

**Il nostro lavoro
in questo numero:**

**L'utilizzo delle cellule staminali
per la cura di patologie
oncoematologiche
presso il CTE, ASL di Viterbo**

**Convocata l'assemblea
pre congressuale
dei soci Antel
della Regione Sardegna**

**Il genoma umano:
struttura
e impacchettamento
nei cromosomi**

Il punto . . .

Prologo: All'inizio era il CAOSpoi
IL Caos, nel suo significato originario, è la primigenia mescolanza degli elementi che, secondo alcune cosmogonie, esisteva prima della creazione del mondo,

Oggi tale termine è usato, per definire una qualsiasi situazione particolarmente disordinata e confusa è sinonimo di Babele che definisce in maniera più circostanziata una situazione caratterizzata da un incrociarsi confuso di parole, di discorsi che frastornano.

IL PARLAMENTO DI BABELE

In data 10 Novembre sul Sole 24 ore, il Ministro Clemente Mastella ha ufficializzato la proposta ai rappresentanti di ordini, associazione e sindacati. Lo stesso afferma "è stato fatto un buon lavoro frutto del dialogo e della concertazione con il mondo delle professioni". Il 13 novembre scadranno le osservazioni da presentare al ministro da parte dei rappresentanti delle professioni.

Peccato che a tutto oggi non si sa con chi il ministro abbia realmente concertato la sua proposta e soprattutto dove far pervenire le eventuali osservazioni.

Come accennato nel precedente numero del Lab si sono tenuti gli incontri con CGIL CISL UIL, e con il Ministero della Salute. L'incontro con i sindacati del comparto, si è concretizzato con un intento finalizzato a costruire un percorso comune nello spirito delle leggi 42 del 1999, la 251 del 2000 al fine di ridisegnare un nuovo modello organizzativo che veda protagonista la centralità dell'utente che ovviamente non può far meno della professionalità espressa dalle 22 categorie sanitarie del sistema salute del nostro paese, **era ora dopo cinque anni e più hanno preso visioni delle leggi**, per poi chiedere unitariamente l'applicazione della legge 43/2006 concernente l'istituzione degli ordini professionali come risvolto naturale del processo organizzativo. Quasi nullo l'appuntamento con il Ministero della Salute, rappresentato dall'On. G. Patta, infatti, lo stesso si è limitato a chiederci di condividere le intenzioni del Ministro della Salute On. Livia Turco in merito agli ordini delle professioni sanitarie, e cioè che gli stessi siano di pertinenza solo del ministero della salute e non del guardasigilli On. C. Mastella, come sembrano delinearsi le volontà della maggioranza del governo.

Allo stesso modo c'è stato chiesto di condividere, per quanto riguarda il settore dell'aggiornamento obbligatorio (ECM), il contenuto di una lettera al coordinatore degli assessori regionali alla sanità e assessore al Diritto alla salute della Toscana Enrico Rossi,

"Sono certa, in ragione dei nostri colloqui, che vi sia una larga condivisione anche da parte di diversi esponenti regionali, dell'idea di mantenere un disegno unitario dell'ECM, anche se sussistono differenti opinioni sulle concrete modalità della sua attuazione. Per tale motivo, Ti propongo, in attesa di una compiuta definizione dei ruoli dei diversi attori istituzionali, di individuare al più presto modalità idonee a gestire il periodo transitorio. Le soluzioni individuate potrebbero formare oggetto

di un Accordo Stato-Regioni, che prelude ad uno strumento legislativo, anche di urgenza, con il quale ridefinire i ruoli di ciascun protagonista. Nel frattempo - afferma infine il Ministro- si potrebbe

ipotizzare una proroga della fase sperimentale. ove tale esigenza fosse avvertita anche a livello regionale",

Queste richieste c'inducono a ritenere che il ministro della salute all'interno del governo continua a non aver voce o attendibilità.

Approfittiamo, pertanto, per comunicarvi che i crediti formativi (ECM) per l'anno 2007 sono momentaneamente sospesi, in quanto la sentenza della Corte Costituzionale n. 328 del 2006 riconosce il

diritto delle regioni di svolgere e coordinare gli eventi formativi.

Ovviamente, va da se che fin quando le regioni non hanno organizzato, le procedure per lo svolgimento dei corsi sono in stand-by .

La novità del mese è l'intervista rilasciata al messaggero il 9 Novembre dal ministro della pubblica istruzione On. G. Fioroni che annuncia *"la nascita dell'Ateneo delle professioni sanitarie incorporati dall'ordinamento universitario, utilizzando i fondi ex CIPE, quelli sparsi in altre rivoli della formazione e un finanziamento del 30% da parte delle Regioni. La durata dei corsi andrà da un minimo di due semestri ad un massimo di quattro, ma è mia intenzione progettare corsi triennali .*

Al termine si conseguirà una specializzazione tecnica superiore, in settori produttivi particolarmente richiesti. I settori carenti che le aziende non trovano personale sono quelli di ingegneria meccanica ed elettronica del legno e tutto il settore dei paramedici legato alla salute: Tecnici di laboratorio, infermieri professionali e fisioterapisti."

Il Ministro dovrebbe sapere che noi non pariamo i medici e che la sanità non si regge sulla medico-centricità.

Secondo noi visto che il Ministro non sa cosa sono le professioni sanitarie, e qual è oggi il loro iter formativo è bene che si informi dal suo collega On. F. Mussi e conseguente si affretti a smentire quanto pubblicato, possiamo pertanto arguire, o ipotizzare una nostalgica voglia di creare una società identica a quella degli anni 70.

Altra novità è l'oculatezza dell'On. F. Mussi Ministro dell'Università e Ricerca, Esso, si è dimenticato di avviare la procedura per la revisione dei corsi delle professioni sanitarie come previsto dall'articolo 6 comma 3 del d.l. 30 Dicembre 1992 n 502 e successive modificazioni.

Tutte queste notizie ci sembrano formulare una situazione molto disarticolata come se ci fosse opposizione all'interno del governo, noi sospettiamo come nella genesi all'inizio ERA CAOS e poi arrivò l'ORDINE, ma per chi.....

Vincenzo Troianiello
Tesoriere A.N.Te.L.
(vincenzo.troianiello@tiscali.it)



L'utilizzo delle cellule staminali per la cura di patologie oncoematologiche presso il CTE, ASL di Viterbo



Tesi

Barbara Rocco

“Raccolta e trapianto autologo di cellule staminali presso CTE ASL di Viterbo. Ruolo centrale della citometria a flusso.”

Giovanna Gaetani

“Processazione e crioconservazione delle cellule staminali emopoietiche”.

Daniela Dinarelli

“Controllo di qualità e della capacità emoriconstituente delle unità di cellule staminali autologhe crioconservate.”

Attualmente in Italia è concesso l'utilizzo di cellule staminali emopoietiche (CSE), raccolte da: midollo osseo emopoietico (MO-CSE), sangue cordonale (SC-CSE) e sangue periferico (SP-CSE o PBSC)

L'impiego di tali cellule è finalizzato nella clinica al trapianto autologo e al trapianto allogenico.

Il trapianto autologo prevede l'utilizzo delle cellule staminali emopoietiche del sangue periferico derivanti dallo stesso paziente, mentre nell'allogenico le SP-CSE vengono prelevate da un donatore. La raccolta di CSE finalizzate al trapianto prevede il seguente iter: mobilizzazione, raccolta, manipolazione, congelamento, scongelamento, controllo di qualità e trapianto.

Per garantire la qualità e la sicurezza del prodotto e del paziente, il Parlamento Europeo ed il Consiglio dell'Unione Europea hanno definito le norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani, con la Direttiva 2004/23/CE del 31/03/2004.

La direttiva stabilisce i requisiti minimi a cui gli Stati membri devono far riferimento, requisiti integrabili con le norme sugli emocomponenti a valenza nazionale e regionale.

Su queste basi l'Italia, ed in particolare le singole Regioni, hanno recepito le linee guida e definito gli standard qualitativi per i centri di conservazione e trapianto e la raccolta dei dati relativi a queste attività, su tutto il territorio nazionale.

I nostri studi hanno definito e attuato una procedura sistematica riguardante la raccolta di CSE finalizzata al trapianto, adottata dal

Centro Trapianto Emopoietico (CTE) ASL Viterbo, sulla base delle linee guida stabilite dalla Conferenza tra Stato, Regioni e Province autonome di Trento e Bolzano ed in un contesto generale di codifica dell'intero complesso procedurale, il quale è stato strutturato in un sistema organizzato assimilabile al processo di certificazione di qualità proprio del Sistema ISO 9001-2000.

I progenitori emopoietici CD34+ (antigene di membrana presente su tutte le cellule che fanno parte del compartimento staminale emopoietico) che circolano nel sangue periferico rappresentano una fonte facilmente accessibile di due distinte popolazioni cellulari: i progenitori orientati (committed-CFU-GM) e le cellule staminali. Grazie al trapianto di cellule staminali da sangue periferico si è giunti a ridurre la durata della pancitopenia grave che accompagna i trattamenti submieloablativi da due-tre settimane (quando si reinfondono cellule midollari) a pochi giorni soltanto.

Il motivo della rapida ripresa successiva all'autotrasfusione di progenitori circolanti, sembra dipendere dalla maggiore quantità di progenitori orientati reinfusi nel paziente autotrapiantato. Verosimilmente questi progenitori tardivi dei granulociti e piastrine, sono in grado di giungere a maturazione in pochi giorni, garantendo un precoce supporto ematologico e consentendo al ricevente di sopravvivere all'iniziale fase aplastica che accompagna i trattamenti submieloablativi.

L'importanza clinica dei progenitori circolanti nel ridurre la morbilità e mortalità dei trattamenti ad alte dosi è cresciuta in modo straordinario da quando sono diventati disponibili per uso clinico i fattori di crescita emopoietici

La fase iniziale della terapia trapiantologica prevede la somministrazione dei farmaci chemioterapici, necessari all'eliminazione delle cellule malate, seguita uno o due giorni dopo, in base allo schema chemioterapico utilizzato, dalla somministrazione dei fattori di crescita. Infatti la somministrazione di G-CSF o di GM-CSF, in particolare dopo l'infusione di dosi mielotossiche di chemioterapici che risparmiano la cellula staminale, consente di raccogliere facilmente un quantitativo di CFU-GM da 10 a 100 volte superiore al quantitativo che si può ottenere ricorrendo ad un trapianto di midollo osseo.

La mobilizzazione delle CSE deve essere quotidianamente monitorata attraverso il conteggio con metodica citofluorimetrica (ISHAGE) delle CD34+. Il monitoraggio delle CD34+ avviene a partire dal giorno +8 e dal giorno +3 in caso di mobilizzazione con il solo fattore di crescita.

La raccolta delle CSE viene effettuata nella fase di recupero ematologico post-chemioterapia quando si raggiungono determinati parametri ematometrici ed in particolare le CD34+ > 15x10³/ml. E' noto che non si riesce ad ottenere un sicuro e permanente attecchimento trapiantando meno di 1,5-2 milioni di CD34+/kg. Esiste attualmente un generato consenso sull'adeguatezza della dose di 5 milioni di C34+/kg, che sembra garantire un rapido e permanente attecchimento nella maggior parte dei casi.

Per la raccolta dei progenitori emopoietici, nel CTE ASL Viterbo, vengono utilizzate tecniche di leucoferesi, mediante separatori cellulari a flusso continuo. Nel 2005 sono stati sottoposti a mobilizzazione e raccolta, 13 pazienti, di cui 9 con mieloma multiplo, 1 con leucemia mieloide acuta, 2 con leucemia linfatica cronica a cellule B e 1 linfoma non Hodgkin. Nella maggior parte dei casi le raccolte aferetiche hanno raggiunto i valori minimi previsti di CD34+, utili per il trapianto autologo.

Tali cellule vengono processate e crioconservate durante il periodo di

Non sei ancora iscritto all'ANTeL ?

Aderisci subito, dai forza alla tua professione

Omnes eodem cogimur

(siamo tutti sospinti verso la stessa meta)

Orazio, odi I,28,15,

Vai sul sito www.antelregionelazio.com scarica il modulo da inviare via fax al n°0677204852

terapia sovramassimale a cui è sottoposto il paziente e fino al momento in cui è pronto per la reinfusione, quindi al trapianto.

Presso il CTE dell'ASL di VT è stata creata una struttura adeguata ed organizzata ad eseguire le procedure che completano il processo di raccolta delle CSE. Tali procedure, riportate approfonditamente nel Manuale delle Procedure, costituiscono un insieme eterogeneo che definisce la quantità delle CSE nel sangue periferico del paziente o donatore e nella raccolta di CSE, le modalità di manipolazione per la reinfusione immediata delle CSE, le modalità di manipolazione propedeutiche alla criopreservazione, le modalità di criopreservazione e conservazione e la valutazione della vitalità delle CSE criopreservate. La finalità di queste procedure è quella di definire il potenziale emoricostituente delle CSE e di permetterne l'uso clinico in trapiantologia come prodotto fresco o criopreservato.

Le procedure di manipolazione minima prevedono una concentrazione del volume dell'unità raccolta e comprendono:

- Rimozione del plasma;
- Rimozione delle emazie;
- Preparazione del buffy-coat mediante rimozione del plasma e delle emazie
- Preparazione della frazione mononucleata mediante centrifugazione in gradiente di densità;
- Criopreservazione del buffy-coat o della frazione mononucleata;
- Deplezione di una o più popolazioni di cellule (selezione negativa);
- Arricchimento di una o più popolazioni di progenitori emopoietici (selezione positiva).

Durante i nostri studi abbiamo definito e messo in atto sia metodiche manuali che automatiche, che impiegano tecniche sterili e forniscono progenitori emopoietici vitali in quantità considerate adeguate, in relazione alle aggiornate conoscenze scientifiche.

Le metodiche di criopreservazione impiegate prevedono l'utilizzo di una soluzione di dimetilsolfossido (DMSO) in mezzo proteico (plasma/albumina), di un sistema di discesa controllata della temperatura, e di contenitori criogenici per la conservazione a temperature generalmente inferiori a -120°C .

Durante le fasi di attuazione di tali procedure si sono affrontati e risolti con successo le variabili analitiche associate al congelamento di cellule e tessuti (velocità di raffreddamento, concentrazione dei crioprotettori, problemi osmotici).

La conservazione dei prodotti criopreservati avviene in appositi

contenitori criogenici in cui le unità possono essere conservate a lungo termine (anche più di 5 anni) nell'azoto in fase liquida (-196°C).

Durante l'ultimo semestre sono state attuate le suddette procedure a 7 unità aferetiche. Le caratteristiche di congelamento e conservazione dimostrano il rispetto dei parametri ottimali di criopreservazione in tutti i casi, con la produzione di Unità di CSE criopreservate, con capacità emoricostituente documentabile dai risultati del controllo di qualità.

Infatti presso il CTE dell'ASL di VT le PBSC criopreservate, prima della reinfusione, vengono sottoposte ad un importante controllo di qualità, rappresentato dal test di vitalità cellulare. Tale test di vitalità viene effettuato in quanto è la più importante variabile clinica che determina il successo o il fallimento del trapianto. La valutazione di vitalità delle cellule staminali viene determinata nel nostro caso con tecniche di citometria a flusso. La metodologia e la standardizzazione è stata dettata dal protocollo analitico ISHAGE, permettendo l'identificazione e l'enumerazione delle CD34+ mediante gate logico, un sistema di filtrazione logica o sequenziale con il quale si arriva alla definizione dei veri PBSC. Tale protocollo prevede l'utilizzazione del fluorocromo 7 Amino-Actinomicina D per andare a identificare le PBSC scongelate che sono andate incontro ad apoptosi o morte.

Nel CTE dell'ASL di Viterbo il test di vitalità è previsto a 1 mese e a 6 mesi dal congelamento e 10 giorni prima di effettuare il trapianto, su campioni di 1 mL posti in criotubi criopreservati insieme alle sacche contenenti le PBSC da reinfondere. Il test di vitalità è stato effettuato su 4 unità di PBSC scongelate e la vitalità variava dal 98% al 100%. Tutte le unità valutate sono state reinfuse e trapiantate con recupero emopoietico rapido e completo su tutti i pazienti.

La verifica della vitalità delle CSE in fase precoce nel processo trapiantologici, permette la somministrazione della chemioterapia mieloablattiva solo quando sia stata preventivamente verificata la preservata attività emopoietica del congelato

L'applicazione di queste procedure codificate, permette un controllo sistematico delle operatività e un sistema finalizzato a garantire il permanente controllo di qualità.

Il sistema quindi, appare come una metodologia irrinunciabile nel garantire un prodotto terapeutico controllato ed appropriato, il cui risultato clinico deve necessariamente esitare nell'attività di rapida emo-ricostituzione, in soggetti la cui malattia risulta curabile con il trapianto.

B. Rocco , G. Gaetani, D. Dinarelli

avviso

A.N.TE.L

V. EMANUELE FILIBERTO, 125 ROMA

**Assemblea pre congressuale
Regione Sardegna**

**Si invitano
tutti i soci A.N.Te.L
a partecipare
all'assemblea pre congressuale.
Sarà presente
il presidente Nazionale Daniela Ciuffi
unitamente al tesoriere Vincenzo Troianiello**



TEL / FAX
0677204852
WWW.ANTELO.NLINE.IT

Data: 10/01/2007
Ora: 15.30

**Presso, ospedale San Giovanni di Dio
ASL 8 Cagliari,
aula istituto anatomia patologica.
Via Ospedale 46**

IL GENOMA UMANO : STRUTTURA E IMPACCHETTAMENTO NEI CROMOSOMI



IL DNA (Acido desossiribonucleico) è la molecola fondamentale della vita.

All'interno di esso sono contenute tutte le istruzioni necessarie per far funzionare un organismo vivente, qualsiasi esso sia: uomo, gallina, lombrico o pioppo.

La scoperta del DNA risale al 1869 ed è attribuibile a Johann

Friedrich Miescher, biochimico svizzero. Le sue analisi mostrarono che il DNA è una molecola acida e ricca di fosforo.

Solo nel 1953, con James Watson e Francis Crick fu dimostrato che nelle cellule viventi, due catene di DNA sono avvolte a formare una doppia elica.

Il DNA è un polimero lineare non ramificato costituito da:

- **un pentoso:** 2'-deossiribosio, zucchero composto a 5 atomi di carbonio. Il nome: 2'-deossiribosio, indica che questo particolare zucchero è un derivato del ribosio in cui il gruppo idrossilico (OH) legato al carbonio 2' del ribosio è stato sostituito da un gruppo idrogeno.
- **una base azotata:** citosina e timida (pirimidine a singolo anello), adenina e guanina (purine a doppio anello). La base è legata al carbonio 1' dello zucchero con un legame -N-glicosidico con l'azoto numero 1 delle pirimidine o con il numero 9 delle purine.
- **un gruppo fosfato,** che comprende una, due o tre unità di fosfato legate al carbonio 5' del pentoso. I fosfati sono denominati α , β , γ a seconda della loro vicinanza allo zucchero, con α -fosfato direttamente legato al pentoso.

Una molecola composta soltanto da zucchero e base prende nome di **nucleoside**, una molecola composta da zucchero, base, fosfato, prende nome di **nucleotide**.

I nucleotidi possono essere mono, di o tri fosfati, ma solo questi ultimi reagiscono come substrati per la sintesi del DNA.

L'unità fondamentale del DNA è il nucleotide e l'insieme di queste unità, legate mediante legami fosfodiesterici tra gli atomi di carbonio 5' e 3', costituisce la lunga catena polinucleotidica.

Le due estremità di un polinucleotide sono chimicamente distinte: una porta sul carbonio 5' un gruppo trifosfato che non ha reagito, l'altra porta sul carbonio 3' un gruppo idrossilico che non ha reagito. Ciò significa che il polinucleotide ha una direzione chimica espressa come 5' - 3' oppure 3' - 5'. Una conseguenza importante della polarità dei legami fosfodiesterici è che la reazione chimica necessaria per estendere un polimero in direzione 5' - 3' è diversa da quella richiesta per generare un'estensione 3' - 5'. Tutti gli enzimi DNA polimerasi naturali sono in grado di realizzare esclusivamente una sintesi 5' - 3'.

La doppia elica è destrorsa ed i due filamenti corrono in direzione antiparallela. L'elica è stabilizzata da 2 tipi di interazioni chimiche:

- l'appaiamento delle basi, che implica la formazione di legami di tipo idrogeno e che avviene tra una purina ed una pirimidina;
- l'impilamento delle basi, chiamato interazione π - π , che comporta interazioni idrofobiche tra coppie di basi adiacenti che aumenta la stabilità della doppia elica quando i filamenti sono appaiati.

La doppia elica è dotata di flessibilità strutturale ed i cambiamenti conformazionali più importanti riguardano la rotazione attorno al legame -N-glicosidico che cambia l'orientamento della base rispetto allo zucchero e la rotazione attorno al legame tra gli atomi di carbonio 3' e 4'.

Tutti gli organismi eucarioti posseggono genoma nucleare e mitocondriale.

Il **genoma mitocondriale** è una molecola di DNA circolare di 16.569 nucleotidi le cui copie sono localizzate nei mitocondri, organuli presenti nel citoplasma cellulare deputati a generare energia. Questo tipo di genoma contiene soltanto 37 geni: tredici codificano proteine coinvolte nella catena respiratoria, la via biochimica principale dei mitocondri; gli altri 24 specificano molecole di RNA non codificante necessarie per l'espressione del genoma mitocondriale. questi geni non contengono introni, diversamente da quelli del DNA nucleare.

Il **genoma nucleare** è una molecola di 3.200.000.000 nucleotidi contenente dai 30.000 ai 40.000 geni per la metà dei quali è già specificata la funzione: la maggior parte dei geni sono coinvolti nell'espressione, mantenimento e replicazione del genoma; il 20% sono coinvolti nella traduzione del messaggio, mentre circa il 17% hanno funzioni di enzimi..

Il genoma nucleare degli eucarioti è organizzato in due o più molecole lineari, dette **cromosomi**. L'unica variabilità del genoma eucariotico risiede nel numero dei cromosomi, che non sembra essere legato alle caratteristiche biologiche dell'organismo, né tantomeno alle dimensioni del genoma.

I cromosomi sono molto più corti delle molecole di DNA che contengono: in media un cromosoma umano contiene poco meno di 5 cm. di DNA. E' quindi necessario un sistema di impacchettamento altamente organizzato per far rientrare una molecola di DNA nel suo cromosoma. Il DNA infatti è associato a proteine chiamate **istoni** distribuite regolarmente lungo tutto il DNA. Il complesso DNA-istoni, prende nome di **cromatina**. Le proteine istoniche formano perle proteiche (struttura a filo di perle) o **nucleosomi** ciascuno dei quali contiene 8 molecole proteiche istoniche, 2 per ogni istone (H2A, H2B, H3, H4). Queste otto proteine costituiscono un ottamero "core" con il DNA avvolto intorno due volte. Alla particella nucleosomica sono associate - a seconda della specie- tra le 140 e 150 bp di DNA e ciascun cromosoma è separato da 50-70 bp di DNA di connessione "linker". Oltre a quelli dell'ottamero, esiste poi un gruppo di istoni chiamati "linker". a ciascun nucleosoma è attaccato un singolo istone linker, a formare il cromatosoma.

L'istone linker funge da morsa ed impedisce al DNA avvolto di staccarsi dal nucleosoma.

La struttura a "filo di perle" è una forma di impacchettamento, ma non l'unica. Esiste infatti una forma di impacchettamento più condensata, chiamata fibra di 30nm (di circa 30nm di spessore).

Il modello che trova maggior consenso in questa versione è la struttura solenoide.

Singoli nucleosomi all'interno della fibra di 30nm sono tenuti insieme da interazioni tra gli istoni linker oppure i legami coinvolgono gli istoni del "core", le cui code proteiche si estendono fuori dal nucleosoma. Modificazioni chimiche di queste code causano l'apertura della fibra di 30nm, permettendo l'attivazione dei geni in essa contenuti.

La fibra di 30nm è probabilmente il principale tipo di cromatina presente nel nucleo durante l'interfase, che è il periodo tra le divisioni cellulari. Quando il nucleo si divide, il DNA assume una forma di impacchettamento più compatta che risulta nei cromosomi metafisici.

I cromosomi metafisici si formano nello stadio del ciclo cellulare successivo alla replicazione del DNA, per cui ciascuno contiene due copie della propria molecola di DNA cromosomale.

Nunzia Piumelli

