



scienza attiva[®]

Cellule Staminali embrionali e adulte

Dr. Luciano Conti

Università degli Studi di Milano

UNISTEM - Centro di ricerca sulle cellule staminali



Introduzione

Le cellule staminali esistono e funzionano fisiologicamente nei nostri tessuti. È a queste competenze che la ricerca e la medicina rigenerativa guardano con attenzione, con l'intento di implementarne le capacità a scopi terapeutici. È infatti la loro elevata capacità proliferativa (di grado diverso a seconda della staminale in questione) e propensione a differenziare dando origine a tipi cellulari specializzati e a nuovi tessuti, a fornire il "principio attivo" della terapia rigenerativa. Esse, isolate o purificate dal tessuto, poi espanse e "istruite" in laboratorio e infine trapiantate, potrebbero curare i danni tissutali in corso mediante la ricostruzione *de novo* dell'appropriata citoarchitettura cellulare. Potrebbero funzionare anche rilasciando ulteriori principi attivi (ad esempio sostanze antiinfiammatorie o fattori di crescita) ed agire quindi da "minipompa biologica". Possono inoltre essere migliorate geneticamente, mediante correzione genica (qualora siano portatrici di un difetto genico) o aggiunta genica. Si potrebbe anche immaginare un domani in cui le staminali possano fornire un intero DNA che possa quindi aggiungersi e "ringiovanire" una cellula. Certamente il ripristino dei tessuti danneggiati mira ad offrire un vantaggio terapeutico duraturo in condizioni che possono comprendere sia le patologie congenite che acquisite, oltre a quelle associate all'invecchiamento. Il risultato curativo dipenderà dalla capacità della popolazione di cellule staminali impiegata nell'assicurare il massimo grado di rigenerazione tissutale, e nella costituzione della nicchia tissutale nel contesto ambientale patologico che permetta l'instaurarsi del beneficio terapeutico.

Le cellule staminali: definizione e principali tipologie

In generale, una cellula staminale è una cellula immatura che presenta due caratteristiche principali che la distinguono dalle altre cellule:

- 1) l'**auto-rinnovamento** (o *self-renewal*), ossia la proprietà per la quale le cellule sono in grado di riprodurre se stesse
- 2) il **potenziale differenziativo**, inteso come la capacità di una singola cellula di dare origine a una progenie che comprende differenti tipi cellulari.

Una ulteriore definizione, ancora più rigorosa, è su base funzionale: una cellula staminale è tale quando è in grado di generare le diverse componenti cellulari del tessuto in cui si trova per l'intera durata della vita dell'organismo.

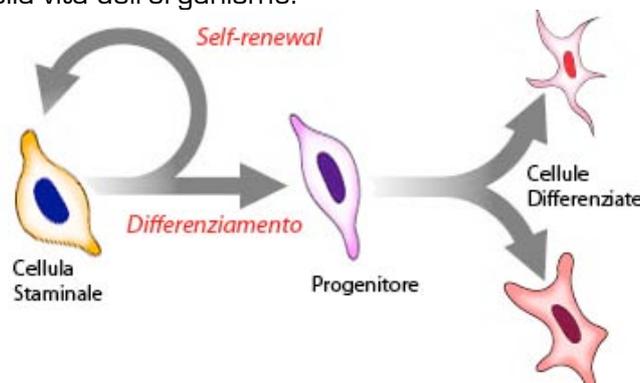


Figura 1. La cellula staminale è in grado sia di replicarsi generando una progenie con le medesime caratteristiche di potenzialità della cellula madre oppure generare una progenie con un potenziale più ridotto (progenitori) che gradualmente differenziano generando delle cellule mature.



Ancora una volta quindi, la staminale del sangue o della pelle si collocano ai vertici di questa classificazione in quanto aderiscono pienamente a questo requisito. Tuttavia, per la maggior parte degli altri tessuti e delle altre staminali, ad oggi, questa dimostrazione funzionale manca o è incompatibile con il ruolo della staminale in questione (pensiamo ad esempio alla staminale del cervello).

Le cellule staminali vengono anche distinte in base alla loro apparizione temporale durante lo sviluppo (**Figura 2**).

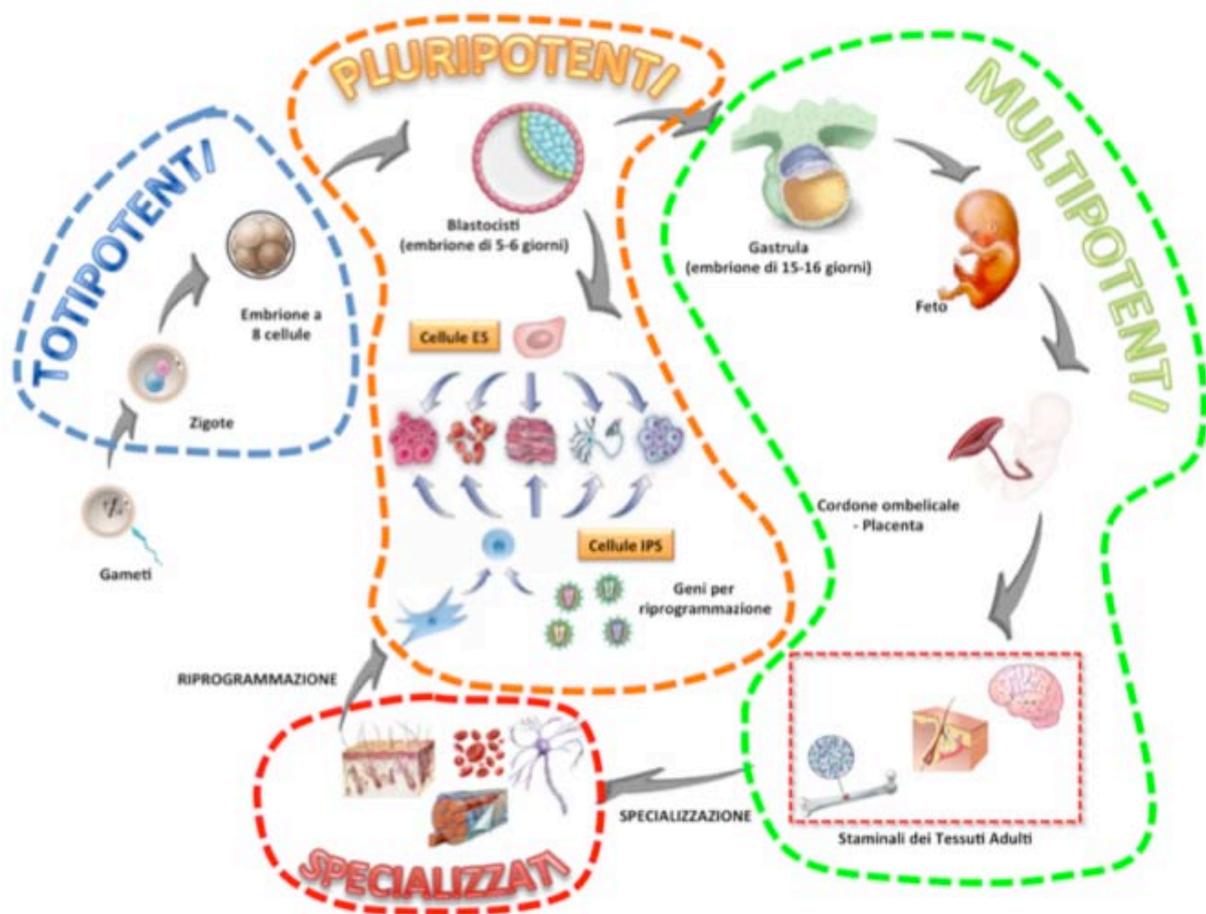


Figura 2. Tipologie di cellule staminali presenti durante le varie fasi dello sviluppo dell'organismo. La prima cellula con potenziale totale (totipotente) a comparire è lo zigote. La totipotenza viene mantenuta fino allo stadio di 8 cellule. In seguito si genera la blastocisti dalla cui massa cellulare interna è possibile isolare *in vitro* le cellule ES che hanno caratteristiche di pluripotenza. In seguito la blastocisti si impianta nell'utero materno e procede con lo sviluppo andando incontro alla formazione della gastrula, in cui si instaurano i tre foglietti germinativi da cui prenderanno origine e diversi tessuti e organi. Si ha quindi un ulteriore restringimento della potenza differenziativa (da qui in poi si avranno cellule staminali multipotenti collettivamente denominate come cellule staminali "somatiche" o "adulte"). A seguire, si possono trovare le cellule staminali nei tessuti ai vari stadi dello sviluppo del feto, nel sangue cordonale e nei tessuti post-natali ed adulti. Infine, dalle cellule differenziate, tramite il processo di riprogrammazione descritto da Shinya Yamanaka si possono creare le cellule iPS che mostrano le caratteristiche di pluripotenza tipiche delle cellule embrionali staminali.



Le cellule staminali si trovano infatti lungo tutto il corso dello sviluppo di un individuo e si presentano con un grado di plasticità differente che permette di classificarle in:

a) **totipotenti**. È lo zigote, in quanto cellula che può differenziare dando origine ad un organismo completo. Si tratta di una cellula transiente non espandibile come tale. Questo stato viene mantenuto anche nelle fasi immediatamente successive fino all'embrione allo stadio di 8 cellule.

b) **pluripotenti**. A questo gruppo appartengono due tipologie cellulari: le prime, presenti transientemente nella blastocisti, prendono il nome di cellule embrionali staminali (ES); le seconde, denominate "cellule iPS" (cellule dalla pluripotenza indotta) sono invece il risultato di una recente scoperta che prevede una manipolazione in laboratorio, sono ottenute riprogrammando, mediante l'inserimento di alcuni geni legati alla pluripotenza, cellule mature adulte a cellule simil-ES. Diversamente dallo zigote, le cellule pluripotenti non possono differenziare in un organismo completo. Tuttavia mantengono un elevato potenziale differenziativo in quanto sono in grado di produrre i derivati dei tre foglietti germinativi (ectoderma, mesoderma ed endoderma; da essi si originano tutti i tessuti dell'organismo) e quindi di generare staminali tessuto-specifiche oltre alle tipologie di cellule funzionalmente mature che da esse derivano - si tratta delle oltre 250 grosse tipologie di cellule presenti nel feto e nell'organismo adulto. Le cellule pluripotenti non possono generare cellule dei tessuti extra-embryonali (trofoectoderma e placenta).

c) **multipotenti**. Sono le cellule staminali adulte e tessuto-specifiche (dette anche somatiche), presenti nei diversi tessuti del feto e dell'organismo adulto e in grado di differenziare solamente nei tipi cellulari del tessuto di cui fanno parte. Per esempio la cellula staminale ematopoietica differenzia generando gli 8 principali tipi cellulari maturi che compongono il sangue. È importante sottolineare che le cellule staminali adulte (del sangue, della pelle, del muscolo, del sistema nervoso, del rene, ecc), sebbene raggruppate in un'unica tipologia, comprendono categorie e definiscono ambiti di ricerca ben distinti, in quanto a caratteristiche delle cellule, possibilità del loro isolamento ed espansione, potenzialità differenziativa e potenziali impieghi terapeutici.

Nelle diverse tipologie di cellule staminali presenti nelle varie fase dello sviluppo si assiste ad un graduale restringimento delle potenzialità differenziative delle cellule.

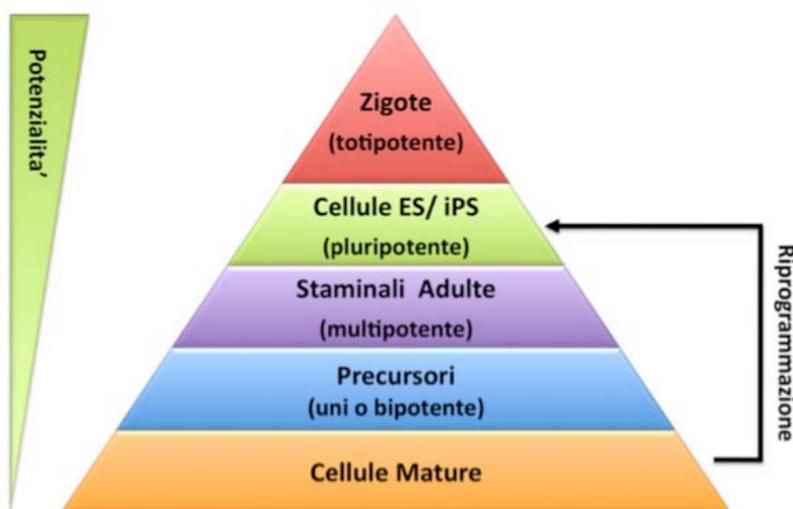


Figura 3. Gerarchia della potenzialità differenziativa delle cellule. In cima alla piramide si trova lo zigote, in grado di originare tutto un individuo completo, inclusi gli annessi embrionali. Le cellule staminali embrionali o le cellule iPS (derivate da processi di riprogrammazione) sono pluripotenti, potendo originare tutti i derivati dei tre foglietti germinativi. A seguire, si trovano le cellule staminali adulte caratterizzate da uno stadio di multipotenza, potendo originare solo i derivati funzionali del tessuto di origine ed i precursori, cellule ad attività proliferativa e differenziativa ristretta ad uno o due tipi

funzionali. Infine, si ritrovano le cellule mature che, nei casi in cui possono dividersi, lo fanno soltanto per generare altre cellule mature uguali a quelle di origine.



Cellule staminali pluripotenti

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 EC.

In seguito, nel 1981, Martin Evans e Matthew Kaufman 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.

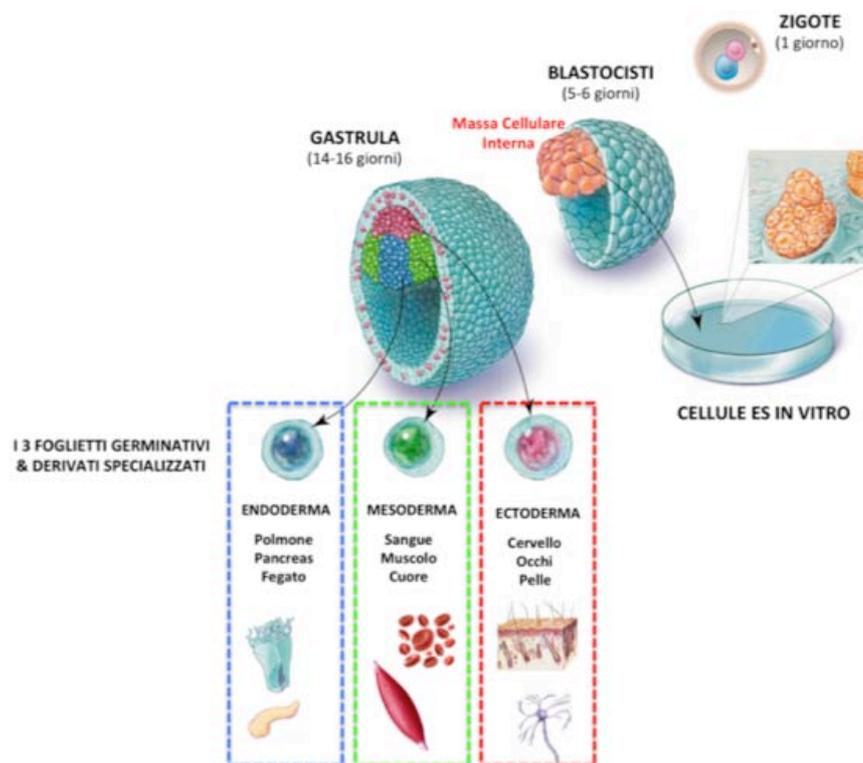


Figura 4. Lo sviluppo precoce dell'embrione dalla fertilizzazione fino agli stadi di blastocisti e gastrula. In particolare dalla blastocisti si può isolare la Massa Cellulare Interna dalla quale, se messa *in vitro* in condizioni opportune, si possono ottenere le cellule staminali embrionali. Se lasciata sviluppare ulteriormente, la blastocisti dà origine alla gastrula, nella quale si definiscono le suddivisioni nei tre foglietti germinativi.

Le cellule ES sono state adattate per crescere e quindi dividersi *in vitro* in assenza di cambiamento pur mantenendo la potenzialità di differenziarsi in cellule del mesoderma, endoderma ed ectoderma, qualora stimolate opportunamente (**Figura 4**). In quanto cellule staminali pluripotenti, una volta reintrodotte nell'embrione allo stato di blastocisti poi reimpiantato in topi femmine accettrici, le cellule ES partecipano attivamente alla



formazione dei tessuti dell'embrione (si genera il cosiddetto "embrione chimera") e dimostrando l'abilità a differenziare anche *in vivo* in cellule provenienti da tutti e tre i foglietti germinativi. La loro capacità di originare chimere viene sfruttata come prova dimostrativa della reale staminalità di una popolazione cellulare. È importante sottolineare che le cellule ES murine tuttavia non contribuiscono ai tessuti extraembrionali come la parte trofoblastica della placenta, ad indicare il loro potenziale più ristretto rispetto allo zigote. Un'altra caratteristica peculiare delle cellule ES murine è la loro capacità di formare teratomi, una volta iniettate in topi immunodeficienti. Si tratta di tumori benigni che contengono svariati tipi di cellule, alcune altamente differenziate, altre parzialmente indifferenziate, provenienti da differenti foglietti germinali, segno del loro multiforme potenziale differenziativo (**Figura 5**).

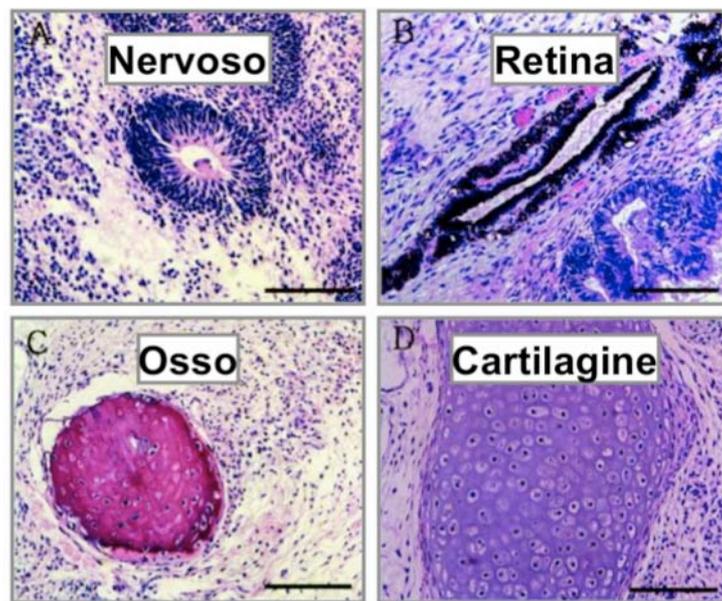


Figura 5. I teratomi sono tumori "embrionali" che presentano al loro interno molti tipi di tessuti maturi. Si ottengono sperimentalmente iniettando cellule ES nel sottocute di topi immunodepressi. Sotto sono mostrati alcuni esempi di tessuti che si trovano in un teratoma.

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) attraverso una procedura che, per ottenere le cellule di interesse, ne provocava la distruzione. L'interesse verso le cellule ES umane risiede nel fatto che, come la loro controparte murina, esse hanno il potenziale di differenziare in tutti i tipi cellulari (ad esclusione dei derivati extraembrionali) del corpo umano, fetale ed adulto. In laboratorio, le cellule ES umane sono state differenziate in cellule epidermiche, adrenali e cheratinociti, ma anche in cellule dell'endotelio, del rene, dell'osso, del muscolo e del cuore, del pancreas e del fegato, anche se l'efficienza di queste conversioni non è totale. È stato anche riportato il differenziamento di cellule ES umane in cardiomiociti ed in neuroni elettrofisiologicamente maturi, comparabili con quelli presenti normalmente *in vivo*. I dati finora ottenuti indicano che questa capacità differenziativa non è emulabile con staminali adulte. Studi in modelli animali hanno inoltre dimostrato che il trapianto di cellule derivate da cellule ES umane può trattare con successo alcune malattie congenite, incluse malattie cardiovascolari e diabete, o danni da traumi a carico del midollo spinale, il che sottolinea ancora una volta le potenzialità di utilizzo delle cellule ES nella rigenerazione tissutale e nella medicina moderna, anche se il rischio dell'insorgenza di



teratomi non è da sottovalutare e rappresenta uno degli aspetti in studio. La ricerca odierna su queste cellule mira infatti a trapiantare derivati delle cellule ES già specializzati. Ad oggi 3 sperimentazioni cliniche sono state autorizzate dalla FDA basate su cellule staminali embrionali umane. È anche importante sottolineare che gli obiettivi della ricerca sulle cellule ES si estendono anche ad altri ambiti quali la tossicologia, lo studio di farmaci oltre alla possibilità di impiegare queste cellule per capire meccanismi di malattia o la fisiologia dello sviluppo embrionale umano.

Il 2006 segna un altro anno di rivoluzione scientifica. **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 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; **Figura 6**).

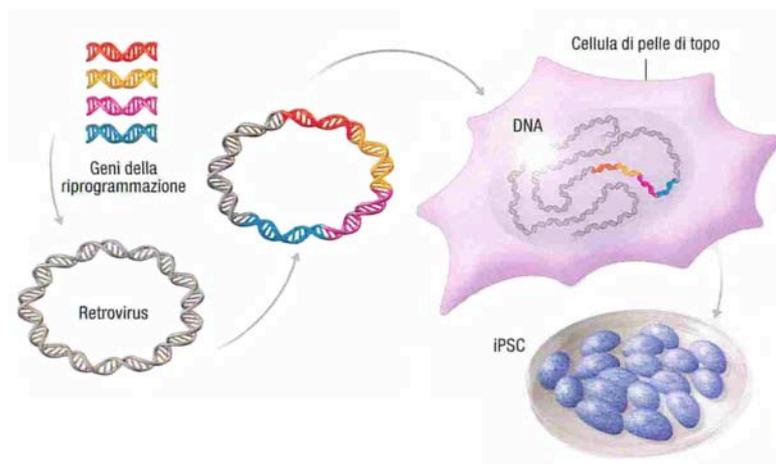


Figura 6. La tecnica della riprogrammazione prevede la veicolazione di 4 geni legati alla pluripotenza (Oct4, Sox2, Klf4 e c-myc) in cellule differenziate. L'espressione di questi 4 geni accende un programma di "de-differenziamento" che fa regredire le cellule a cellule iPS caratterizzate da uno stadio di pluripotenza simile a quello delle cellule ES. Inizialmente questa tecnica ha previsto la veicolazione dei geni mediante vettori retrovirali; attualmente sono utilizzabili anche altre metodologie che evitano il ricorso a sistemi virali, aumentando quindi il grado di sicurezza del processo.

L'avvento della tecnologia delle cellule iPS ha rappresentato un altro formidabile giro di boa nel campo della biologia delle cellule staminali, aprendo enormi prospettive per l'utilizzo di queste cellule staminali per lo studio delle malattie ed in ambito clinico. Esse infatti associano la pluripotenza e la potenzialità differenziativa delle cellule ES al fatto di potere essere ottenibili dall'individuo stesso. 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.

Oggi, non c'è scienziato al mondo che non consideri la scoperta della riprogrammazione come tra le più rivoluzionarie degli ultimi decenni. Le cellule iPS sembrano mantenere molte delle caratteristiche delle staminali embrionali vere, incluso la potenzialità differenziativa, anche se sembra ormai chiaro che le cellule iPS non siano proprio identiche alle cellule ES. Una serie di studi, alcuni pubblicati nel febbraio 2011



indicano che le cellule adulte di partenza mantengono una memoria epigenetica e quindi quando riprogrammate a iPS predispongono le cellule a differenziare in modo preferenziale ad alcuni elementi cellulari. Certo è che queste caratteristiche potranno essere studiate e capite nelle differenze e nelle somiglianze e quindi per le loro potenzialità, solamente attraverso un continuo confronto diretto con le staminali embrionali umane “vere”.

Un ulteriore recentissimo sviluppo della strategia di riprogrammazione, prevede una 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 (**Figura 7**).

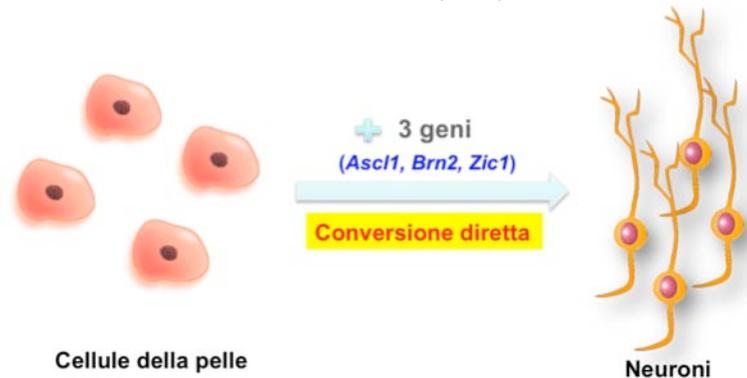


Figura 7. La tecnica della conversione diretta da un tipo cellulare ad un altro. L'esempio mostrato riporta la conversione delle cellule della pelle in cellule nervose, procedimento descritto da Questa tecnica prevede la veicolazione di 3 geni specifici [Ascl1, Brn2 e Zic1] in cellule della pelle. L'espressione di questi 3 geni avvia un processo di “trasformazione” della cellula originale in una cellula differenziata di tipologia completamente differente.

Cellule staminali multipotenti o adulte

Molti tessuti del nostro corpo sono popolati da cellule staminali. Queste lavorano fisiologicamente per garantire il ricambio cellulare necessario al mantenimento della funzionalità dell'organo stesso. La loro abbondanza e attività nei vari tessuti è tuttavia molto differente e in generale si può dire che le staminali sono tanto più abbondanti in un tessuto quanto maggiore è la sua capacità (e necessità) rigenerativa. Ad esempio, le già citate staminali che generano i derivati specializzati del sangue sono staminali “professioniste” in quanto ogni giorno il midollo osseo deve produrre 2,5 MLD di eritrociti, 2,5 MLD di piastrine e 1 MLD di leucociti per kg di peso corporeo per sostituire quelle “usurate”. Un altro tessuto ricco in staminali è l'epidermide la quale, ogni minuto, perde (e deve rigenerare) 30×10^3 cellule del suo strato più superficiale per permettere al nostro organismo di vivere. Ai poli estremi vi sono le staminali del cervello. Solo più recentemente riconosciute, queste cellule, localizzate in due aree del cervello, l'ippocampo e la zona sottoventricolare, sono numericamente esigue e poco attive. A fronte dei circa 100 MLD di neuroni presenti in un cervello adulto, una stima approssimativa parla di una perdita di circa 85×10^3 cellule sottocorticali al giorno che non vengono sostituite.

Anche se i fattori ed i processi che governano il potenziale differenziativo delle cellule staminali derivate da tessuto non sono ancora ben noti, c'è una crescente attenzione all'isolamento, caratterizzazione e potenziale terapeutico di queste staminali residenti nei tessuti adulti, allo scopo di ripararli e rigenerarli. Queste infatti sono di più facile accesso



delle embrionali e, per alcune di esse le cui applicazioni non richiedono una forte espansione *in vitro*, la capacità differenziativa resta notevole. Un esempio emblematico è rappresentato dalle cellule staminali ematopoietiche, probabilmente le cellule staminali adulte meglio conosciute, che sono state oggetto di profonde ricerche di base e cliniche. Le cellule staminali ematopoietiche possono essere isolate in modo prospettico (con anticorpi specifici), quindi arricchite e utilizzate sia in trapianti di tipo autologo che allogenico per il trattamento di pazienti con immunodeficienze ereditarie, malattie autoimmuni o altre malattie a carico del sistema ematopoietico per ricostituire le diverse tipologie di cellule ematiche e le difese del sistema immunitario. È stata inoltre riportata l'integrazione di HSC in differenti tessuti (diverso dal tessuto ematopoietico) danneggiati dell'animale, tuttavia in molti casi è stato dimostrato che queste cellule invece di transdifferenziare, si fondevano con cellule tessuto-specifiche preesistenti, assumendone i connotati.

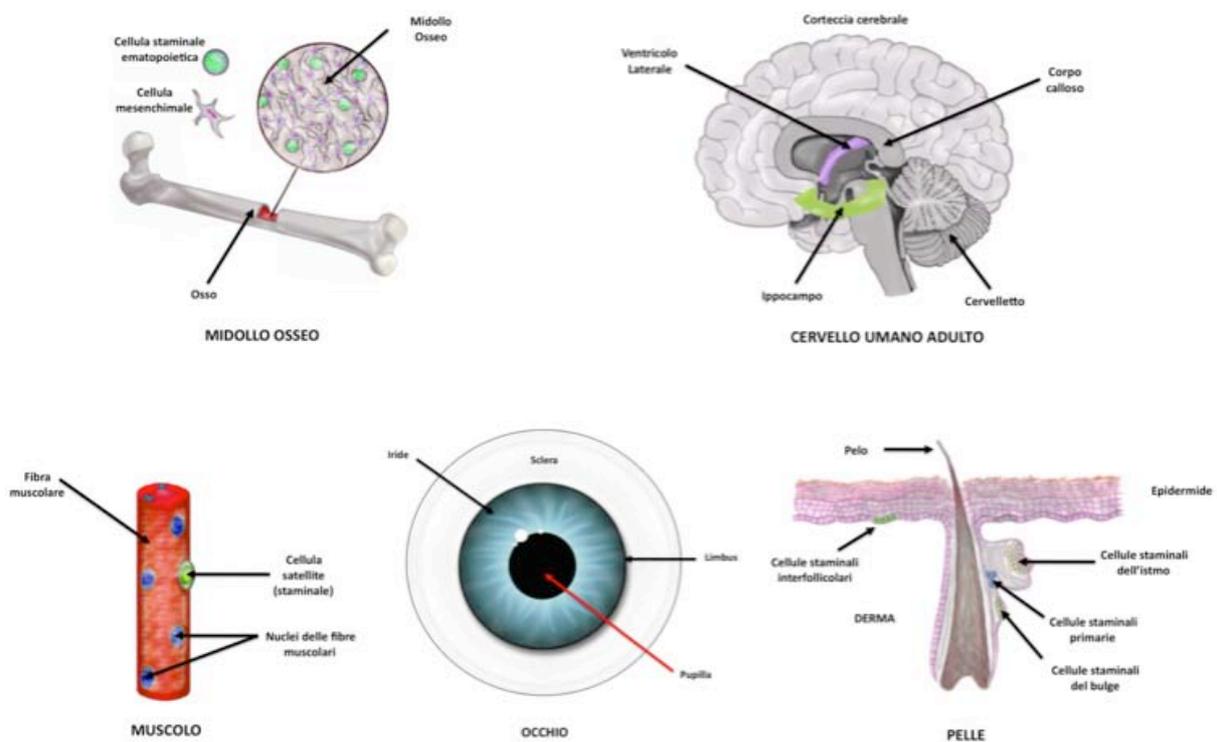


Figura 8. Esempi di cellule staminali adulte presenti in specifici distretti tissutali. Sono indicate le cellule staminali ematopoietiche presenti nel midollo osseo, le cellule staminali del cervello presenti nella zona Sub Ventricolare (SVZ) del ventricolo laterale e nell'ippocampo, le cellule satellite del muscolo e le cellule staminali della cornea residenti a livello del limbus. Nella pelle sono invece state identificate inizialmente tre tipi di cellule staminali "specializzate" a livello dello strato basale [cellule staminali interfollicolari che ricostituiscono l'epidermide], a livello del bulge [deputate alla crescita pilifera] e dell'istmo [deputate alla formazione delle ghiandole sebacee]. Più recentemente è stata individuata una nuova popolazione di cellule staminali comuni dalla quale originano tutti gli altri tipi di staminali della pelle.

Da un punto di vista temporale, tra le cellule ES e quelle adulte si collocano le cellule staminali fetali. Anch'esse sono definite multipotenti e adulte in quanto presenti nei tessuti già specializzati. Si pensa che le cellule staminali ottenute da sangue e tessuti fetali abbiano proprietà ed immunofenotipo simili a quelli delle cellule staminali isolate da tessuto adulto.



Le ricerche finora condotte suggeriscono che le cellule staminali fetali siano più plastiche delle cellule staminali adulte e quindi possano avere un potenziale terapeutico maggiore.

Anche il sangue da cordone ombelicale attira l'interesse come sito alternativo di cellule multipotenti da impiegarsi nella medicina rigenerativa. Anche la placenta, che è coinvolta nel processo di mediazione della tolleranza fetale, contiene cellule che possiedono proprietà immunomodulatorie. Queste due caratteristiche possono dimostrarsi fondamentali per future applicazioni cliniche.

Un discorso simile è applicabile per le cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cell* o MSC) che stanno raccogliendo sempre più interesse come cellule per applicazioni terapeutiche. È bene ricordare tuttavia che, in molti casi, i protocolli di ottenimento ed espansione di cellule staminali adulte non sono consolidati. Con la sola eccezione delle staminali del sangue (spesso impiegate in trapianti diretti, senza espansione *in vitro*) e della pelle, uno dei casi rari di isolamento prospettico ed espansione illimitata *in vitro* senza perdita della multipotenza, in tutti gli altri casi di staminali adulte spesso il prelievo e la crescita in laboratorio ne alterano le caratteristiche.

La **tabella 1** riporta una sintesi delle diverse tipologie di cellule staminali e delle loro caratteristiche biologiche e di applicabilità clinica.



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

Tabella 1. Caratteristiche delle principali tipologie di cellule staminali.