



scienza attiva®

Cenni alla scienza di base e tipologie di cellule staminali

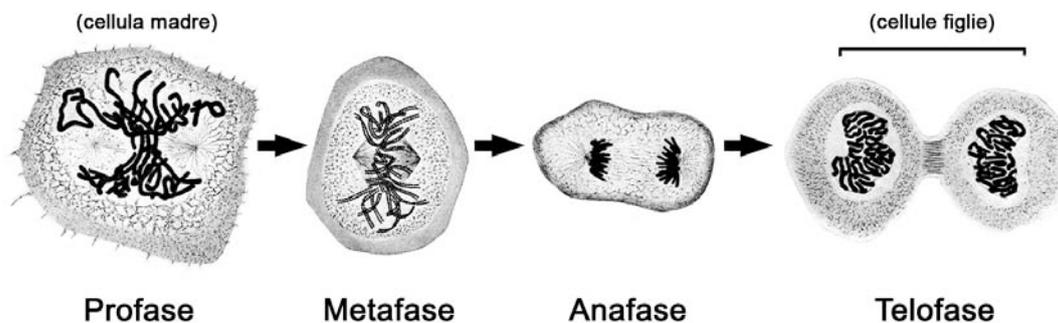
(Luca Bonfanti e Luciano Conti)

Parte introduttiva generale

Cosa sono le cellule staminali

Definizione: si dicono *staminali* «alcune cellule in grado di autorinnovarsi indefinitamente, rimanendo indifferenziate ma dando origine a una progenie di cellule specializzate».

Per capire il concetto di *staminalità*, occorre innanzitutto chiarire cosa si intende per *autorinnovamento* e per *differenziamento*. L'**autorinnovamento** è una divisione cellulare che consente di mantenere le caratteristiche della cellula madre. La divisione cellulare consiste sostanzialmente in una duplicazione del patrimonio genetico di una cellula (DNA) seguita dalla scissione in due cellule figlie.

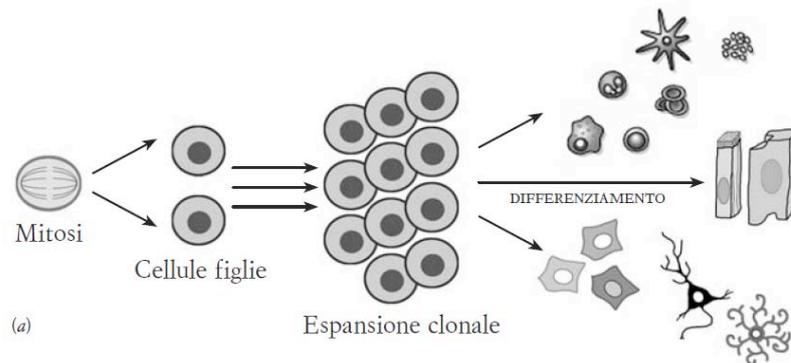


Proliferazione cellulare. In quattro fasi consecutive una cellula madre duplica il DNA e poi si divide generando due cellule figlie identiche (in nero, i *cromosomi*).

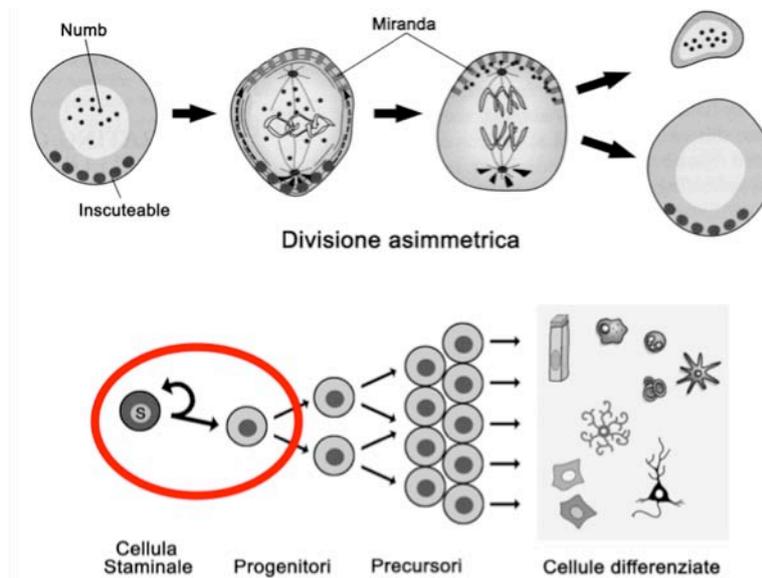
La maggior parte delle divisioni cellulari porta a un aumento del numero di cellule, tutte uguali. Ma se fosse sempre così non si potrebbero raggiungere la diversità e la complessità tipiche degli organismi. Infatti, tutte le cellule del corpo, di qualunque tipo esse siano, rappresentano la progenie di un'unica cellula uovo fecondata: lo zigote; cioè derivano da innumerevoli divisioni cellulari che si sono susseguite a partire da quella cellula primordiale (vedi sotto). In questo processo di costruzione dell'organismo, a un certo punto le cellule potranno scegliere strade diverse, sostanzialmente: replicarsi ancora, oppure, come più spesso accade, iniziare a differenziare.



Il **differenziamento** è una trasformazione che a un certo punto porta una cellula giovane ad acquisire caratteristiche strutturali, molecolari e funzionali specifiche (diverse da quelle della cellula madre), facendole rientrare in uno dei tipi cellulari specializzati che compongono i tessuti (globuli rossi, neuroni, cellule dell'osso, della pelle, ecc.).



Come dice la definizione riportata all'inizio, una cellula staminale è in grado di garantire *allo stesso tempo* l'auto-rinnovamento e il differenziamento. Il modo più classico per fare questo è la divisione asimmetrica. I concetti espressi sopra sulla divisione cellulare sono infatti un po' più complessi, poichè le divisioni possono essere *simmetriche* o *asimmetriche*. Le divisioni simmetriche hanno come risultato cellule identiche (clonazione cellulare). Quelle asimmetriche sono tipiche delle cellule staminali, producendo una cellula destinata a differenziare (cioè diversa dalla cellula madre) e una cellula identica alla madre (cioè ancora staminale). In questo modo l'auto-rinnovamento è garantito, e allo stesso tempo si crea una progenie di cellule differenziate.



Nella divisione cellulare *asimmetrica* alcuni componenti cellulari vengono segregati in modo diverso nelle due cellule figlie, per cui esse *non* saranno identiche. Una delle due cellule figlie potrà iniziare a differenziare mentre l'altra rimane una cellula staminale con le stesse caratteristiche della madre (perpetuando così la staminalità).

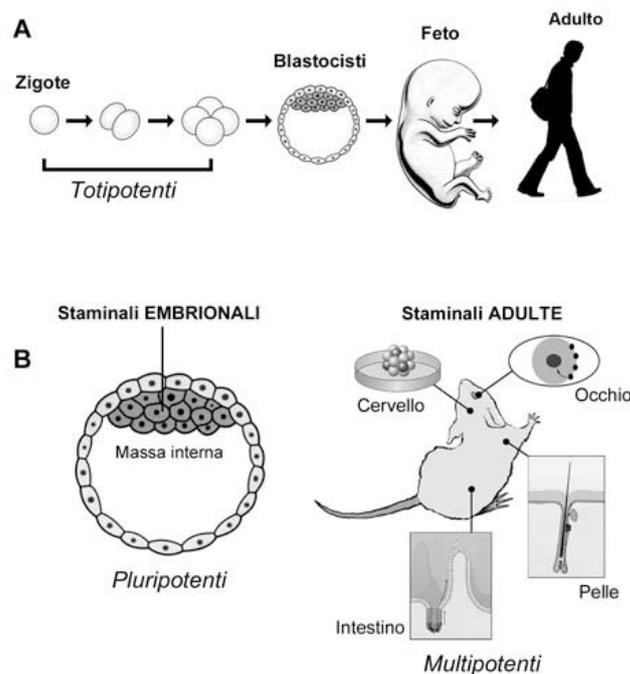


Questa prima parte introduttiva dovrebbe consentire di *non* confondere tutte le cellule proliferanti con le staminali. Inoltre, introduce il concetto che nell'organismo possono coesistere cellule «giovani» (indifferenziate, ancora in grado di dividersi) e cellule «mature» (differenziate, che hanno cessato di moltiplicarsi). In altri termini, il differenziamento diventa quasi sempre incompatibile con la mitosi; tuttavia, tra le cellule mature possono esistere cellule in attiva proliferazione.

Dove si trovano le staminali

Nell'embrione moltissime cellule sono in attiva proliferazione, in quanto esse sono necessarie alla *formazione* dell'organismo. In un feto o in un neonato la percentuale di cellule in attiva divisione sarà minore, pur restando su livelli significativi al fine di garantire l'*accrescimento* degli organi e dell'individuo. Nell'organismo adulto, anche una volta terminato l'accrescimento, la proliferazione sarà importante per il *mantenimento* dei tessuti (rinnovamento cellulare). Pertanto, in ogni momento della vita di un organismo pluricellulare coesisteranno cellule con diverso grado di differenziamento, ma la loro quantità relativa e la loro disposizione spaziale saranno variabili.

Nell'adulto le cellule proliferanti sono concentrate in zone molto ristrette, che contengono anche cellule staminali. L'insieme di queste cellule costituisce gli *strati germinativi* di quei tessuti in grado di rinnovarsi continuamente (tessuti **labili**, come il sangue, l'epitelio intestinale, la pelle, ecc.). In genere, i tessuti labili sono anche in grado di rigenerare dopo una lesione.





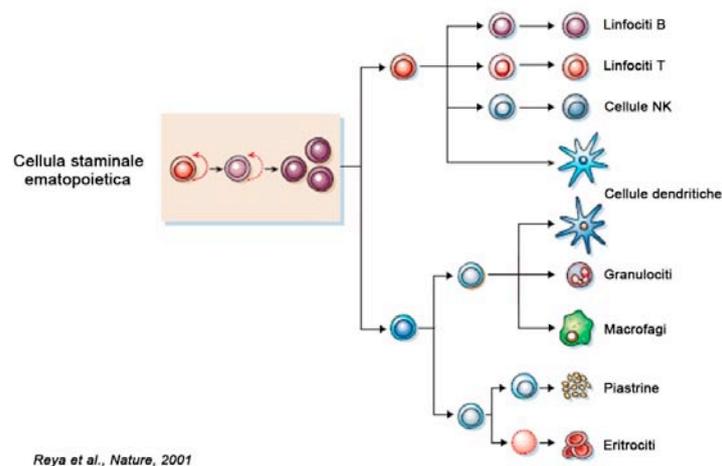
Cellule staminali embrionali e adulte

In base a quanto detto sopra, è più chiaro come siano state definite diverse categorie o 'tipi' di cellule staminali: le staminali *embrionali* e le staminali *somatiche*, a loro volta distinte in *fetali* e *adulte*. Questa distinzione non si basa solo sulle variabili finora descritte (che definiscono dove e quando le possiamo trovare in un organismo), ma anche su un'altra caratteristica: la *potenzialità*.

La potenzialità di una cellula indica «che cosa essa può fare» in riferimento non alla sua specializzazione (cioè alla sua funzione di cellula della pelle o dell'osso, ecc.), bensì al *tipo di progenie* che può generare. Ad esempio, la specializzazione del globulo rosso è fissare l'ossigeno, ma dal momento che si tratta di una cellula completamente differenziata la sua potenzialità è uguale a zero. All'altro estremo c'è lo zigote, che, avendo potenzialità massima (può generare tutti i tessuti dell'organismo e anche la placenta), è detto *totipotente*. Tra questi due estremi ci sono le vie di mezzo, rappresentate dalle cellule *pluripotenti* (staminali embrionali) e quelle *multipotenti* (staminali somatiche: fetali e adulte).

Le cellule staminali **embrionali** (conosciute anche con la sigla ES, da Embryonic Stem cells) sono contenute nella massa interna della *blastocisti* (il primo, microscopico abbozzo dell'embrione) e sono in grado di dare origine a tutti i tessuti dell'organismo, tranne la placenta (pluripotenza). Sono state isolate inizialmente dall'embrione del topo, ma a partire dal 1998 è possibile ottenerle anche da embrioni umani.

Le cellule staminali **somatiche** (tessuto-specifiche) corrispondono a stadi più avanzati dello sviluppo. Le staminali adulte si trovano in vari organi, in genere in sedi istologicamente ben definite, dove formano i cosiddetti *compartimenti staminali*, da cui garantiscono il rinnovamento di alcuni elementi cellulari. In altri termini, sono cellule indifferenziate che si trovano in un tessuto differenziato e sono *multipotenti*, ovvero potenzialmente in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari di *quel* tessuto. In teoria, anche le cellule staminali adulte possono auto-rinnovarsi per l'intera vita dell'individuo, e questa condizione di virtuale «immortalità» è uno dei principali elementi alla base del loro fascino. La presenza di compartimenti staminali attivi negli organismi adulti apre interessanti prospettive sperimentali e terapeutiche della cosiddetta *medicina rigenerativa*. È bene tuttavia ricordare che queste cellule hanno un limite: una potenzialità più ristretta.

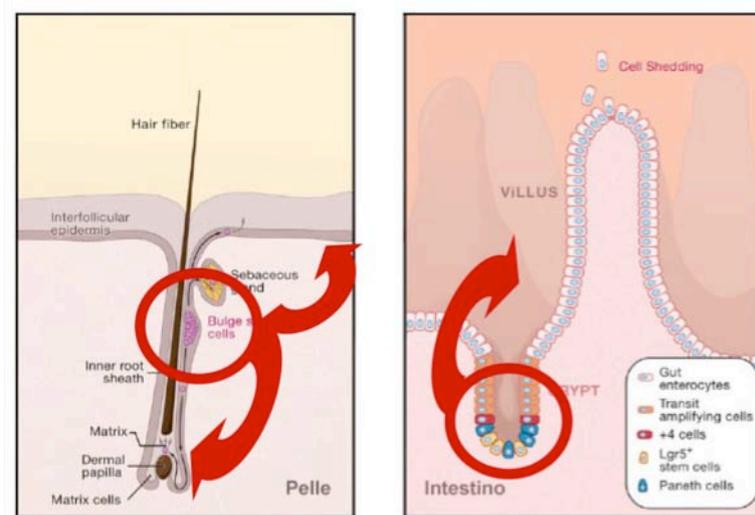


La cellula staminale ematopoietica, contenuta nel midollo osseo, è un tipico esempio di cellula staminale adulta *multipotente*. Essa è infatti in grado di generare tutti i tipi cellulari del sangue per l'intera vita dell'individuo.



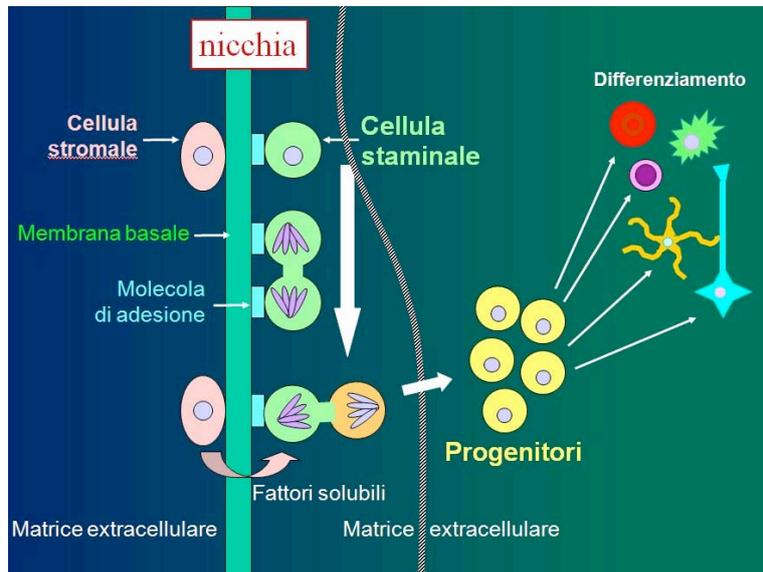
La nicchia staminale

Le nicchie staminali rappresentano il complesso *microambiente* in cui si trovano le cellule staminali dei vari organi, in grado di regolarne il comportamento e il destino. Esse rappresentano piccole regioni dei tessuti in cui le cellule staminali vengono relegate al termine dello sviluppo e in cui si continua a compiere il processo della divisione cellulare. Nel sistema nervoso vi sono solo due nicchie staminali mentre in organi contenenti tessuti labili, come la pelle o l'intestino, ve ne sono a milioni. In altri organi, come il fegato e il rene, le nicchie non sono ancora ben caratterizzate, e in alcuni casi se ne dubita l'esistenza.



Due esempi di nicchia staminale (nei cerchi): quella della *pelle* (in prossimità del follicolo pilifero) e quella dell'*intestino* (all'interno delle ghiandole intestinali, cripte). Dalla nicchia, i progenitori neogenerati raggiungono il resto dell'epitelio (frecche), rinnovandolo (sostituzione delle cellule morte).

In generale, l'ambiente all'interno della nicchia staminale ricrea alcune condizioni esistenti nell'embrione. Tali condizioni, tuttavia, non sono identiche a quelle embrionali, ma sono in qualche modo adattate al tessuto maturo, acquisendo caratteristiche diverse in vari tessuti ed organi. Esistono comunque caratteri comuni a tutte le nicchie: la presenza di una membrana basale e di cellule 'stromali' che influenzano l'attività delle staminali. Nella nicchia, i rapporti cellulari, sia nel senso di contatti fisici che di interazioni molecolari, sono fondamentali nel regolare l'attività delle cellule staminali. Quando le cellule figlie (progenitori) escono dalla nicchia, in genere per migrazione, si trovano in un ambiente diverso e possono cominciare a differenziare.



I principali componenti di una nicchia staminale (a sinistra). Vari fattori, tra cui contatti cellulari, membrana basale, molecole rilasciate dalle cellule, e molecole della matrice extracellulare, contribuiscono a creare il microambiente in cui vengono regolate le divisioni cellulari simmetriche e asimmetriche delle staminali. Una volta uscite dal compartimento della nicchia, le cellule progenitrici si trovano nell'ambiente del tessuto maturo (a destra) e possono andare incontro a differenziamento.

Riassunto e conclusioni

Le cellule staminali possono essere classificate in diversi tipi, a seconda della sede e dello stadio di sviluppo pre- o post-natale da cui vengono isolate. Ciò che cambia in questi diversi tipi di staminali è soprattutto la potenzialità, cioè la capacità di dare origine a diversi tipi cellulari differenziati.

La ricerca di base è pertanto diretta a studiare due grandi aspetti implicati nella biologia delle cellule staminali: i) la loro biologia cellulare (modalità di divisione e differenziamento), e ii) le loro interazioni con i tessuti circostanti (studio delle nicchie staminali, studio dell'integrazione dei progenitori nei tessuti, e comportamento negli stessi tessuti colpiti da patologie).

Una maggiore conoscenza di questi aspetti è un requisito fondamentale per poter capire come le staminali sono regolate in diversi contesti tissutali (fisiologici e patologici) e arrivare così a manipolarle a scopi terapeutici. In alcuni casi (come il sangue e la cornea) esistono già efficaci terapie a base di cellule staminali (si vedano i focus di Paolo Rama e Franca Fagioli), mentre in altri tessuti più problematici (come il sistema nervoso) siamo ancora lontani da applicazioni terapeutiche efficaci di sostituzione cellulare (si veda il FOCUS di Luca Bonfanti)*.

[*] si veda tuttavia il caso particolare delle staminali mesenchimali nel FOCUS di Antonio Uccelli.



Breve storia

Cellule staminali adulte

Le prime cellule staminali sono state descritte negli anni '50. Tra le prime ad essere studiate vi sono le staminali *ematopoietiche*. In particolare, nel 1963 McCulloch e Till dimostrano la presenza di cellule staminali autorinnovanti nel midollo osseo di topo. Tuttavia ci vorranno altri 50 anni per capire come funziona la nicchia staminale del midollo osseo [Calvi et al., *Nature* 2003 - Zhang et al., *Nature* 2003]. Questo esempio è emblematico nel mostrare come la ricerca in questo campo, pur facendo continui passi in avanti, richiede talvolta tempi lunghissimi. Infatti, solo nel 1997 viene fornita una prova diretta che la leucemia origina da cellule staminali ematopoietiche (esistenza di un nesso tra cellule staminali e cancro).

Negli anni '80-'90 Potten e Loeffler studiano intensamente il rinnovamento dell'epitelio intestinale ad opera di cellule staminali localizzate nelle *cripte* (le microscopiche ghiandole intestinali).

All'inizio degli anni '90 cellule staminali *neurali* estratte dal cervello del topo adulto sono coltivate in vitro sotto forma di neurosfere. Già negli anni '60, Joseph Altman aveva fornito le prime prove di genesi di nuovi neuroni all'interno del cervello adulto, contraddicendo il dogma del premio Nobel Ramon Y Cajal che escludeva tale possibilità. In realtà ci vollero più di 30 anni perché la neurogenesi adulta venisse accettata dalla comunità scientifica (vedi il FOCUS specifico). E questo è un altro esempio di come la scienza procede lentamente e per successive verifiche, prima di affermare (e confermare) qualcosa di rivoluzionario.

Negli ultimi 20 anni, gli studi sulle staminali si sono moltiplicati e ramificati in numerose discipline (dalla biologia cellulare alla medicina rigenerativa) applicate a diversi modelli (in vitro e in vivo, dagli organismi invertebrati all'uomo). Facendo una ricerca su PubMed (il database del governo statunitense che mette a disposizione gratuitamente i titoli di tutti gli articoli scientifici delle principali riviste biomediche mondiali: www.pubmed.org.) inserendo la voce STEM CELL si ottengono più di 200.000 pubblicazioni, a testimonianza della complessità raggiunta da questo argomento.

Staminali pluripotenti (cellule staminali embrionali e cellule iPS)

Le origini del settore della biologia delle cellule staminali pluripotenti risalgono agli studi condotti negli anni '50 da Leroy Stevens, un biologo dello sviluppo che presso i laboratori della ditta Jackson scoprì l'insorgenza di tumori testicolari spontanei (teratocarcinomi) nel ceppo di topo 129. Cellule isolate dai teratocarcinomi maligni (denominate cellule EC o cellule di "carcinoma embrionale") potevano essere mantenute *in vitro* e, quando iniettate in embrioni precoci di topo (allo stadio di blastocisti), l'ambiente degli embrioni in sviluppo le indirizzava verso programmi differenziativi multipli. Il risultato finale era la nascita di topi chimerici in cui una parte significativa dell'animale derivava dalle cellule di carcinoma embrionale (o cellule EC). Gli studi condotti sulle cellule EC hanno permesso negli anni seguenti di effettuare una grande quantità di osservazioni sperimentali che sono state fondamentali a Martin Evans e Matthew Kaufman che nel 1981 riuscirono a coltivare in laboratorio le cellule staminali embrionali (o cellule ES) isolate dalla massa cellulare interna (o ICM) di blastocisti murine, generando appunto linee permanenti di cellule ES. Da allora, sono state effettuate numerosissime scoperte che hanno permesso di coltivare le cellule ES in condizioni sperimentali completamente sotto controllo del ricercatore e di indirizzarne il destino differenziativo in modo sempre più preciso ed efficiente. Diciassette anni dopo l'isolamento delle ES di topo, nel 1998, James Thomson e colleghi pubblicano su *Science* la



derivazione di linee cellulari staminali embrionali a partire da blastocisti umane (sovranumerarie).

L'agosto 2006 segna un'altra data di rivoluzione scientifica nel campo delle cellule staminali pluripotenti. Shinya Yamanaka in Giappone riesce a *riprogrammare* cellule adulte, quali i fibroblasti, facendole regredire indietro nel tempo fino allo stadio di cellule pluripotenti simili alle ES, e denominando queste nuove cellule con l'acronimo **iPS** (da cellule staminali *pluripotenti indotte*). Un risultato sconvolgente, ottenuto mediante l'inserimento in fibroblasti adulti di soli 4 geni codificanti per i fattori di trascrizione associati allo stadio di pluripotenza (Oct4, Sox2, Klf4 e c-myc; vedi FOCUS specifico). Questa scoperta ha letteralmente infranto il dogma scientifico secondo il quale una cellula terminalmente differenziata non poteva riacquistare la caratteristica plasticità differenziativa pressochè illimitata ritenuta esclusiva dell'embrione precoce. Inoltre, l'avvento delle cellule iPS apre a illimitate potenzialità applicative sia a livello sperimentale che biomedico per cui moltissimi ricercatori hanno iniziato a lavorare su questo sistema cellulare; ad indicare il fermento attorno a queste cellule, basti pensare al vasto numero di pubblicazioni scientifiche accumulate sulle cellule iPS in soli 5 anni (sono già più di 1500 i lavori pubblicati su PubMed che hanno come parola chiave "cellule iPS"). Infine, nel febbraio del 2010 si ha un'altra evoluzione della tecnologia della riprogrammazione; infatti, in quella data Marius Wernig e colleghi hanno pubblicato il primo lavoro in cui si ottiene la riprogrammazione diretta che prevede la *conversione diretta* di una tipologia cellulare ad un'altra mediante l'introduzione di geni specifici. In questo modo, ad esempio, è possibile convertire una cellula della pelle in una cellula nervosa senza la necessità di uno stadio di pluripotenza intermedia.

Altre date importanti:

1995 - Bill Clinton firma una legge che rende illegali fondi federali per la ricerca su cellule staminali ottenute con la distruzione dell'embrione

2004-2005 - Hwang Woo-Suk asserisce di avere creato numerose linee di cellule staminali embrionali umane da ovociti umani non fertilizzati. Si scopre che non era vero.

2006 - George W. Bush firma il veto della legge che avrebbe permesso l'uso di fondi federali per la ricerca su cellule staminali ottenute dalla distruzione dell'embrione

2009 - Il presidente americano Barack Obama ha rimosso, con un ordine esecutivo, i limiti al finanziamento pubblico alla ricerca sulle cellule staminali embrionali.

Attualità (quadro generale della ricerca e delle applicazioni in Italia e a livello internazionale)

Negli ultimi anni, quello della ricerca sulle cellule staminali è stato uno dei campi della biologia e della biomedicina che maggiormente ha richiamato l'interesse dei ricercatori. Gran parte di questo interesse nasce dalle potenzialità terapeutiche ad esse associate e che le ha rese protagoniste a livello mediatico. L'utilizzo delle cellule staminali in ambito clinico nasce con la pratica dei trapianti di midollo osseo grazie agli studi condotti da Edward Donnall Thomas a cavallo tra gli anni '60 e '70. Egli dimostrò come le cellule del midollo osseo, una volta infuse per via endovenosa, sono in grado di ripopolare il midollo dell'ospite e produrre nuove cellule del sangue (vedi il FOCUS specifico). Da allora sono decine di migliaia i malati di leucemie o di immunodeficienze curati grazie al trapianto di midollo osseo. Solo in Italia vengono eseguiti circa 4.000 trapianti di midollo all'anno. Tuttavia, nonostante nell'ultimo decennio le cellule staminali stiano trovando sempre più spazio nella clinica anche per il trattamento di patologie che colpiscono tessuti diversi da quello ematico, nella realtà sono molto pochi gli ambiti in cui le



cellule staminali costituiscono un assodato strumento di cura. Di seguito riportiamo alcuni dei principali ambiti in cui la ricerca sulle cellule staminali è già riuscita a traslare (e/o sta cercando di farlo) i risultati scientifici in vere applicazioni cliniche.

1) trattamento delle lesioni degli epitelii di rivestimento. In seguito a lesioni di vario tipo, la nostra cute è in grado di ricostruire in pochi giorni uno strato corneo perfettamente funzionale, garantendo piena protezione da disidratazione e infezioni, a partire da diversi tipi di cellule staminali specializzate presenti nel tessuto stesso. Tuttavia, esistono casi in cui la gravità delle lesioni (è il caso, ad esempio, ustioni gravi ed estese) impedisce un adeguato riparo quantitativo e qualitativo della cute, arrivando, nei casi più gravi, a compromettere la vita del paziente. In questi casi, già da diversi anni è possibile effettuare dei trapianti di pelle autologa. Il nuovo tessuto cutaneo viene generato *in vitro* su matrici di collagene e matrigel, a partire da progenitori e staminali cutanee derivanti da piccole biopsie della cute del paziente. Negli ultimi due decenni centinaia di pazienti hanno beneficiato di questo trattamento salvavita. Tuttavia, i costi elevati e la necessità di diversi mesi per ricostruire lembi di pelle estesi, di fatto ne limitano la piena diffusione in clinica. In aggiunta, sebbene questo oggi rappresenti uno straordinario trattamento salvavita, i malati trapiantati chiedono una vita migliore. La pelle attualmente rigenerata in laboratorio a partire da cellule staminali non è infatti ottimale in quanto priva di ghiandole sudorifere e di bulbi piliferi, provocando anomalie nella termoregolazione e nella fisiologia di questo importante tessuto. Sono in fase di sviluppo metodologie più efficaci per ottenere *in vitro* pelle qualitativamente identica a quella dell'individuo.

Un altro epitelio che è possibile rigenerare completamente *in vitro* e per il quale esistono da tempo protocolli clinici efficaci è costituito dall'epitelio corneale. Nei casi in cui l'occhio viene lesionato nell'epitelio corneale - quel tessuto che garantisce la capacità visiva filtrando la luce che arriva alla retina - ad esempio, a causa di ustioni chimiche, è possibile effettuare dei trapianti di staminali della cornea. Infatti, in presenza di queste lesioni, l'epitelio congiuntivale, che costituisce la parte visibile bianca dell'occhio, prende il sopravvento portando alla formazione di quello che in termini clinici si chiama "pannus" e che copre tutto il bulbo, causando cecità. In molti casi, è possibile ricostruire la cornea partendo da staminali presenti a livello del limbus dell'occhio, una striscia di cellule, di cui circa il 10% con caratteristiche staminali, che circonda la cornea. Le staminali limbari, responsabili della rigenerazione del tessuto corneale che avviene ogni 9 mesi, una volta messe in coltura sono in grado di ricostruire in circa 3-4 settimane un lembo di epitelio corneale che viene impiantato al posto di quello compromesso. Tra i pionieri di questa tecnologia vi sono Graziella Pellegrini e Michele De Luca che nel 1997 pubblicarono il primo studio sulla coltivazione della cornea a partire da staminali. Più di recente, questi ricercatori, insieme a Paolo Rama (vedi il suo FOCUS specifico), hanno perfezionato la tecnica per curare i casi in cui il normale trapianto di staminali corneali si dimostrava inefficace a causa dell'estensione della lesione (3-4% dei casi di lesioni della cornea).

2) trattamento delle disfunzioni cardiache. Il cuore è uno degli organi che si pensava dispensato da processi rigenerativi. In realtà, studi recenti hanno evidenziato che nel miocardio umano potrebbero risiedere dei progenitori, i quali possono rigenerare, in condizioni normali, l'intero set di miocardiociti di un cuore adulto in circa 4,5 anni. Tuttavia questi risultati sono molto dibattuti, sia per quel che riguarda l'effettiva capacità rigenerativa (alcuni studi stimano un turnover dei cardiomiociti molto più ridotto, pari al ricambio dell'1% di cardiomiociti all'anno) sia per la presenza concreta di progenitori nel cuore adulto. Nonostante ciò, l'utilizzo delle cellule staminali per riparare il tessuto cardiaco rappresenta uno degli ambiti applicativi che attrae maggiori interessi anche se non è ancora chiaro come ottenere cellule del miocardio che siano il più possibile simili a quelle della sede cardiaca lesionata. Ad oggi, le uniche fonti da cui è stato possibile ottenere un buon numero di cardiomiociti funzionali sono rappresentate dai miocardiociti fetali e dalle cellule pluripotenti (cellule ES ed iPS). Per i primi, il loro utilizzo nella pratica clinica è difficilmente immaginabile a causa della natura eterologa e della scarsità di materiale reperibile, mentre per quanto riguarda l'utilizzo di miocardiociti derivati da cellule ES ed



iPS, al momento il loro utilizzo è limitato ai soli studi preclinici su animali, dovendo risolvere ancora le problematiche di sicurezza. Nonostante non vi siano forti prove precliniche circa l'impiego di una staminale o l'altra, l'ambito cardiaco è quello che annovera il maggior numero di trials clinici effettuati con differenti tipologie di staminali e su svariate patologie cardiache. Va sottolineato che nessuno di essi ha però evidenziato recuperi funzionali consistenti e duraturi e/o la produzione di nuovi miocardiociti a partire dalle cellule trapiantate. Questi studi hanno comunque dimostrato che questo genere di approccio non risulta pericoloso per il paziente. Inoltre, sembrerebbe che questa tipologia di trapianto possa facilitare il rimodellamento del tessuto infartuato, probabilmente attraverso il rilascio di sostanze protettive, ed un aumento, seppur limitato, dei processi di rivascolarizzazione. Questi aspetti, potrebbero essere alla base dei risultati decisamente più incoraggianti che derivano dagli studi clinici per la cura dell'angina refrattaria che vede nella rivascolarizzazione un aspetto critico.

3) trattamento delle patologie del muscolo scheletrico. Il muscolo scheletrico è il tessuto preponderante del corpo umano e contiene una popolazione di progenitori muscolari, le cosiddette "cellule satellite" che sono in grado di provvedere al riparo fisiologico di questo tessuto mediante l'aggiunta di nuove fibre muscolari. In alcune patologie, quali la distrofia muscolare di Duchenne, il muscolo scheletrico va incontro a progressiva degenerazione perdendo ogni capacità rigenerativa intrinseca. Per il trattamento di queste patologie degenerative sono stati vagliati, in ambito preclinico, approcci basati sul trapianto di diverse tipologie di cellule staminali con attività miogenica. Tutte queste popolazioni mostrano capacità miogenica *in vitro*; tuttavia una vera e consistente capacità miogenica *in vivo* in seguito a trapianto è stata evidenziata solo per le cellule satellite ed i mesangioblasti. Le potenzialità delle cellule satellite sono tuttavia limitate dalla ridotta sopravvivenza, migrazione e colonizzazione del tessuto muscolare bersaglio dopo trapianto. Diversamente, i mesangioblasti, isolati dal topo nel 2003 dal gruppo di Giulio Cossu, sono cellule, capaci di differenziare in diversi tipi cellulari del mesoderma, incluso il muscolo scheletrico. Il loro trapianto, per via endovenosa, in topi distrofici produce un recupero funzionale dei muscoli iniettati e un miglioramento clinico in modelli di cani distrofici. E' al momento in corso in Italia un trial clinico su un ristretto numero di pazienti distrofici.

4) trattamento delle patologie degenerative del sistema nervoso. Quando si parla di malattie degenerative del sistema nervoso, si fa riferimento ad un'eterogenea famiglia di malattie per lo più prive di trattamento farmacologico, che include malattie con caratteristiche eziopatologiche e sintomatologiche ben distinte tra loro. Proprio in virtù di questa eterogeneità, quando si pensa ad una terapia cellulare rivolta a queste malattie, si devono distinguere diversi "livelli" di requisiti necessari per lo sviluppo di un approccio trapiantologico adeguato. Nonostante moltissime pressanti aspettative, la realtà è tuttavia ben lontana dal garantire un utilizzo clinico efficace e sicuro delle cellule staminali per la cura delle malattie del cervello. Anche nel caso delle malattie del sistema nervoso è probabile che le cellule trapiantate possano dare un beneficio per un effetto di rilascio di fattori protettivi o di molecole antiinfiammatorie, come osservato nel caso degli studi effettuati dal gruppo di Gianvito Martino a Milano in modelli animali di sclerosi multipla. Ad oggi, sono pochi, e confinati a limitati studi preclinici, i risultati nell'animale che ipotizzano una utilità terapeutica delle cellule staminali neurali. Gli studi clinici che prevedono l'utilizzo di cellule staminali per il trattamento di malattie del cervello, attualmente in fase di realizzazione nel mondo sono limitati a meno di una decina di studi in fase I e tutti approvati a tre principali ditte biotecnologiche. Si tratta della ReNeuron, che sta vagliando l'uso di cellule staminali neurali umane immortalizzate in pazienti colpiti da ischemia cerebrale. I primi dati a proposito sembrano indicare una scarsa sopravvivenza delle cellule trapiantate e non mostrare beneficio per i pazienti. La StemCells e la Neuralstem stanno invece effettuando studi che prevedono l'impianto di cellule staminali neurali umane non immortalizzate per il trattamento della Sindrome di Batten, della Sclerosi Laterale Amiotrofica e delle lesioni midollari croniche. Infine, la Geron sta



scienza attiva

effettuando un trial clinico in fase I utilizzando precursori oligodendrogliali derivati da cellule ES umane per il trattamento di lesioni midollari acute. Anche la Advanced Cell Technology ha avuto l'autorizzazione a procedere con staminali embrionali umane per la degenerazione maculare. Nell'insieme, questi studi stanno fornendo una base di dati iniziali sull'utilizzo clinico delle cellule staminali per il trattamento di patologie degenerative cerebrali, soprattutto per quel che concerne gli aspetti di sicurezza. Quest'ultimo rappresenta infatti un aspetto fondamentale, soprattutto in relazione alle sempre più numerose ditte nel mondo che offrono trattamenti basati su staminali per curare diverse patologie, tra le quali anche quelle relative al cervello. Emblematico è il caso, riportato recentemente, di un bambino israeliano di 9 anni con una malattia rara del cervello (atassia telangectasica) trattato con (presunte) cellule staminali fetali in una clinica russa. Quattro anni dopo i ripetuti trapianti, in seguito all'insorgenza di una sintomatologia neurologica grave, una TAC evidenziava lo sviluppo di un tumore al cervello e al midollo spinale provocato dall'eccessiva proliferazione delle cellule trapiantate.

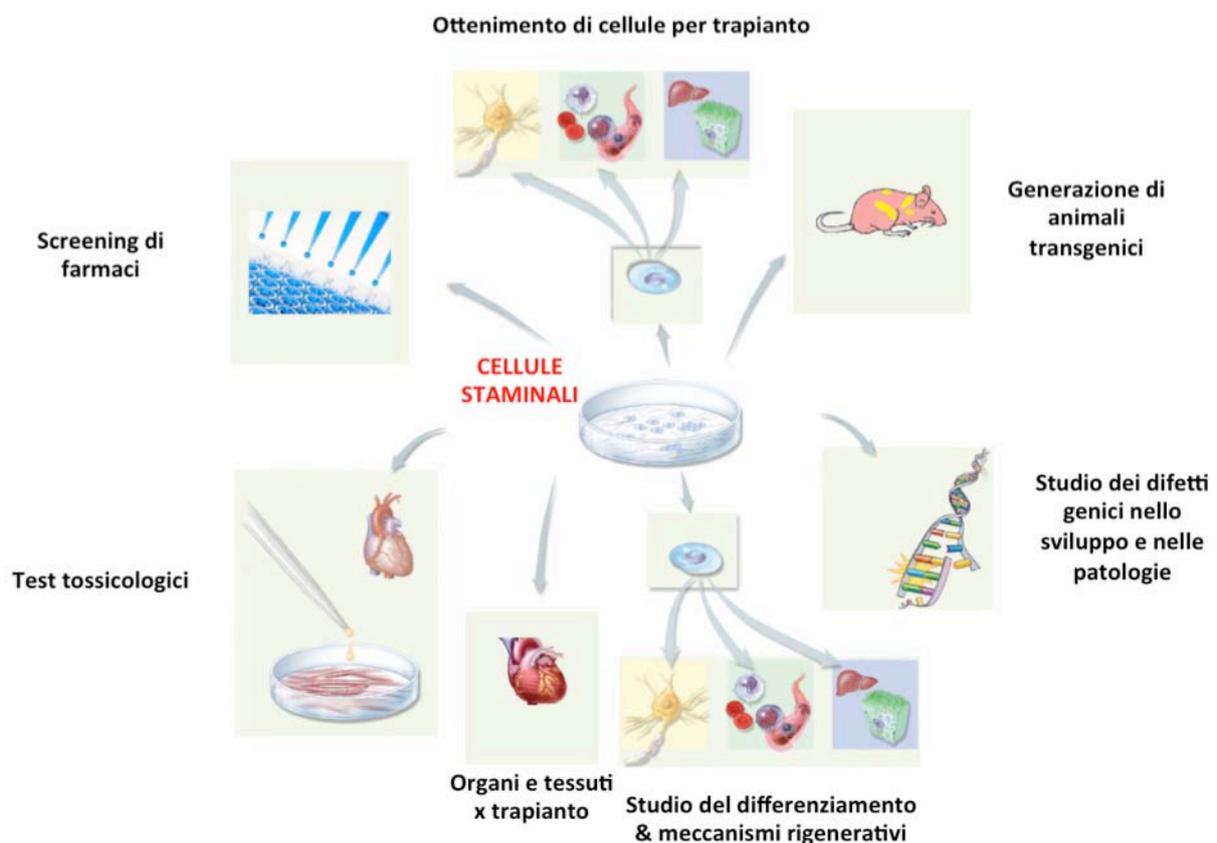


Caratteristiche delle principali tipologie di cellule staminali

Tipologie di cellule staminali:	iPS	ESC	Fetali	Adulte del sangue	Adulte della pelle	Adulte del cervello	Cordonali
FONTE	Cellule fetali ed adulte immature e differenziate	Blastocisti	Tessuti fetali	Midollo osseo o sangue periferico	Pelle	Cervello	Cordone ombelicale
POTENZIALITA'	PLURIPOTENTI	PLURIPOTENTI	MULTIPOTENTI	MULTIPOTENTI	MULTIPOTENTI	MULTIPOTENTI	MULTIPOTENTI
ESPANDIBILITA'	SI	SI	A seconda del tessuto di origine	LIMITATA	SI	SI	NO
UTILIZZO CLINICO	NON ANCORA	STUDI DI FASE I	SI	SI	SI	NON ANCORA	SI
EFFICACIA CLINICA	NON ANCORA	NON ANCORA	SI	SI	SI	NON ANCORA	SI
MANIPOLABILITA' GENETICA	OTTIMA	OTTIMA	LIMITATA	LIMITATA	LIMITATA	LIMITATA	LIMITATA
CRIOPRESERVAZIONE	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
POTENZIALITA' TUMORIGENICO	SI	SI	ALCUNI CASI	NON OSSERVATO	NON OSSERVATO	NON OSSERVATO	NON OSSERVATO



Va però sottolineato come, nonostante l'aspetto terapeutico sia quello che sicuramente ha attirato maggiore interesse a livello mediatico, le cellule staminali rappresentano un formidabile modello di studio in moltissimi altri campi. Esse, nell'ultimo decennio, hanno permesso di esplorare molti aspetti della biologia dello sviluppo, dalle prime fasi embrionali (in special modo i difetti alla base dell'infertilità e dell'interruzione precoce della gravidanza) fino agli stadi in cui avviene la formazione dei tessuti e degli organi (nel corso dei quali si verificano eventi dai quali dipendono malattie e disfunzioni, che poi si manifestano alla nascita e nel corso della vita di un individuo) oltre che costituire uno strumento insostituibile per studiare la funzione di geni specifici nello sviluppo del nostro organismo e nelle diverse patologie. Va inoltre ricordato che gli obiettivi della ricerca sulle cellule staminali, ed in particolare sulle cellule iPS, si estendono anche ad altri ambiti quali la tossicologia e lo studio di farmaci, oltre alla possibilità di utilizzare queste nuove staminali per studiare *in vitro* le malattie umane in modo paziente-specifico. Per esempio, con la riprogrammazione è possibile ottenere cellule iPS da ogni individuo. In caso di malattie genetiche, queste rechiano non solo il gene responsabile della malattia ma anche il resto del corredo genico consentendo di studiarne *in vitro* le anomalie molecolari che si sviluppano nel corso della patologia. Le cellule iPS sono già state derivate da pazienti con Atrofia Muscolare Spinale, Sclerosi Amiotrofica Laterale, Morbo di Parkinson, Corea di Huntington, persone con malformazioni cardiache congenite ma anche con diabete giovanile o con altre patologie. Le cellule ES e iPS possono anche essere utili per sperimentare nuovi farmaci: per esempio, per lo studio dell'effetto terapeutico su uno specifico tipo cellulare, per l'identificazione di effetti collaterali prevedibili con l'analisi *in vitro* e per lo studio del metabolismo epatico. In teoria, le cellule staminali derivate da una persona potrebbero essere utilizzate per tracciare il profilo paziente-specifico della risposta biologica ad un farmaco (farmacogenetica).



Applicazioni delle staminali nei vari settori della biologia e della biomedicina.



Frontiere (prospettive per ricerca e applicazioni terapeutiche)

La ricerca sulle cellule staminali nell'ultimo decennio ha visto un incredibile crescendo di scoperte che hanno cambiato profondamente il nostro concetto su quale sia il confine biologico tra una cellula staminale ed una cellula matura. Si tratta di ricerche che hanno aperto opportunità incredibili per cercare di ottenere il massimo dall'ingegno e dalle capacità umane dei ricercatori per impegnarsi in studi che aspirano ad accrescere le conoscenze su chi siamo e come ci formiamo ed a diminuire le sofferenze degli individui. Un esempio emblematico è rappresentato dall'avvento della tecnologia delle cellule iPS che ha costituito un altro formidabile giro di boa nel campo della biologia delle cellule staminali, aprendo enormi prospettive per l'utilizzo di queste cellule staminali in ambito clinico. Esse infatti associano la pluripotenza e la potenzialità differenziativa delle cellule ES al fatto di potere essere ottenibili dall'individuo stesso e quindi, teoricamente, fatto salvi i rischi associati allo stato di pluripotenza cellulare sopra descritti, permetterebbe lo sviluppo di terapie cellulari personalizzate basate sull'impianto di cellule iPS ottenute dai propri fibroblasti e successivamente istruite a generare i sottotipi di cellule specializzate di interesse.

In particolare, le terapie cellulari e la medicina rigenerativa, sempre più basate sui progressi della biologia delle cellule staminali, hanno iniziato a porre le basi della pratica clinica del futuro. Le ricerche che gli scienziati di tutto il mondo stanno attualmente affrontando, e che rappresentano le più urgenti sfide scientifiche dei prossimi anni, mirano a traslare più velocemente ed in modo sicuro ed efficace le scoperte ottenute in laboratorio in terapie usufruibili dai pazienti.

Per accelerare questo processo, è tuttavia fondamentale approfondire la conoscenza dei fattori e dei processi che governano la rigenerazione tissutale *in vivo*. Ma ancora maggiore è l'attenzione allo sviluppo di strategie volte a isolare e propagare queste staminali tissutali dell'adulto o derivarle dalle fonti cellulari pluripotenti al fine di poterle espandere in laboratorio in modo illimitato per poi sfruttarne la capacità rigenerativa a seguito del loro trapianto (al momento, l'esempio più straordinario, per ora l'unico, di staminale adulta prelevata, espansa in laboratorio e poi usata per scopi curativi è quella dell'epitelio). Le staminali prelevate direttamente dai tessuti adulti sono infatti di più facile accesso, e, per alcune di esse le cui applicazioni non richiedono una forte espansione *in vitro*, la capacità differenziativa specifica resta notevole. Un esempio rappresentativo è costituito dalle cellule staminali ematopoietiche, che possono essere isolate in modo prospettico, quindi arricchite per la tipologia staminale desiderata ed utilizzate in terapie trapiantologiche. Tuttavia, ad oggi, l'espansione di queste cellule in laboratorio risulta difficile. Al contrario, l'utilizzo di cellule staminali tissutali derivate da cellule pluripotenti permetterebbe di avere grosse quantità di tali cellule utilizzabili clinicamente se si riuscirà ad eliminare dalle colture le cellule staminali pluripotenti residue che posseggono un elevato potenziale tumorigenico.

Le sfide attualmente aperte al fine di sfruttare appieno le potenzialità delle cellule staminali sono tuttavia ancora molteplici e per raggiungere il goal finale è necessario un approccio multidisciplinare integrato. E' quindi importante che gli aspetti etici, legali e commerciali riguardanti la ricerca su tutte le cellule staminali, embrionali e adulte, e le relative sperimentazioni cliniche continuino ad essere discussi e perseguiti su obiettivi concreti e, soprattutto, puntando sempre a strategie che si presentino sempre come medicalmente obiettive, scientificamente oneste e socialmente utili.



Scienza e società: aspetti etici e normative

Le staminali, a causa delle loro potenzialità terapeutiche, hanno ormai assunto un ruolo importantissimo anche fuori dai laboratori di ricerca, a livello sociale e politico. E' possibile individuare nel 1998, la data in cui viene pubblicata per la prima volta l'ottenimento di cellule staminali embrionali umane a partire da blastocisti sovranumerarie, come il momento chiave di questo processo. Come spesso succede con gli avanzamenti della scienza, questa pubblicazione espose da subito governi e società a nuovi interrogativi destinati ad alimentare un dibattito etico su cosa fosse una blastocisti. Prima di allora in pochi si erano interrogati su cosa fosse una blastocisti, dalla quale il team di Thomson isola per la prima volta le cellule staminali embrionali umane. Un procedimento che implica la disgregazione e la distruzione della blastocisti. Un omicidio - per chi considera la blastocisti una persona tale e quale chi scrive e chi legge. Un atto eticamente legittimo per coloro che nelle blastocisti sovranumerarie non vedono degli individui, ma delle strutture più piccole di un millimetro formate da poche centinaia di cellule, che degenererebbero se conservate congelate per lungo tempo ma dalle quali si possono ottenere importanti informazioni per capire e aumentare le speranze di numerosi pazienti.

Si tratta di un dibattito importante e costruttivo ogni volta che permetterà di esprimere i rispettivi punti di vista in relazione a obiettivi e procedure concrete fornendo, ovunque si possa, le riflessioni su cui ciascun cittadino possa poi costruire la propria opinione. Al riguardo sono molte le riflessioni etiche, religiose, sociali e filosofiche che, insieme alla scienza, animano i diversi paesi e i pensieri dei cittadini d'Europa e del mondo e che cercano modi condivisibili per attuare ricerche importanti che mirano a ridurre le sofferenze umane.

Anche dal punto di vista strettamente legislativo, il panorama mondiale riflette questa varietà di posizioni dei diversi stati e dei loro cittadini. In alcune nazioni (ad esempio la Gran Bretagna) si ha una legislazione molto permissiva che permette, ma sempre sotto stretto il controllo di organi ufficiali di sorveglianza, di derivare linee di cellule ES umane da blastocisti sovranumerarie. In altri stati, le possibilità di derivazione ed utilizzo delle cellule embrionali staminali umane è invece più limitata. In alcuni casi, come la Germania, non è possibile derivare linee di cellule staminali embrionali umane ed è permesso l'utilizzo di linee prodotte solo entro una data prestabilita. Una ulteriore situazione è rappresentata dalla posizione tenuta da paesi come gli Stati Uniti in cui, la ricerca sulle linee embrionali prodotte dopo il 2002 non poteva giovare del finanziamento pubblico. Tuttavia, la ricerca e la derivazione di nuove linee con finanziamenti non statali sulle cellule staminali embrionali umane non veniva impedita sul suolo americano. Recentemente, il presidente Barack Obama ha rimosso il veto al finanziamento pubblico di ricerche sulle cellule staminali embrionali umane. Infine, va annoverata la situazione italiana, dove la legge impedisce la derivazione di nuove linee ma non l'impiego di linee già derivate (senza restrizioni temporali) che possono essere quindi scambiate tra laboratori e importate nell'ambito di collaborazioni scientifiche.

Diversi paesi europei hanno diverse regolamentazioni sulla generazione, importazione ed utilizzo delle cellule ES umane.

	AT	BE	BG	CY	CZ	DE	DK	EE	EL	ES	FI	FR	HU	IE	IT*	LT	LU	LV	MT	NL	PL	PT	RO	SE	SI	SK	UK
Permesso di produrre cellule ES umane da blastocisti sovranumerarie		X			X		X		X	X	X	X								X		X		X			X
Regolamentazione per la ricerca su embrioni umani ma assenza di legislazione circa le cellule ES umane								X					X					X							X		
Proibizione di produrre cellule ES da embrioni umani ma permesso di importare linee di cellule ES umane da altri paesi						X									X												
Nessuna specifica legge per regolamentare la ricerca sulle cellule ES umane	X												X	X		X	X		X				X			X	
La legge consente la creazione di embrioni umani per produrre cellule ES		X																					X				X
Proibizione di creare embrioni umani per scopi di ricerca e per produrre cellule ES umane, per legge e per ratificazione della Convenzione del Consiglio Europeo dei diritti umani e della biomedicina (trattato di Oviedo del 4 Aprile 1997)																											

*IT has no law regarding the importation & IT scientists are working on imported hES cell lines

COUNTRY CODE KEY:

AT : Austria
BE : Belgium
BG : Bulgaria
CY : Cyprus
CZ : Czech Republic

DE : Germany
DK : Denmark
EE : Estonia
EL : Greece
ES : Spain

FI : Finland
FR : France
HU : Hungary
IE : Ireland
IT : Italy

LT : Lithuania
LU : Luxembourg
LV : Latvia
MT : Malta
NL : Netherlands

PL : Poland
PT : Portugal
RO : Romania
SE : Sweden
SI : Slovenia

SK : Slovakia
UK : United Kingdom



scienza attiva



Dal punto di vista bioetico e legislativo, le cellule staminali adulte vantano uno *status* meno complicato, non implicando la “distruzione” del donatore (come nel caso delle cellule ES e delle blastocisti). I casi riscontrabili si possono ricondurre a tre tipologie:

1) cellule staminali prelevate da individui adulti.

In questo caso il donatore è in grado di dare direttamente (o nel caso ciò non fosse possibile a causa della minore età o altri motivi, intervengono i genitori o il tutore) il proprio consenso al prelievo dei tessuti.

2) cellule staminali prelevate da “tessuti di scarto”.

E' ad esempio il caso delle cellule staminali del cordone ombelicale. In questo caso, i genitori devono fornire il proprio consenso alla donazione. Le cellule staminali estratte dal cordone verranno quindi crioconservate in biobanche e verranno utilizzate dal primo paziente biologicamente compatibile che abbia necessità di trapianto. In Italia la legge vieta la conservazione esclusiva per utilizzo futuro da parte del nascituro o di suoi parenti; fanno eccezione a questa norma, i casi di accertata possibilità di avere o poter sviluppare patologie che necessitano delle proprie staminali cordonali per autotrapianti. Per aggirare le restrizioni normative, sono nate diverse società che offrono un servizio di prelievo e conservazione delle staminali da sangue cordonale per uso personale. Queste società sono site al di fuori dal territorio italiano (numerose ditte che offrono questo tipo di servizio a pagamento sono site a San Marino, in Svizzera ed in Francia), si occupano di prelevare la placenta ed il cordone ombelicale al momento della nascita e di trasportarlo nelle loro sedi dove verrà effettuato il prelievo delle cellule staminali e la loro crioconservazione.

3) cellule staminali prelevate da feti abortivi.

In questo caso, la madre al momento della procedura abortiva nei termini previsti dalla normativa vigente (e nei casi di aborti spontanei), può decidere di dare il consenso alla donazione del materiale abortivo per l'utilizzo in ambiti di ricerca.

Va sottolineato come, nonostante il loro immenso potenziale, le cellule staminali rappresentano oggi un valido strumento di cura solo in pochi limitati (ma importanti) ambiti, quale quello ematologico, grazie all'esperienza di mezzo secolo di trapianti di midollo osseo, o quello relativo al trattamento di alcuni epiteli. In tutti gli altri casi si tratta di protocolli sperimentali in studio o di lavori a livello preclinico, nell'animale. Al fine di poter passare alla sperimentazione sull'uomo, è necessario che si ottengano prove certe circa l'efficacia del trapianto, che i risultati siano verificati in più laboratori e che si capisca a fondo il meccanismo d'azione attraverso il quale le cellule trapiantate possono produrre i benefici ottenuti. L'aspetto fondamentale è che le sperimentazioni sull'uomo vengano avviate solo alle condizioni sopra descritte e su un numero limitato di pazienti, prevedendo misure di valutazione della sicurezza del trapianto. Il trapianto, infatti, non deve mai mettere a rischio la vita del paziente. Sfortunatamente, accanto alle prospettive della medicina rigenerativa si è sviluppata una meno controllata “corsa al trapianto” che ha portato numerosi enti e industrie nel mondo ad offrire trapianti di staminali adulte per le più diverse situazioni e, nella quasi totalità dei casi, senza alcuna evidenza sperimentale. Si parla in questo caso di “turismo delle staminali”, un business veicolato attraverso siti web e strategie



pubblicitarie ingannevoli e dannose. Sebbene il tentativo di perseguire qualsiasi strada da parte dei malati e dei loro familiari sia certamente comprensibile, dall'altro è fondamentale che medici di base, associazioni dei malati e ricercatori si mettano a disposizione per rendere la scelta del paziente il più informata possibile. E' a tale scopo che lo scorso anno l'International Society for Stem Cell Research Society (ISSCR) ha redatto, con un team di ricercatori, medici, bioeticisti e avvocati, le linee guida per i pazienti oltre ad avere creato un sito web al quale il malato può accedere per chiedere informazioni relativamente a un trattamento per una malattia fornito in un paese da un ente.

Per approfondire:

Bibliografia e Proposte per approfondimenti didattici.

- Evans M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; **2011** Sep 23, 12(10):680-686.
- Evans M.J. and Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*; **1981** July 09, 292: 154 - 156.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*; **1998** Nov 6, 282(5391):1145-1147.
- Takahashi K. and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*; **2006** Aug 25, 126(4):663-676.
- Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Südhof T.C., Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*; 2010 Feb 25, 463(7284): 1035-1041.
- Luca Bonfanti. *Le cellule invisibili: il mistero delle staminali cerebrali*. Bollati Boringhieri, Saggi scienze, 2009.
- Konrad Hochedlinger. La cura che viene da dentro. *Le Scienze*; luglio 2010.
- Luciano Conti ed Elena Cattaneo. Il punto sulle staminali. *Le Scienze*; ottobre 2011.

Link utili.

- International Society for Stem Cell Research (ISSCR): <http://www.isscr.org>
- Europe's stem cell hub (EUROSTEMCELL): <http://www.eurostemcell.org>
- NIH (National Institute of Health, USA) Stem Cell Information Home Page: <http://stemcells.nih.gov/>
- **Centro di ricerca sulle cellule staminali (UNISTEM) dell'Università degli Studi di Milano:** <http://users.unimi.it/unistem/>
- Genetic Science Learning Centre della Università dello Utah: <http://learn.genetics.utah.edu/content/tech/stemcells/>