di MSC



**Autologo**



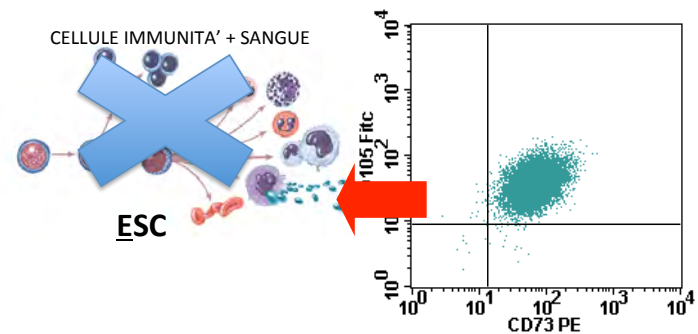
**Allogenico**

 Cellule dell'immunità

 Staminali MSC

# Perchè è Necessario Eliminare L'Immunità nel Trapianto Allogenico di MSC?

1. Non servono
2. Sono dannose perchè provocano **reazioni avverse** legate alla capacità delle **cellule del donatore di aggredire i tessuti del ricevente**
3. Possono innescare una **risposta del ricevente verso le cellule immunitarie trapiantate** con una reazione „allergica“ anche mortale oltre che **invalidare il trapianto**
4. Questi aspetti non sono significativi per il trapianto Autologo



# Quello che è stato compreso del "Protocollo STAMINA"

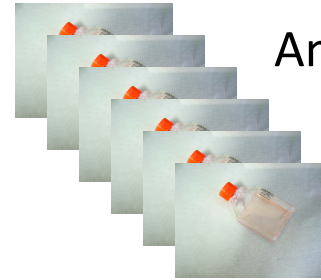
Aspirato Midollare



Isolamento



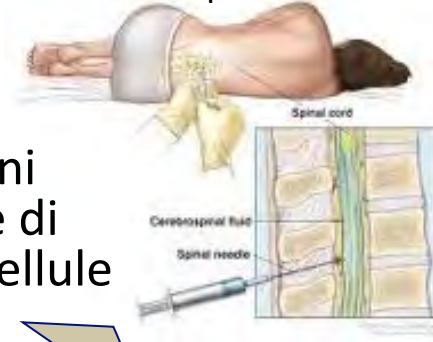
Amplificazione In Laboratorio



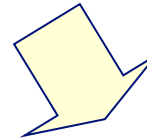
IN VENA



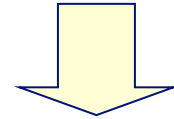
Nel Midollo Spinale - Rachide



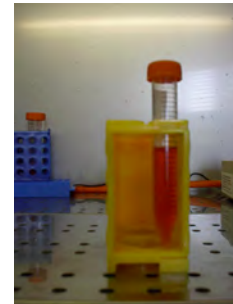
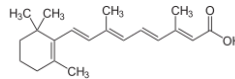
Infusioni multiple di 200.000 cellule



Analisi Laboratorio



Trattamento Con Acido Retinoico



Scongelamento



Congelamento N2

# VALUTAZIONI INIZIALI CAMPIONI “STAMINA”

- I campioni sono stati consegnati il giorno 01/08/2012 presso il ns. Laboratorio da Ufficiali autorizzati dei NAS.
- La valutazione ispettiva al momento della consegna dimostrava la presenza di due campioni in apparente buono stato di criopreservazione.
- In sostanza **poco/non leggibili** i caratteri siglati sulle fiale da congelamento



# ANALISI IMMUNOFENOTIPICA E MORFOLOGICA DEI CAMPIONI POST-SCONGELAMENTO

- I campioni venivano quindi analizzati immediatamente dopo scongelamento mediante parametri definiti da Dominici et al. (Cytotherapy 2006)
- Le cellule venivano quindi poste in coltura al fine di:
  - monitorarne il comportamento in vitro
  - amplificarle per i test necessari a definirne le caratteristiche biologiche e la staminalità (immunologia e differenziamento)
  - valutarne le capacità di divenire cellule della linea neuroectodermica (definito qui “neuronale” in senso lato)



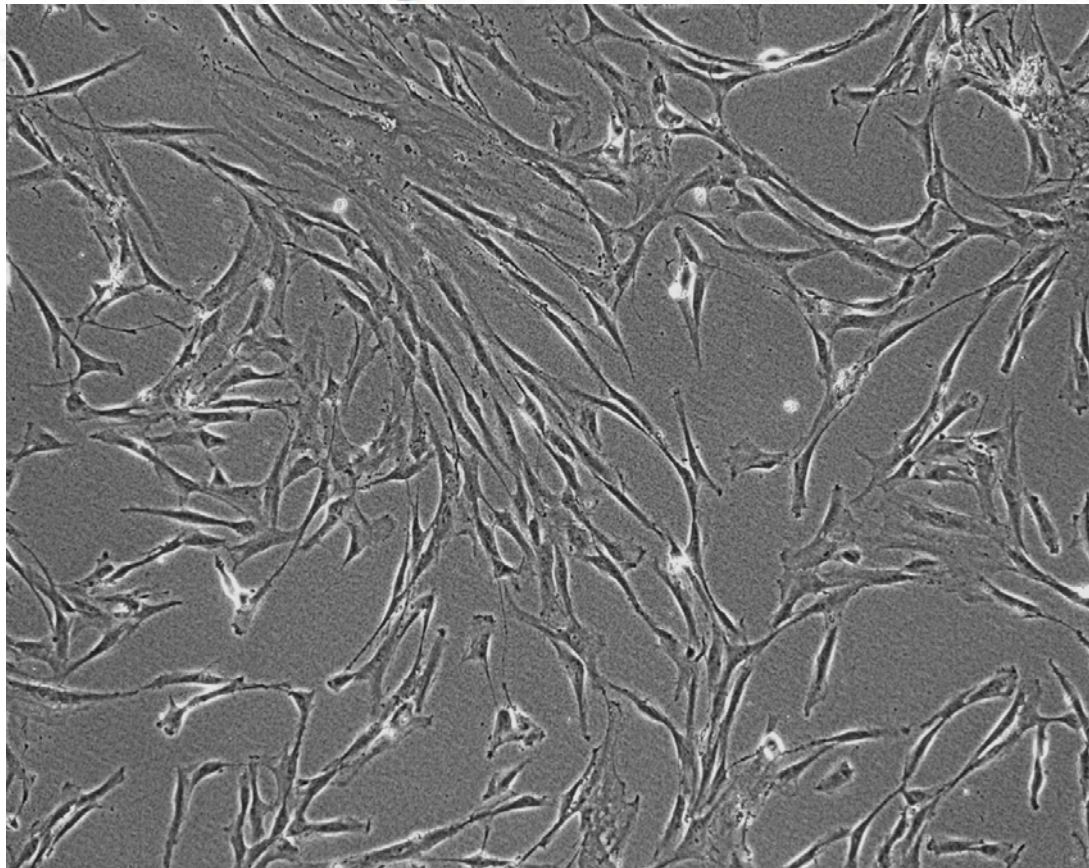
QUALI SONO LE MINIME  
DEFINIZIONI DI “NORMALITA”  
PER CELLULE STAMINALI MSC?





# Criteria Dominici & ISCT per Minima Definizione di Staminalità in Cellule Stromali/Staminali Mesenchimali: il Normale Aspetto in Coltura

## 1 Adherence to plastic in standard culture conditions



International Society for Cellular Therapy  
ISCT

Cytotherapy (2006) Vol. 8, No. 4, 315–317

Taylor & Francis  
Taylor & Francis Group

### POSITION PAPER

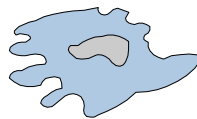
## Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement

M Dominici<sup>1</sup>, K Le Blanc<sup>2</sup>, I Mueller<sup>3</sup>, I Slaper-Cortenbach<sup>4</sup>, FC Marini<sup>5</sup>,  
DS Krause<sup>6</sup>, RJ Deans<sup>7</sup>, A Keating<sup>8</sup>, DJ Prockop<sup>9</sup> and EM Horwitz<sup>10</sup>



# Criteria Dominici & ISCT per Minima Definizione di Staminalità in Cellule Stromali/Staminali Mesenchimali: IL FENOTIPO IMMUNOLOGICO ATTESO

2 Phenotype Positive ( $\geq 95\% +$ )  
CD105  
CD73  
CD90



Staminali MSC

Negative ( $\leq 2\% +$ )  
CD45  
CD34  
CD14 or CD11b  
CD79 $\alpha$  or CD19  
HLA-DR



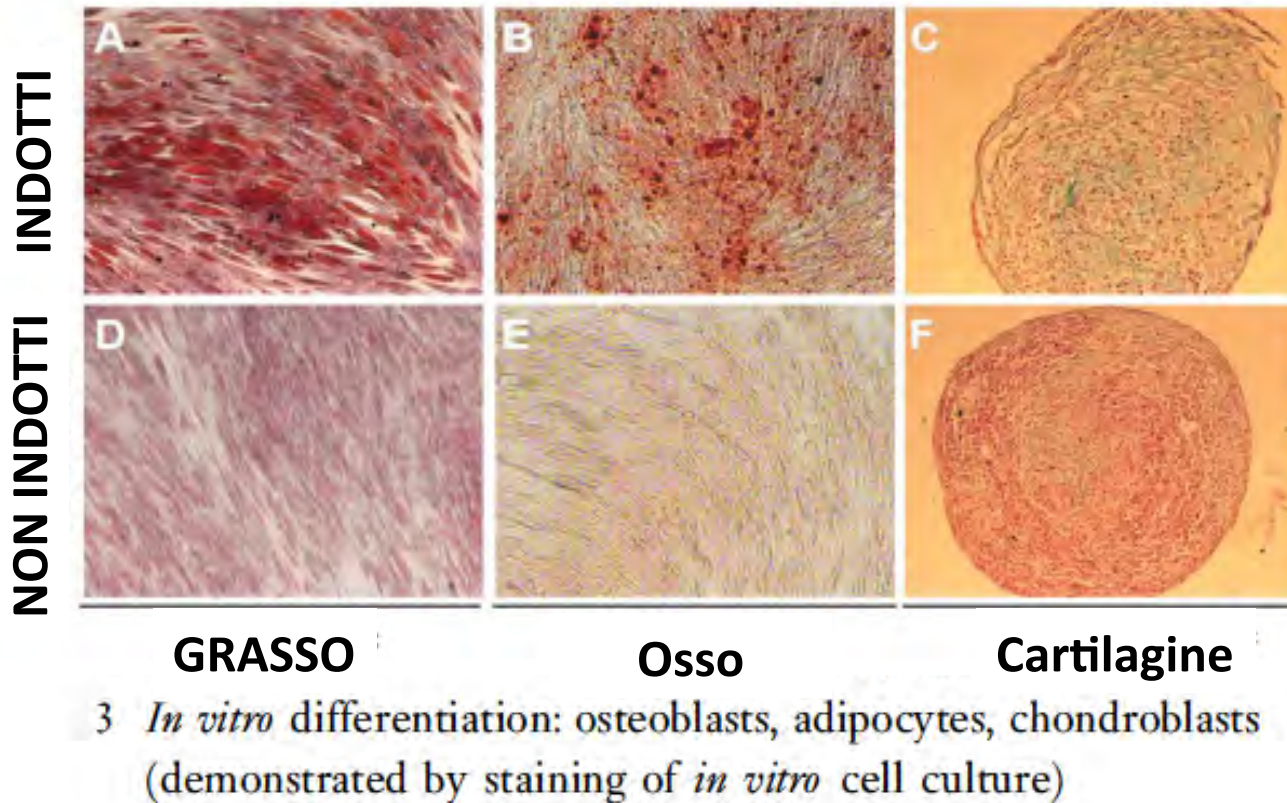
Cellule dell'immunità

# Criteri Dominici & ISCT per Minima Definizione di Staminalità in Cellule Stromali/ Staminali Mesenchimali: LA CAPACITA' DI DIFFERENZIARE

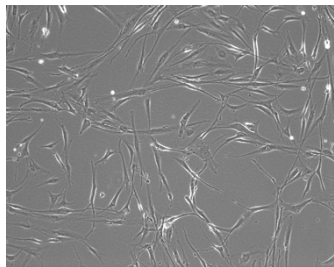
POSITION PAPER

Minimal criteria for defining multipotent  
mesenchymal stromal cells. The International  
Society for Cellular Therapy position statement

M Dominici<sup>1</sup>, K Le Blanc<sup>2</sup>, I Mueller<sup>3</sup>, I Slaper-Cortenbach<sup>4</sup>, FC Marini<sup>5</sup>,  
DS Krause<sup>6</sup>, RJ Deans<sup>7</sup>, A Keating<sup>8</sup>, DJ Prockop<sup>9</sup> and EM Horwitz<sup>10</sup>



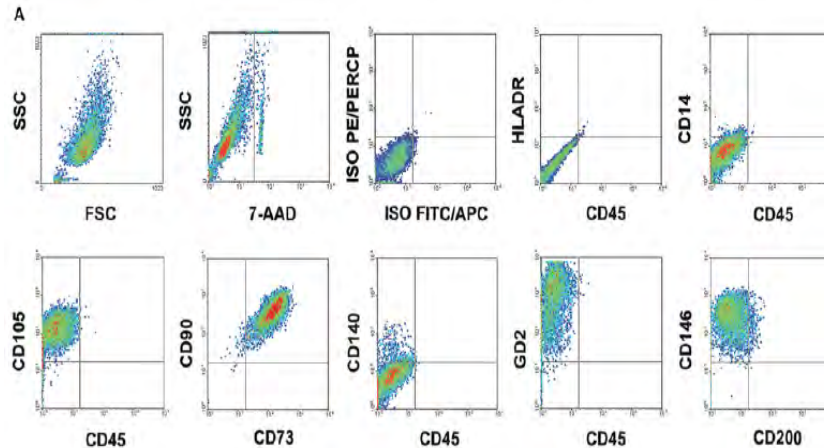
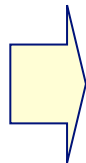
# **Criteri Dominici & ISCT per Minima Definizione di Staminalità: SINTESI**



**Staminali**

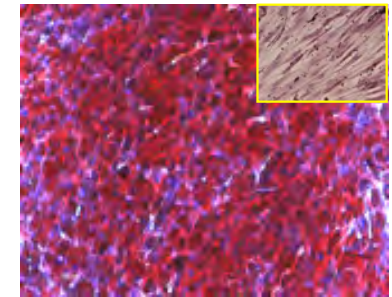
**Adulte**

**In Vitro**

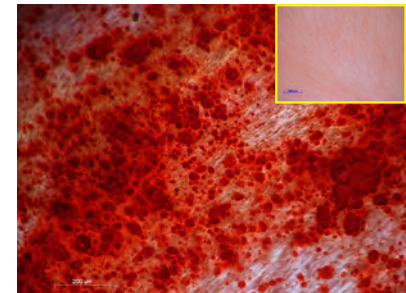


**Fenotipo Immunologico**

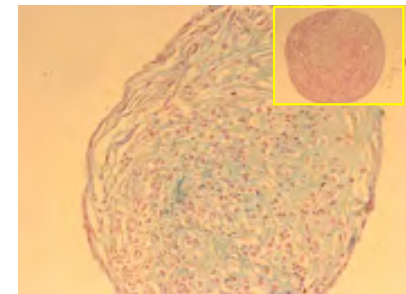
**Appropriato senza Contaminanti**



**GRASSO**



**OssO**



**Cartilagine**

**Capacità di**

**Differenziamento**



# I Criteri Applicati alle cellule “Stamina”

- L’analisi immunofenotipica mostrava una contaminazione fino al **18.8%** di cellule CD45+ (in accordo con quanto visto nell’analisi citofluorimetrica effettuata dall’Istituto Superiore di Sanità) di esse il **61.7%** sono CD14+/HLADR+
- **contaminazione di cellule in grado di generare reazioni mortali**
- Il CD105 appariva inferiore al **15,8%**.
- **Mancanza di marker di staminalità**

LIMITI

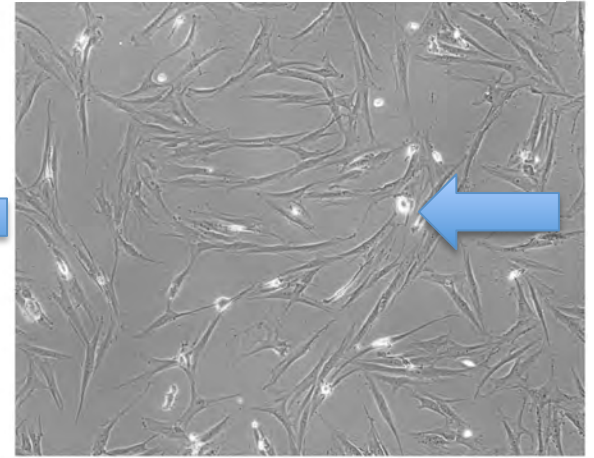
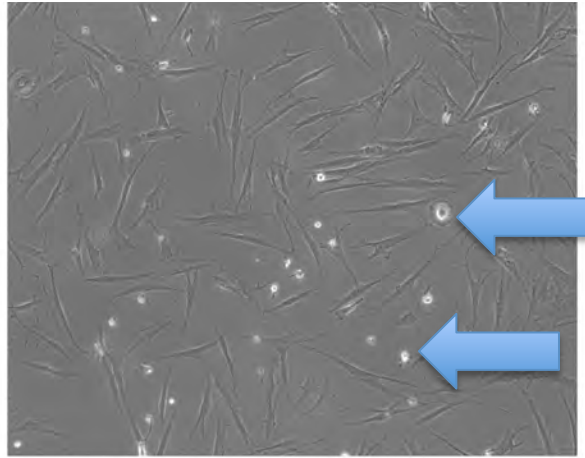
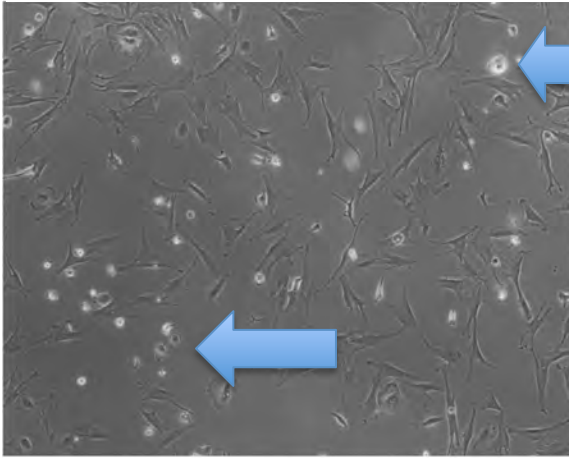
RICONOSCIUTI:

1 Adherence to plastic in standard culture conditions		
2 Phenotype	Positive ( $\geq 95\% +$ )	Negative ( $\leq 2\% +$ )
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 or CD11b
		CD79 $\alpha$ or CD19
		HLA-DR

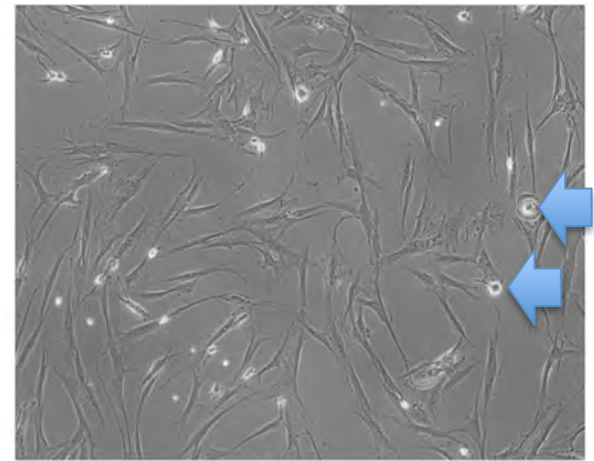
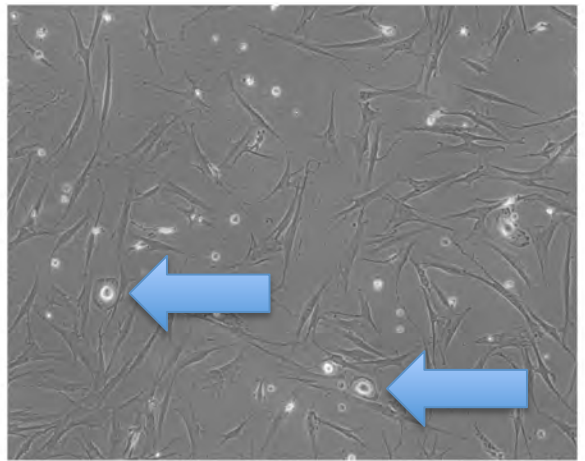
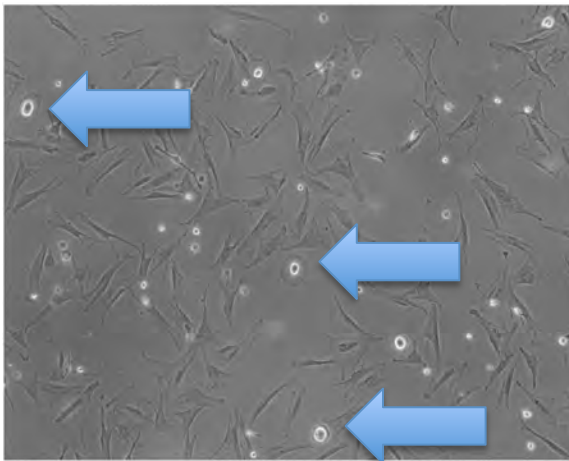


# Anomalie in Coltura: Contaminanti Immunitari

Campione cresciuto con terreno standard privo di siero bovino



Campione cresciuto con “protocollo stamina” ottenuto “brevetto” (con siero bovino)

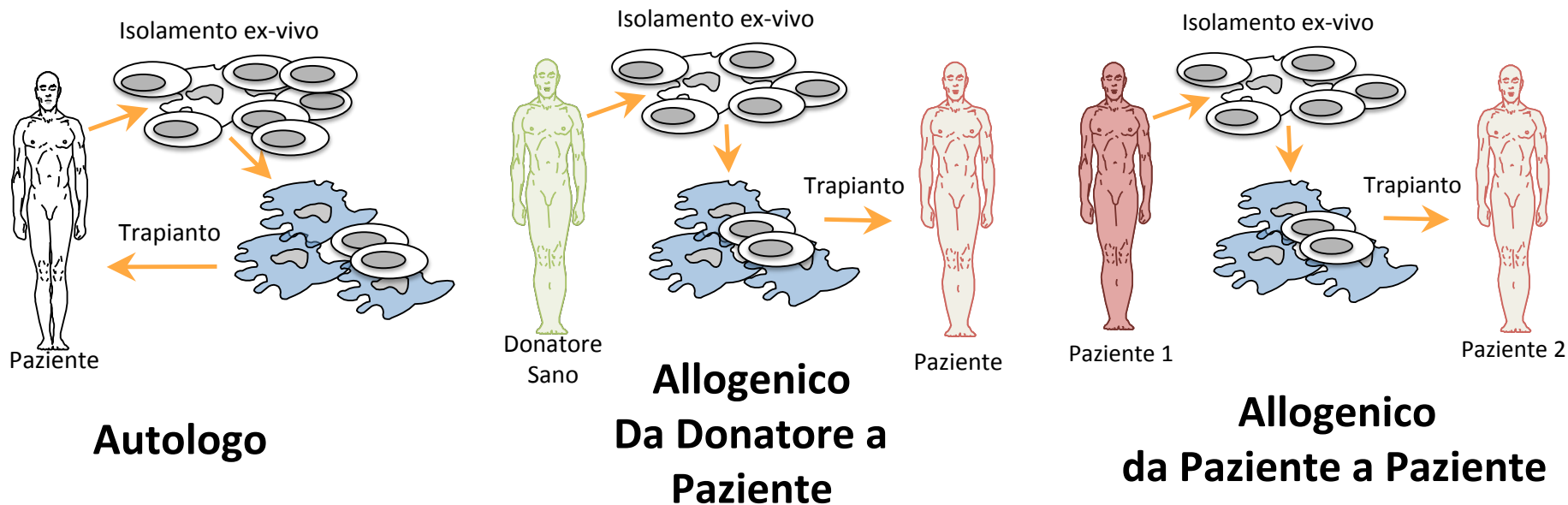


6h POST-SCONGELAMENTO

24h POST-SCONGELAMENTO

48h POST-SCONGELAMENTO

# I Protocolli di Infusione Stamina: il Punto di Vista Immunologico



- Contaminazione di cellule immunità in grado di generare reazioni avverse
- Mancanza di marcatori di staminalità

# UN BIZZARRO ESEMPIO AGLI ATTI: Paziente XY

## “I TRAPIANTI ETEROLOGHI MULTIPLI”



- Contaminazione di cellule immunità in grado di generare reazioni avverse
- Mancanza di marcatori di staminalità

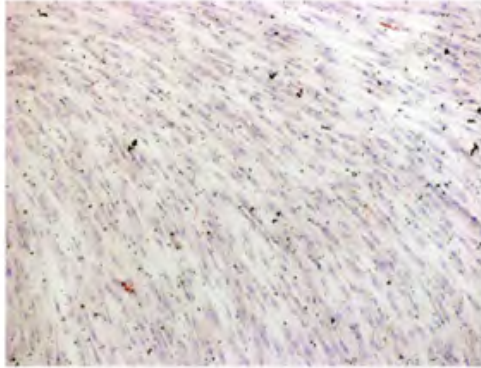


LE “CELLULE STAMINA” DA NOI ANALIZZATE  
MOSTRANO ELEVATI LIVELLI DI CELLULE  
DELL’IMMUNITA’ IN GRADO DI GENERARE  
PERICOLOSE REAZIONI AVVERSE

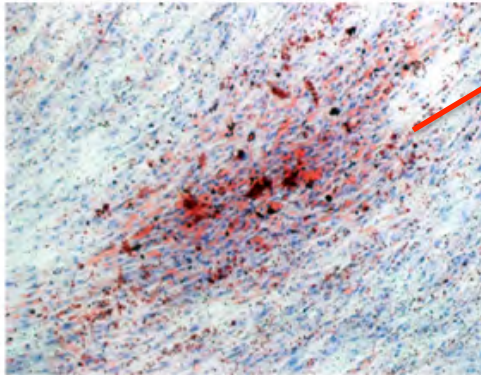


# Anomalie del Differenziamento

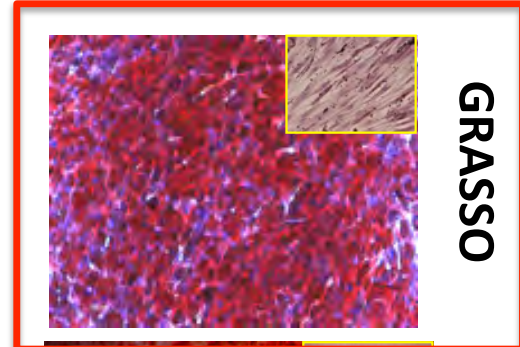
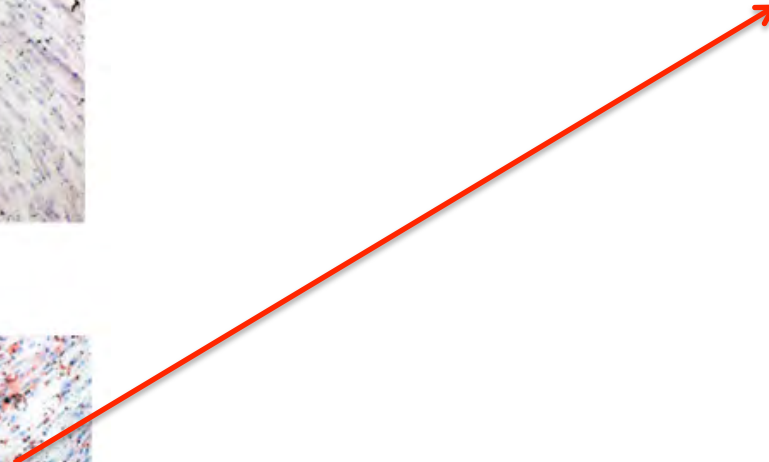
NON INDOTTO



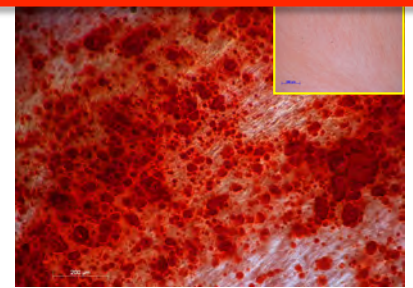
INDOTTO



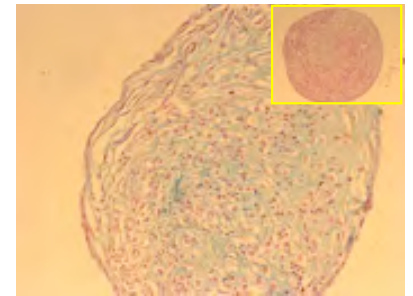
GRASSO CELLULE STAMINA



GRASSO



Osso

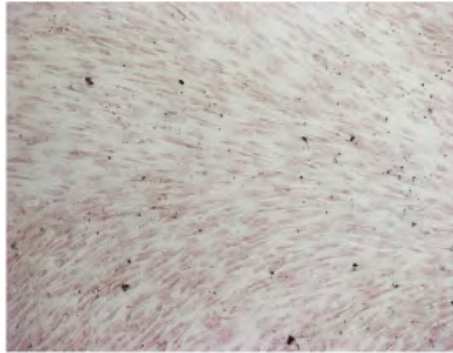


Cartilagine

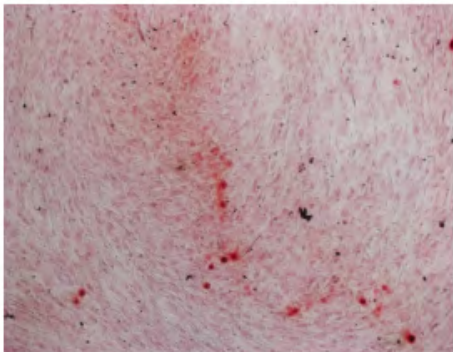
COME DOVREBBE ESSERE

# Anomalie del Differenziamento

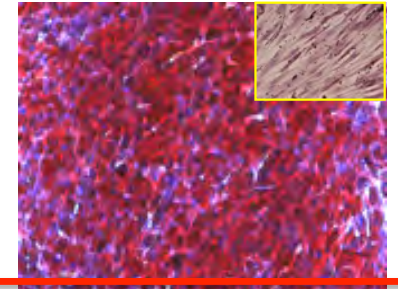
NON INDOTTO



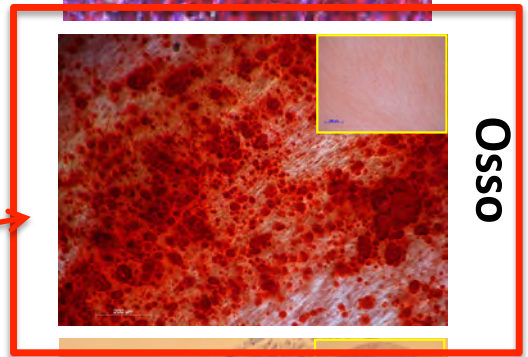
INDOTTO



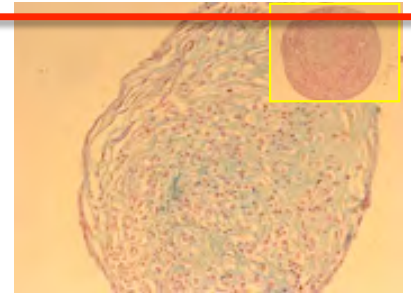
OSSO CELLULE STAMINA



GRASSO



Osso

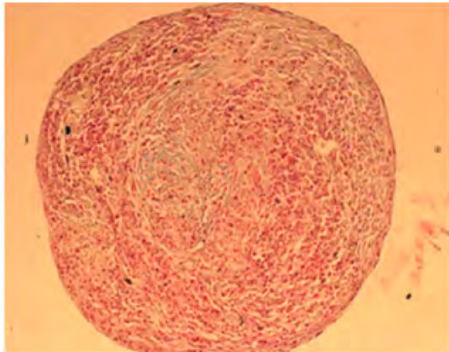


Cartilagine

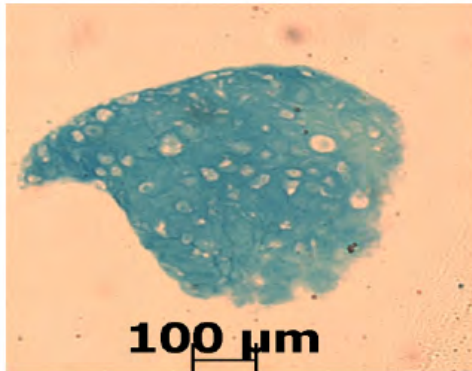
COME DOVREBBE ESSERE

# Anomalie del Differenziamento

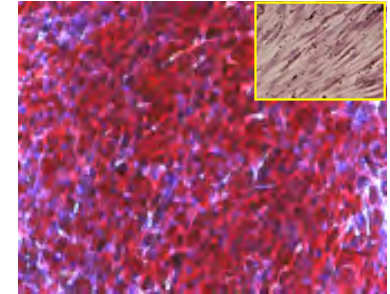
NON INDOTTO



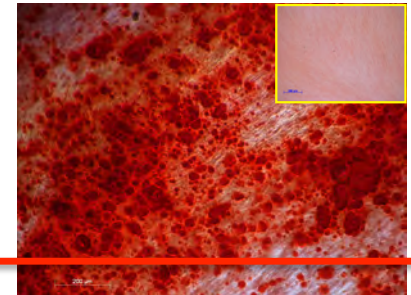
INDOTTO



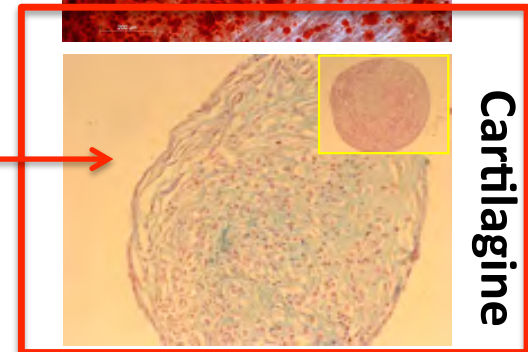
CARTILAGINE CELLULE STAMINA



GRASSO



Osso



Cartilagine

COME DOVREBBE ESSERE

LE CELLULE STAMINA **NON RISPETTANO** LE  
MINIME DEFINIZIONI DI NORMALITA'  
PER CELLULE STAMINALI ADULTE  
QUALI LE CELLULE STROMALI/STAMINALI  
MESENCHIMALI: **NON SONO STAMINALI**

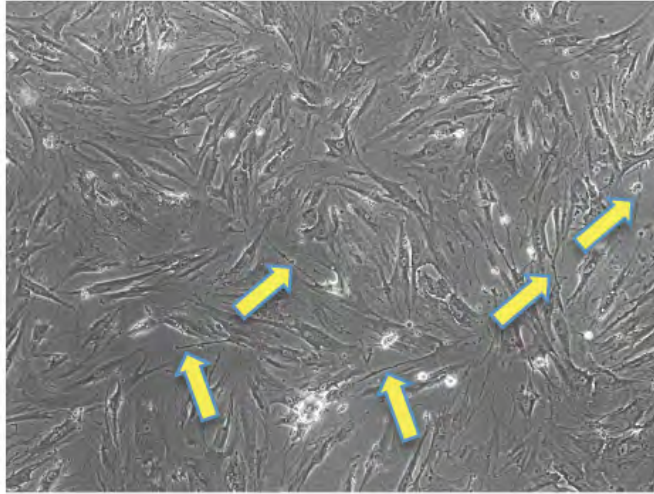


# TENTATIVO DI DIFFERENZIAMENTO “NEURONALE”

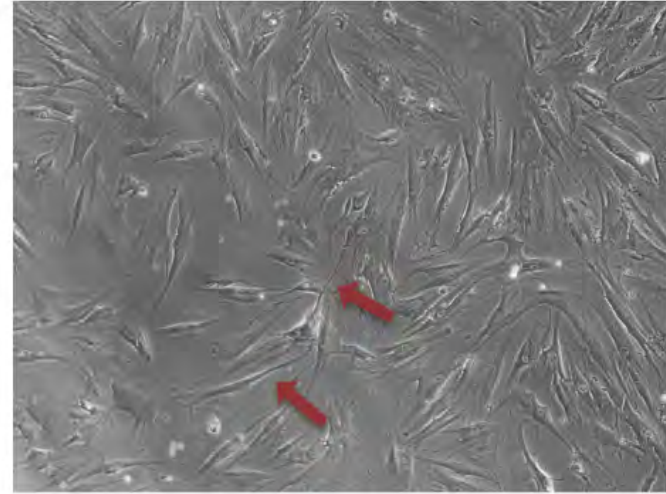
- Al fine di monitorare le capacità differenziative delle cellule in oggetto in senso “neuronal”, dopo 2 passaggi in coltura le cellule sono state indotte secondo il protocollo descritto nel Brevetto US 0149099 del 2012 in capo ai Sig. Vannoni e Molino.
- Secondo il protocollo descritto nel Brevetto US 0149099 del 2012, 6  $\mu\text{l}/\text{ml}$  di una soluzione madre di Acido Retinoico in etanolo 98% (1mg/ml corrispondente a  $3 \times 10^{-3}$  M) sono stati aggiunti al mezzo di coltura (SIERO) per 2 ore
- Al termine delle 2 ore di differenziamento sono state effettuate analisi morfologiche



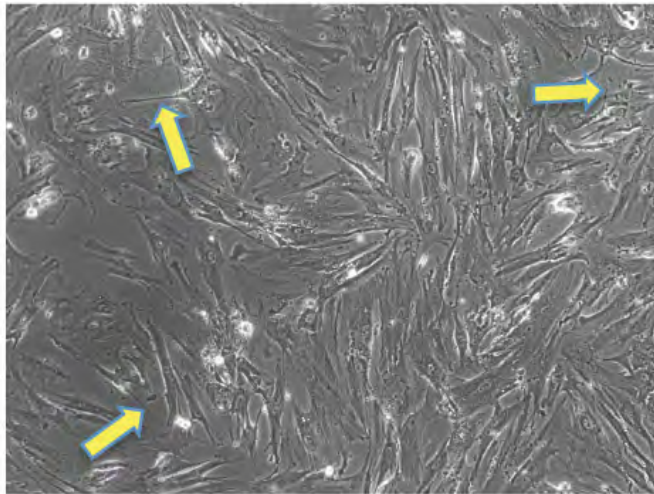
# ARTEFATTI nel Differenziamento “NEURONALE”



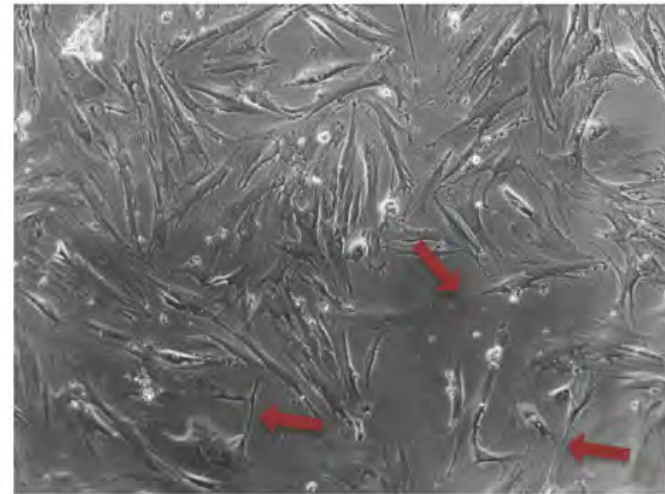
**NON INDOTTO 2 H**



**Acido retinoico INDOTTO**



**NON INDOTTO 2H**



**Acido retinoico INDOTTO**

# ARTEFATTI nel Differenziamento “NEURONALE”

- Dopo 2 ore di induzione **non si sono osservati cambiamenti significativi nella struttura cellulare.**
- Abbiamo osservato strutture simil-dendritiche ed assonali sia nei campioni indotti che nei controlli che apparentemente non appaiono indicative di un divenuto differenziamento. Medesimi risultati sono stati ottenuti alle 24 ore.
- Tuttavia, anche la presenza di un’alterazione morfologica simil-neuronale non pare indicativa di una reale potenzialità rigenerativa tissutale come documentato nei seguenti lavori pubblicati:
  - Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. J Neurosci Res. 2004 Jul 15; 77(2):192-204*
  - Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. J Neurosci Res. 2004 Jul 15; 77(2):174-91.*
  - Chemically-Induced RAT Mesenchymal Stem Cells Adopt Molecular Properties of Neuronal-Like Cells but Do Not Have Basic Neuronal Functional Properties. *Gabriela F. Barnabé, Telma T. Schwindt, Maria E. Calcagnotto, Fabiana L. Motta, Gilberto Martinez, Jr., Allan C. de Oliveira, Leda M. N. Keim, Vânia D’Almeida, Rosália Mendez-Otero, Luiz E. Mello. PLoS ONE. 2009; 4 (4): e5222*





LE CELLULE STAMINA NON RISPETTANO LE  
MINIME DEFINIZIONI DI NORMALITA'  
PER CELLULE STAMINALI ADULTE  
QUALI LE CELLULE STROMALI/STAMINALI  
MESENCHIMALI E NON SONO IN GRADO DI  
GENERARE CELLULE “NEURONALI”

