

La Ricerca sulle Cellule Staminali

Risultati
Prospettive
Prerequisiti

Contenuti

Panoramica generale e raccomandazioni	3
Introduzione	9
La natura delle cellule staminali e il differenziamento in specifiche tipologie cellulari Martin Evans	13
Cellule staminali: potere e potenzialità Austin Smith	16
Il trasferimento somatico nucleare: Prospettive per la ricerca sulle malattie e per la terapia Ian Wilmut	19
Cellule staminali somatiche del sangue: le cellule staminali emopoietiche Elaine Dzierzak	22
Ricerca sulle cellule staminali nel tessuto osseo Paolo Bianco	26
Cellule staminali e tumori Riccardo Fodde	29
Riparare il cuore: la ricerca nelle cellule staminali nell'infarto acuto del miocardio e nelle malattie croniche delle coronarie Michael Brehm e Bodo E. Strauer	34
Ricerca sulle cellule staminali nell'endotelio vascolare Stefania Dimmeler	41
Ricerca sulle cellule staminali negli epiteli Michele De Luca	41
La ricerca sulle cellule staminali del cervello e del sistema nervoso Janas Frisén	44
La ricerca sulle cellule staminali per il pancreas Helena Edluland	47
La ricerca sulle cellule staminali nel muscolo scheletrico Giulio Cossu	51
Valutare le potenzialità terapeutiche delle cellule staminali Frank Barry	55
Lo sviluppo commerciale delle cellule staminali: in rapporto preliminare di un'azienda che opera negli Stati Uniti Thomas Okama	58
La prospettiva di una organizzazione internazionale di pazienti Robert Goldstein	62
Un glossario per la biologia delle cellule staminali Austin Smith	65

Panoramica generale e raccomandazioni

Panoramica sul documento

Questo documento nasce dal contributo di specialisti in diverse aree della ricerca e delle applicazioni in medicina delle cellule staminali e di un gruppo di pazienti che – oltre ad aver scritto gli articoli che compongono questo testo – hanno partecipato ad un incontro di consultazione organizzato dall'EMBO nell'aprile del 2006.

Questo documento riassuntivo contiene un'introduzione sulle cellule staminali e alla sua terminologia per non esperti e le contestualizza nell'attuale ricerca scientifica per la produzione di conoscenza, con un occhio di riguardo alla rilevanza per le più importanti malattie non infettive e al valore economico. Inoltre, contiene alcuni suggerimenti per stabilire linee guida in grado di permettere alla ricerca europea di esprimere il proprio potenziale.

Gli aspetti trattati sono:

I concetti di base e le tecniche

- la natura delle cellule staminali e la loro differenziazione in specifici tipi cellulari
- le cellule staminali embrionali: potenza e potenzialità
- il trasferimento nucleare di cellule somatiche per la produzione di cellule staminali embrionali

la ricerca suddivisa per specifiche tipologie di cellule e tessuti

- il sangue
- il tessuto osseo
- il cancro (modello delle cellule staminali)
- il muscolo cardiaco
- gli endoteli che rivestono i vasi sanguigni
- il cervello e il sistema nervoso
- il pancreas
- il muscolo scheletrico

dalla teoria alla terapia

- valutare le potenzialità terapeutiche delle cellule staminali
- sviluppi economici delle cellule staminali embrionali: un report dalle compagnie che operano negli Stati Uniti

- Prospettive per un'organizzazione internazionale di pazienti

Il punto della situazione

Sono note diverse applicazioni delle cellule staminali per la terapia nell'uomo, sperimentate e validate: dai trapianti di midollo osseo ad applicazioni più recenti per la rigenerazione della pelle e della cornea.

Le cellule utilizzate in questi casi provengono da cellule staminali presenti nei tessuti differenziati degli adulti, la cui normale funzione è mantenere e riparare i tessuti lungo il corso della vita. Sono state identificate cellule staminali in diversi tessuti, ma sono generalmente rare. La loro precisa funzione, il loro numero e la loro identità sono, in generale, non sono ancora del tutto noti.

Accanto a questi tipi di studi, la ricerca sulle cellule staminali ottenute dai primi stadi dello sviluppo embrionale ha identificato delle cellule primordiali progenitrici in grado di produrre tutti i tessuti presenti in un individuo adulto (cellule pluripotenti). Le cellule staminali embrionali (cellule ES, *embryonic stem*) sono estremamente potenti ma anche difficili da controllare allo stato attuale delle conoscenze.

Dal momento che le cellule staminali derivate dai tessuti di individui adulti possono dare luogo ad un numero ristretto di tipologie cellulari, c'è un grande interesse nella possibilità di trasformare le cellule adulte in cellule staminali pluripotenti. Questo può essere ottenuto sia attraverso la tecnica del trasferimento nucleare di cellule somatiche – utilizzato, per esempio, per generare la pecora Dolly – sia con altri metodi.

Questo tipo di studi è ancora all'inizio, ma può offrire grandi possibilità per la medicina rigenerativa del futuro.

La ricerca sulle cellule staminali embrionali e da adulti sta sensibilmente contribuendo all'accrescimento della conoscenza su entrambi i tipi di cellule staminali. Inoltre, apre le porte a possibilità di sviluppo di terapie per malattie che colpiscono diversi tipi di tessuti, come importanti patologie quali il diabete di tipo I e il Parkinson. Infine,

Le cellule staminali degli adulti sono normalmente utilizzate per diversi trattamenti terapeutici nell'uomo, ma sono rare e non ancora ben conosciute...

Le cellule staminali embrionali possono produrre tutti i tessuti degli adulti ma sono attualmente difficili da controllare...

I ricercatori stanno studiando come produrre cellule staminali potenti come quelle embrionali a partire da cellule adulte...

questo tipo di ricerca sta anche aumentando la nostra conoscenza sulla biologia del cancro, il quale può insorgere in seguito a mutazioni nelle cellule staminali.

Attualmente, ci sono pochissimi sviluppi commerciali e l'interesse dell'industria in Europa è estremamente basso per il settore della ricerca delle cellule staminali.

Un importante fattore responsabile di questo limitato interesse è l'interpretazione da parte dell'Ufficio Europeo Brevetti (EPO, *European Patent Office*) della clausola sulla moralità nelle Direttive Europee sulle Biotecnologie (adottate nella Convenzione Europea sui Brevetti), in relazione alla possibilità di brevettare le invenzioni che derivano – ad un certo punto del loro sviluppo – dall'utilizzo di embrioni umani. Questo è riconosciuto come un grosso ostacolo per poter ottenere il massimo dei benefici dalla ricerca e sviluppo sulle cellule staminali.

Prospettive

La ricerca sulle cellule staminali è all'inizio di uno sviluppo che, molto probabilmente, potrebbe aiutare a conoscere e curare molte malattie di interesse sociale, quali per esempio quelle che insorgono durante l'invecchiamento. Tra le potenzialità d'impiego delle cellule staminali non c'è solo la medicina rigenerativa: una migliore comprensione della loro biologia e delle loro caratteristiche a livello molecolare, che permetta di distinguerle dalle altre cellule, è probabile che permetterà di migliorare la nostra capacità di curare e di trovare dei farmaci più specifici per il cancro.

Alcune delle terapie basate sulle cellule staminali attualmente disponibili sono già in fase di studio preclinico negli animali. Per quanto riguarda la pelle e il sangue, la ricerca sulle cellule staminali sta già facendo un ulteriore passo avanti, applicando alla terapia cellulare anche la correzione dei geni malfunzionanti coinvolti in alcune malattie ereditarie. Nei prossimi 2-5 anni, è probabile che molte terapie basate sulle cellule staminali saranno sperimentate in trial clinici, soprattutto per quanto riguarda la rigenerazione del tessuto muscolare e la riparazione di fratture ossee.

Nella ricerca per una cura per il diabete di tipo I, c'è un crescente interesse sulle fonti delle cellule staminali embrionali – embrioni, feti o adulti – che possono essere usate per rinnovare a scopo terapeutico le cellule beta del pancreas che producono l'insulina. Nel sistema circolatorio è in aumento l'impiego terapeutico del trapianto di midollo osseo o di sangue derivato dal cordone ombelicale. Questo tipo di ricerche potrà condurre ad una migliore comprensione delle cellule cancerose responsabili della leucemia, e attraverso queste, allo sviluppo di terapie farmacologiche più accurate.

Inoltre, le cellule staminali potrebbero essere utilizzate in un'ampia varietà di rigenerazione dei tessuti. I test effettuati su modelli animali di Parkinson nel ratto hanno già dimostrato le potenzialità della sostituzione cellulare nel tessuto nervoso. Inoltre, le potenzialità proliferative delle cellule staminali embrionali sono un grosso vantaggio per la ricerca, in quanto permettono di avere a disposizione un numero praticamente illimitato di cellule per poter studiare in meccanismi che conducono all'insorgenza della malattia e per poter testare nuovi farmaci. La ricerca sulle cellule staminali embrionali e quella sulle cellule staminali da adulto sono interconnesse e generano ricadute in entrambi i settori, che aumenteranno ulteriormente se si riuscirà a capire come ottenere una maggiore espansione e un differenziamento più direzionato verso precise tipologie cellulari delle cellule staminali embrionali.

Da quando sono note le cellule staminali da adulti, la ricerca ha sempre cercato di identificare e caratterizzare le cellule staminali residenti in un numero sempre crescente di tessuti. Un miglior riconoscimento dei normali meccanismi che sono attivati durante la riparazione di danni ai tessuti aprirà, con molta probabilità, la porta al modo di controllare direttamente il macchinario innato di riparazione mediante l'utilizzo di farmaci, citochine o fattori di crescita. Esistono alcune Prospettive concrete per questo tipo di sviluppo che derivano dalla ricerca sui tessuti cerebrali e cardiaci – ma potrebbero essere applicati a cellule staminali da adulti di diversi tessuti.

In realtà, esistono poche evidenze di presenza costante e diffusa di cellule

La combinazione di studi su cellule staminali embrionali e da adulti sta contribuendo al progresso della biomedicina...

L'interesse dell'industria è molto basso in Europa per via dell'attuale regolamentazione della brevettazione...

La ricerca sulle cellule staminali sta iniziando a darci nuovi strumenti per combattere importanti malattie, e alcuni di questi passeranno presto dalla fase preclinica a quella clinica...

Le cellule staminali embrionali hanno grandi potenzialità per il trattamento di malattie degenerative e per la realizzazione di sistemi per la sperimentazione farmacologica...

Trovate in un crescente numero di tessuti, le cellule staminali embrionali potrebbero essere attivate con farmaci o altre strategie, per stimolare la riparazione naturale dei tessuti...

pluripotenti nei tessuti adulti. Pertanto, uno dei principali obiettivi della ricerca sulle cellule staminali è trovare il modo di riprogrammare una cellula adulta in modo che diventi pluripotente. Il trasferimento nucleare è un modo per ottenere questo risultato. Questa tecnica sarà presto usata per creare delle cellule staminali embrionali da pazienti per studiare le malattie che colpiscono i motoneuroni (nell'ambito degli studi sulla sclerosi laterale amiotrofica). Altre gravi malattie degenerative ereditarie potrebbero essere affrontate con questo approccio – in questo contesto, la chiave di volta è la comprensione delle basi delle malattie ereditarie per le quali i geni coinvolti non sono ancora stati identificati, oppure non esiste ancora un buon modello di studio. La ricerca con le cellule staminali embrionali potrebbe portare anche alla comprensione dei meccanismi per riprogrammare e accelerare lo sviluppo di metodi che non richiedono il trasferimento nucleare in uova denucleate.

L'industria ha un ruolo cruciale, costantemente in aumento, nello sviluppo della tecnologia di coltura delle cellule staminali. Negli Stati Uniti sta attivamente lavorando su questo settore per le cellule gliali (cellule di supporto nel sistema nervoso centrale) per la riparazione di danni alla spina dorsale, per i cardiomiociti (cellule del cuore) per malattie cardiache, per le cellule che producono l'insulina nel pancreas per il diabete, per le cellule emopoietiche (da cui derivano le cellule del sangue) per le malattie del sistema circolatorio, e per gli epatociti (cellule del fegato) per i test farmacologici.

Riflessioni, problemi e questioni aperte

Nonostante lo sviluppo di applicazioni basate sulle cellule staminali è talvolta presentato come una scelta tra la ricerca con cellule staminali embrionali o con cellule staminali da adulto, gli avanzamenti biomedici possono provenire indifferentemente da entrambi gli approcci. E' noto che le cellule staminali embrionali sono pluripotenti, cioè hanno la capacità di dar luogo a qualsiasi tipo cellulare nel corpo. Nonostante ciò, questa potenza è offuscata dalla mancanza di certezze sulla loro stabilità in uno stato

differenziato o parzialmente differenziato. Inoltre, sono noti solo un numero limitato di segnali necessari per ottenere il differenziamento definitivo. Le cellule staminali da adulto, nonostante abbiano un ambito ristretto di tipi cellulari che possono generare, si possono controllare facilmente, soprattutto proprio perché hanno poche potenzialità. Ad ogni modo, diversi studi hanno dimostrato che la ricerca in un settore produce benefici che ricadono anche nell'altro settore. Pertanto, è importante sostenerle entrambe.

Le cellule staminali sono un'entità che deve essere compresa e manipolata in laboratorio prima di essere introdotta nel paziente. In generale, l'effetto diretto delle cellule staminali sulla rigenerazione è dovuto alla proliferazione e differenziazione delle cellule nel tessuto desiderato. In alcuni casi, comunque, il trapianto di cellule può avere effetti benefici indiretti, dovuti a segnali antinfiammatori e di crescita emessi dalle cellule, chiamato anche effetto *bystander* (effetto del vicino). E' necessaria molta ricerca sulle caratteristiche e sulla fisiologia dei tessuti per comprendere a fondo come l'introduzione di cellule staminali interagisca con il tessuto ospite e a che cosa si possa ricondurre l'essenza del potere rigenerativo. Questo tipo di ricerche rappresenta una base per l'ottimizzazione delle strategie terapeutiche. Alcuni tipi di rigenerazione tissutale possono richiedere l'introduzione di due o più tipi cellulare diversi per ottenere un beneficio clinico ottimale. In altri casi, può essere efficace somministrare semplicemente una miscela di citochine al posto delle cellule, oppure utilizzare un approccio misto con cellule e citochine.

In linea di principio, i difetti genetici in un tessuto possono essere trattati usando le cellule staminali. Utilizzando le cellule del paziente e riparando o sostituendo il gene interessato si potrebbero evitare i problemi dovuti al rigetto delle cellule trapiantate da donatori. Le potenzialità di questo tipo di trattamento sono quelle di una terapia a lungo termine o, addirittura, di una cura definitiva. Il valore di queste cellule staminali geneticamente corrette è stato dimostrato a livello di principio di evidenza. In ogni caso, è anche necessario sviluppare metodi alternativi a quelli usati attualmente per correggere i

Dal momento che le cellule staminali non sembrano avere grandi capacità di differenziamento, i ricercatori stanno lavorando su tecniche di riprogrammazione del nucleo verso uno stadio più primordiale, aprendo Prospettive per il trattamento di importanti malattie ereditarie...

La tecnologia delle cellule staminali continua ad evolversi negli Stati Uniti grazie al coinvolgimento dell'industria...

Le cellule staminali embrionali e da adulte hanno diversi vantaggi e svantaggi, fare ricerca su entrambe per avere risultati complementari è cruciale...

Per una somministrazione efficace, le cellule staminali devono essere ben comprese e preparate in modo particolare, sono necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo della rigenerazione dei tessuti dovuta alle cellule stesse e ai segnali che emettono...

difetti genetici, che usano vettori virali, in modo che sia possibile un ampio utilizzo per le applicazioni cliniche,

Per certe applicazioni (per esempio, per il muscolo scheletrico e il rivestimento dei vasi sanguigni), l'infusione di cellule staminali nel sistema circolatorio può essere utilizzata come via di somministrazione. Però, nella maggior parte delle applicazioni delle terapie basate sulle cellule è molto probabile sia necessaria l'introduzione diretta nel sito della riparazione/regenerazione. Questo richiede tecniche ed equipaggiamenti disegnati specificamente per ogni applicazione clinica, e l'applicazione di sofisticate tecniche di imaging per tracciare le cellule introdotte. Inoltre, diversi approcci sperimentali – soprattutto nella riparazione del tessuto osseo e delle cartilagini – sono basati sull'utilizzo di matrici di supporto in cui le cellule crescono prima di essere impiantate. La ricerca su questi materiali biocompatibili dovrebbe stare al passo con quella sulle cellule staminali e la produzione dovrebbe essere scalata per soddisfare la domanda.

Sia nella ricerca di base che in quella clinica, è necessario sviluppare le tecniche di selezione delle popolazioni di cellule staminali vere, che sono rare, tra una miscela di precursori parzialmente differenziati, notevolmente più abbondanti. Questa separazione delle cellule è importante per aumentare l'efficacia e la specificità delle cellule utilizzate per la somministrazione. Inoltre, in molti casi, non è ancora noto se i precursori coltivati *in vitro* siano ancora in grado di differenziarsi e di funzionare in modo appropriato dopo il trapianto. Ovviamente, una produzione sufficientemente abbondante e il controllo della qualità sono prerequisiti per l'applicazione clinica sicura delle terapie cellulari.

Comunque, l'efficacia delle cellule individuate per la terapia è, alla fine dei conti, importante quanto la sicurezza. Le cellule che sono sottoposte a controlli regolatori interni molto selettivi lo fanno ad un prezzo: possono perdere una parte dei componenti che gli conferiscono la potenzialità di rigenerare i tessuti, e dopo il trapianto potrebbero non comportarsi come desiderato.

E' pertanto necessario mantenere le cellule in uno stato appropriato per

evitare di compromettere la funzionalità delle cellule staminali prima del trapianto. Un'ulteriore considerazione in merito all'ampio utilizzo delle terapie a base di cellule staminali riguarda la necessità di importanti investimenti per rendere queste terapie disponibili per tutti, una volta pronte. Le infrastrutture per scalare la produzione, i controlli di sicurezza e qualità, così come la distribuzione e lo stoccaggio, devono essere adeguatamente predisposti prima che le terapie inizino ad essere disponibili per i trial clinici e per l'ampio utilizzo.

Se le cellule staminali embrionali si dimostreranno utili come strumento terapeutico per un ampio numero di malattie, si dovrà affrontare il problema del rigetto immunologico. Pertanto, a supporto di queste terapie, sarà necessaria la creazione di grandi banche di cellule staminali con diversa istocompatibilità (con parametri analoghi a quelli usati nei trapianti di organo), combinati con l'utilizzo di farmaci immunosoppressivi o strategie che inducono la tolleranza. La derivazione delle cellule staminali embrionali da un paziente attraverso il trasferimento nucleare o mediante una riprogrammazione diretta, rappresenta una possibile alternativa per ovviare al rigetto, ma queste tecniche devono essere sviluppate in modo sicuro ed efficace.

Uno dei principali problemi per la ricerca sulle cellule staminali, in particolare su quella su cellule staminali embrionali umane, è il blocco legislativo per il libero scambio di materiali e la collaborazione a livello internazionale.

La legislazione in merito è molto diversa tra le nazioni in Europa, impedendo a questo settore di ricerca di beneficiare degli avanzamenti scientifici raggiunti a livello internazionale. In alcune nazioni, i ricercatori possono effettuare ricerche con un numero limitato di cellule staminali embrionali umane, ma non possono proseguire le ricerche su altre linee cellulari staminali umane sviluppate da collaboratori in altre nazioni dell'Europa.

Per quanto riguarda il discorso del valore economico e dei brevetti, i ricercatori che lavorano sulle cellule staminali europee hanno a disposizione lo strumento della protezione della proprietà intellettuale relativa alla manipolazione di linee

Le cellule staminali modificate geneticamente possono essere usate per trattare e correggere difetti genetici, ma questo richiede lo sviluppo di nuove metodiche per introdurre il gene "riparato"...

Molte terapie dovranno essere somministrate direttamente nel tessuto in questione, richiedendo una somministrazione sofisticata, l'utilizzo di tecnologie di imaging e in alcuni casi l'utilizzo di supporti costituiti di materiale biocompatibile...

Ottenere le giuste cellule da un tessuto ed essere sicuri che rimarranno efficaci fino alla somministrazione è un punto cruciale; i controlli di efficacia sono importanti quanto quelli sulla sicurezza, e non devono essere lasciati da parte come ultimi...

Sono necessari grossi investimenti per scalare le terapie in modo che diventino ampiamente accessibili; per ridurre il rigetto immunitario, deve essere necessario predisporre delle banche contenenti un gran numero di cellule; il trasferimento nucleare in cellule del paziente deve essere ulteriormente approfondito per poter essere utilizzato come strategia complementare...

Ma gli ostacoli legislativi riducono le possibilità della ricerca di base...

staminali embrionali già stabilizzate e di derivati differenziati, ma non derivate dagli embrioni umani. L'attuale linea dell'Ufficio Europeo Brevetti (EPO, European Patent Office) è di escludere dalla brevettabilità tutte le invenzioni, o altre applicazioni relative, alle cellule staminali embrionali umani. Questa posizione ha le sue radici nel regolamento 23d(c) della Convenzione Europea sui Brevetti (il quadro legale entro cui opera l'EPO), che stabilisce che "i brevetti europei non devono essere assegnati per invenzioni che derivano dalle biotecnologie in cui, in particolare, si fa uso di embrioni umani per scopi industriali e commerciali".

In accordo all'attuale linea dell'EPO, sono esclusi dalla brevettabilità tutte le richieste per prodotti il cui processo richiede l'uso diretto o indiretto di embrioni umani, comprese le cellule derivate dagli embrioni.

Stabilire se questa interpretazione sia corretta o meno, e, in particolare, che sia corretta in merito all'esclusione dalla brevettabilità delle linee staminali embrionali umani già stabilizzate – molto diverse dalle originali che costituivano l'embrione – è una decisione che dipende dall'EPO stessa, che, probabilmente, non risolverà prima del 2008.

Se l'interpretazione finale includerà anche la 23d(c), potrebbero essere esclusi dalla brevettabilità anche tutte le applicazioni e le tecnologie che coinvolgono le cellule staminali embrionali, con importanti conseguenze negative sugli investimenti commerciali futuri in questo settore in Europa.

Questa situazione peculiare – i brevetti sulle cellule staminali sono concessi praticamente ovunque nel mondo, compresi gli Stati Uniti – e la mancanza di un verdetto risolutivo dell'EPO, induce i ricercatori e le aziende a registrare i brevetti a livello di singole nazioni. Per via delle differenze

peculiari tra le nazioni e del problema dell'interpretazione della Direttiva Europea sulle Biotecnologie, l'intero processo rischia di andare in contrasto con gli strumenti progettati, previsti proprio dalla Direttiva, per ottenere l'armonizzazione attraverso l'intera Europa, con il rischio di scaturire in processi legali alla Corte Europea di Giustizia.

Riassumendo, l'attuale situazione della proprietà intellettuale è così complessa e lontana da una risoluzione finale, che l'incentivo, se esiste, per il coinvolgimento di aziende durante lo sviluppo di applicazioni che fanno uso di cellule staminali in Europa è minimo. Negli Stati Uniti e in altre nazioni in cui i brevetti sulle cellule staminali sono già assegnati, gli investitori e le aziende si stanno concentrando in questo settore. Questa situazione mette il settore europeo delle biotecnologie in svantaggio nei confronti dei competitori globali e può riflettersi con conseguenze negative per l'economia e la salute.

Raccomandazioni

Per far sì che la ricerca e lo sviluppo nel settore delle cellule staminali in Europa possa ragionevolmente beneficiare dei propri potenziali per il progresso medico, delle scienze biologiche e dell'economia...

1. Dovrebbe essere riconosciuto che la ricerca sulle cellule staminali ha un enorme valore in termini prospettici di ricaduta sulla salute, sulla produzione di conoscenza e sullo sviluppo economico. Inoltre, la ricerca sulle cellule staminali embrionali dovrebbe essere integrata all'interno dei grandi filoni della ricerca biomedica, come lo studio *in vitro* e *in vivo* delle malattie, lo studio della degenerazione cellulare, lo sviluppo di farmaci e le piattaforme per lo studio della tossicità e per lo sviluppo di terapie rigenerative.
2. La ricerca su cellule staminali embrionali e da adulto sono complementari e dovrebbero essere supportate entrambe; analogamente, si dovrebbe supportare anche la ricerca per comprendere il processo di riprogrammazione del nucleo che si verifica durante il trasferimento nucleare, la fusione cellulare e in altre tecniche.
3. La comunicazione e la formazione sulla ricerca su cellule staminali e sulle applicazioni derivanti dovrebbero essere promosse con un'attiva partecipazione di scienziati, medici, esperti di etica, legislatori e gruppi di interesse di pazienti.

Le tecniche e i prodotti che coinvolgono l'utilizzo di embrioni umani non sono brevettabili in Europa; il principale problema per i ricercatori sono le tecniche per manipolare le cellule staminali e le cellule differenziate che ne derivano...

L'EPO si sta occupando del problema della brevettabilità, ma, probabilmente, non giungerà ad una soluzione prima del 2008...

Nel frattempo, i brevetti sulle cellule staminali embrionali umane sono concessi praticamente ovunque nel mondo...

Questa situazione pone l'Europa in grande svantaggio, per via della situazione complessa e della lontananza di una risoluzione positiva in tema di brevettabilità, che scoraggia gli investimenti, praticamente inesistenti attualmente, dell'industria sulla ricerca e sviluppo sulle cellule staminali...

4. La proprietà intellettuale in merito all'utilizzo delle cellule staminali embrionali umane e delle linee derivate dovrebbe essere brevettabile per incoraggiare lo sviluppo dell'industria e favorire il passaggio dalla ricerca di base a quella applicata.
5. La legislazione sulle cellule staminali e relative applicazioni dovrebbe essere chiarita e armonizzata tra le varie nazioni, e, dove possibile, gli ostacoli legislativi alla libera collaborazione internazionale tra gli scienziati dovrebbero essere rimossi.
6. Le richieste legislative dovrebbero essere formulate in modo accurato, in modo che non siano eccessivamente stringenti e che non ci siano ingiustificate barriere burocratiche o economiche all'applicazione clinica delle cellule staminali, come accade attualmente.
7. Si dovrebbe sviluppare misure efficaci di valutazione e procedure standard per l'utilizzo clinico delle cellule staminali. Nello stabilire le procedure cliniche, le misure di valutazione dovrebbero prevedere tanto misure di valutazione dell'efficacia che delle sicurezza.
8. Si dovrebbe promuovere la costituzione di banche dati di cellule staminali con alti livelli di qualità e dovrebbe essere facilitato l'accesso a livello internazionale di scienziati e aziende.
9. Si dovrebbe promuovere una maggiore armonizzazione e interconnessione dei trial clinici in Europa, per facilitare studi comparabili e la valutazione di tutte le terapie disponibili (comprendenti, ma non solo, le cellule staminali). Questo dovrebbe essere fatto nell'ottica di benefici che ricadono su tutti i cittadini e dovrebbe essere finanziato con fondi pubblici.
10. Si dovrebbero fare investimenti sullo sviluppo della tecnologia per permettere la produzione su larga

scala di cellule staminali per applicazioni nello screening farmacologico, per i test tossicologici e per il trapianto di cellule.

Introduzione

La ricerca sulle cellule staminali è sia un'evoluzione che una rivoluzione della medicina moderna. Può essere vista come una pietra miliare nella storia della scoperta e dello sviluppo di nuove strategie per la terapia e lo studio della biologia: dalle piccole molecole antimicrobiche (come la penicillina), agli anticorpi e anticorpi monoclonali, alle moderne genetica, genomica e terapia cellulare.

Infatti, questo oggi possiamo pensare di usare le cellule staminali in terapia solo perché c'è stata una moltitudine di ricerche che ci hanno fornito le basi scientifiche.

Nel contempo, l'applicazione delle cellule staminali è diversa da qualsiasi altra strategia terapeutica applicata su ampia scala. L'utilizzo delle cellule staminali, in particolare di quelle embrionali, rientra nella tecnologia di trasferimento della postgenomica, che ha le sue premesse nel progetto di sequenziamento del genoma umano. Le aziende negli Stati Uniti utilizzano già i dati provenienti dalla genomica per identificare e derivare linee di cellule staminali embrionali.

Nonostante la loro natura rivoluzionaria, il concetto di utilizzare le cellule staminali per scopi terapeutici ha molto in comune con i principi che stanno alla base della moderna trapiantologia d'organi; invece di introdurre un intero organo in un paziente, si inserisce solo una determinata popolazione di cellule. Inoltre, se queste cellule derivano dallo stesso individuo, non si pone il problema della reazione immunitaria. Alcune terapie cellulari già ampiamente sperimentate che utilizzano le cellule staminali possono essere considerate come una strategia intermedia tra il trapianto d'organo e il trapianto di cellule: tra queste, per esempio, il trapianto di midollo osseo e il trapianto delle isole pancreatiche (contenenti le cosiddette cellule beta, che producono l'insulina nel pancreas). La tecnologia dei trapianti ha permesso alla medicina di curare i pazienti in modi che la sola la chirurgia e farmacologia non avrebbero potuto fare; lo stesso si può pensare che accada, in

prospettiva, della tecnologia delle cellule staminali.

Inoltre, le cellule staminali possono essere potenzialmente impiegate in un ampio spettro di malattie, comuni e rare, e in tutte le fasce d'età (per esempio, artrite reumatoide, distrofia muscolare di Duchenne e deficienze immunitarie congenite).

Esistono casi ampiamente sperimentati nell'utilizzo clinico delle cellule staminali. Per esempio, migliaia di pazienti hanno beneficiato del trapianto di midollo osseo. Durante la Guerra Fredda, la paura di una guerra nucleare ha accelerato la ricerca per la riparazione dei tessuti umani che sono particolarmente soggetti al danno da radiazione (ovvero, i tessuti che si autorigenerano continuamente durante la vita), come il sangue. Il primo successo nel trapianto di midollo osseo ha avuto come esito la sopravvivenza a lungo termine di un paziente affetto da leucemia (il cui midollo osseo malato era stato distrutto dalla radioterapia, prima del trapianto) ed è stato condotto nel 1956 dal Dr E. Donnall Thomas a New York; in questo modo, il principio è stato trasformato in un'applicazione clinica in grado di salvare la vita dei pazienti. Altri progressi sono stati fatti da altri ricercatori nel 1968 (con il primo trapianto di midollo osseo da donatore per curare una malattia diversa dal cancro) e nel 1973 (con il primo trapianto di midollo osseo da donatore non appartenente alla stessa famiglia). Oggi, migliaia di vite sono salvate grazie al trapianto di pelle per trattare le ustione e migliaia di occhi sono salvati dalla cecità grazie all'utilizzo delle cellule staminali della cornea. In certi casi di danno alla cornea, il trapianto tradizionale non è efficace, semplicemente perché non rigenera come fa un tessuto normale. Le cellule staminali possono aiutare a superare questo problema.

Un numero significativo di malattie che potrebbero essere trattate con le cellule staminali sono dovute a geni alterati che manifestano il proprio effetto in un tessuto particolare o in una sottopopolazione di cellule del paziente. Utilizzare cellule staminali, in cui è stato

La tecnologia che si basa sulle cellule staminali rappresenta un metodo rivoluzionario di esplorare i dati provenienti dallo studio del genoma umano...

Ma è anche strettamente correlata, nei principi, alla ben consolidata tecnologia dei trapianti...

Le potenzialità delle cellule staminali sono state dimostrate in diversi trial clinici, evidenziando le loro potenzialità di impiego per diverse malattie...

corretta l'anomalia nel gene non funzionale nel paziente, è un'interessante alternativa al metodo classico che utilizza i vettori virali per trasferire il gene riparato in situ. Si registrano successi per quanto riguarda le cellule staminali modificate geneticamente in trial clinici per almeno una grave e debilitante malattia della pelle.

Le cellule staminali sono molto diverse per quel che riguarda il modo di ottenerle, la capacità proliferativa e il differenziamento nelle cellule adulte a cui possono dare origine.

Fonti di cellule staminali

Le cellule staminali da adulto possono essere ottenute dalle cosiddette *nicchie* presenti nei tessuti adulti (alcune di queste cellule sono state identificate in molti tessuti, dal cervello al muscolo)

- Cellule staminali fetali (per esempio, da feti abortiti o dal cordone ombelicale)
- Cellule staminali embrionali:
 - da embrioni non utilizzati nelle fecondazione *in vitro*
 - attraverso il trasferimento nucleare, noto anche come trasferimento nucleare di cellule somatiche, in cui il nucleo di una normale cellula del corpo è inserito in un uovo fecondato da cui è stato rimosso il nucleo originario. L'ambiente presente dentro l'uovo fecondato permette di azzerare il nucleo trasferito ad uno stadio primordiale.

Spesso si sente citare l'ipotesi che le cellule staminali adulte possano rimpiazzare le cellule staminali embrionali – ponendo fine alle problematiche etiche nell'utilizzo di quest'ultime. Le potenzialità di una cellula staminali adulta per risolvere dei problemi non devono essere sovrastimate, soprattutto perché (**come mostrato nel box 1**) non è ancora del tutto nota la natura delle cellule staminali presenti in molti tessuti. La ricerca sulle cellule staminali embrionali contribuisce alla conoscenza delle cellule staminali embrionali e viceversa. E' necessaria, e con urgenza, molta più ricerca per scostarsi dalla posizione attuale d'incertezza in merito ai benefici e meriti relativi dell'applicazione delle diverse cellule staminali.

L'utilizzo di animali nella ricerca sulle cellule staminali si è dimostrato un aspetto insostituibile e molto importante. Dal primo esperimento sul trapianto di midollo osseo agli esperimenti odierni basati sulla genomica (per definire la natura genetica delle cellule staminali e del loro sviluppo), gli esperimenti sugli animali sono diventati indispensabili. Quando si tratta di applicazioni terapeutiche, non esiste un'autorità regolatoria (né l'americana FDA né l'europea EMEA) che approvi una procedura applicativa senza il supporto dei risultati di test preclinici sulla sicurezza e sulla tossicità condotti sugli animali.

Per permettere alla terapia con cellule staminali di entrare in clinica, devono essere effettuati molti più sforzi. Esistono molte questioni aperte per quanto riguarda il metodo di somministrazione delle cellule. Il metodo, la via e il sito di introduzione in un paziente sono probabilmente specifici del tipo particolare di cellula staminale e dell'impiego. Le potenzialità per la somministrazione locale potrebbero essere ampiamente aumentate grazie allo sviluppo della tecnologia dei cateteri, aumentando la sicurezza. L'infusione di cellule nel sangue in modo che possano raggiungere il target desiderato è probabilmente uno degli impieghi minori (per esempio, per il trapianto di vasi sanguigni o altre parte direttamente accessibili di un sistema vascolare).

Nell'applicazione clinica, probabilmente le cellule staminali dovrebbero essere almeno parzialmente differenziate prima di essere introdotte in un paziente. L'introduzione di cellule staminali indifferenziate dovrebbe essere limitata a casi rari ed eccezionali. Le cellule pre-differenziate sono un materiale più controllato, già pronte per la trasformazione nel tessuto desiderato.

Non mancano casi interessanti già applicati che si avvalgono di cellule staminali, per esempio, la terapia a base di cellule staminali per rigenerare l'epidermide è ormai una procedura effettuata correntemente con successo. Dal momento che le cellule staminali sono un sistema così importante per la terapia, è importante considerare che il loro studio permette ai ricercatori di indagare anche quali sistemi si attivano in una cellula staminale quando ripara un

Tra i possibili impieghi, anche la riparazione di difetti genetici che danno origine a determinate malattie...

Le cellule staminali possono essere derivate da tessuti adulti, tessuti fetali e da embrioni....

Le cellule staminali da adulto non devono essere considerate in alternativa alle cellule staminali embrionali...

I test preclinici su animali sono cruciali per lo studio sulla sicurezza di terapie basate sulle cellule staminali...

Le cellule dovrebbero essere, in via preferenziale, somministrate direttamente nel punto in cui è necessaria la riparazione...

E principalmente, devono essere almeno parzialmente differenziate, prima della somministrazione...

danno dall'interno di un organismo. Le ricerche attuali sulla distrofia muscolare e sull'atrofia muscolare sono un esempio dei risultati di questo tipo di studi. Inoltre, le cellule staminali sono importanti per la ricerca anche per le loro caratteristiche generali, perché aiutano i ricercatori nella comprensione del cancro, della biologia dello sviluppo, della farmacologia, delle malattie degenerative e dei meccanismi di mantenimento di funzioni fisiologiche normali, per menzionare alcune delle possibili applicazioni.

Le cellule staminali, per la loro proprietà di differenziare nei diversi tipi cellulari che si trovano in un organismo, sono un materiale ideale per testare i 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 il metabolismo epatico. In linea teorica, le cellule staminali derivate da una persona potrebbero essere utilizzate per tracciare un profilo della risposta biologica ad un farmaco. Questo uso delle cellule staminali è probabile che possa diventare un settore di applicazione molto grande, con un impatto significativo sull'aumento della sicurezza nei trattamenti terapeutici. La tecnica del trasferimento nucleare ha delle potenzialità molto interessanti per studiare come i diversi tessuti si comportano in presenza di una malattia particolare, o in seguito al trattamento con determinati farmaci. Il trasferimento

nucleare potrebbe rendere possibile la produzione controllata di cellule geneticamente identiche, ma funzionalmente diverse, da uno stesso individuo. Inoltre, potrebbe essere utilizzato per studiare le malattie orfane, che colpiscono poche persone e di cui, pertanto, esistono pochi campioni clinici su cui condurre le ricerche.

In conclusione, le cellule staminali rappresentano un'enorme risorsa per la conoscenza biologica, e, attraverso di essa, per lo sviluppo di nuove terapie. Le potenzialità delle cellule staminali per la terapia sono state dimostrate dalla loro applicazione per la cura di alcune malattie e per la riparazione di determinati danni tissutali. Sono state utilizzate per curare migliaia di pazienti e si possono intravedere tangibili applicazioni per altre malattie e condizioni cliniche. Inoltre, la ricerca sulle cellule staminali porta alla scoperta di informazioni numerose e cruciali per diversi campi di studio, dal cancro alle malattie degenerative. Le indicazioni che arrivano dalle applicazioni cliniche consolidate e dalla ricerca e sviluppo, suggeriscono che le cellule staminali abbiano le potenzialità per favorire notevolmente il progresso in medicina, nell'industria e nell'economia di larga scala – se saranno adeguatamente supportate in termini di finanziamento e politica.

La ricerca sulle cellule staminali fornisce anche informazioni sulle capacità intrinseche di rigenerazione dei tessuti, sui meccanismi di sviluppo delle malattie e sul funzionamento fisiologico delle cellule...

Inoltre, possono essere utilizzate come strumento per testare in modo più adeguato i farmaci e per studiare le malattie, soprattutto quelle rare...

Cellule staminali embrionali	Cellule staminali da adulto
Sono le componenti ubiquitarie di un embrione, le cui proprietà e il ciclo di vita sono stati ampiamente studiati.	Sono rare, spesso difficili da identificare, di origine ignota; proprietà e ciclo di vita sono solo parzialmente noti.
Sono identificabili per la posizione precisa nell'embrione (le cellule che nella blastocisti formano l'embrioblasto, una massa di cellule interne all'embrione nei primi giorni dal concepimento)	Sono identificate in base ad un insieme complesso di caratteristiche, come molecole di superficie, comportamento <i>in vitro</i> e, in alcuni casi, posizione nel tessuto.
Possono duplicarsi in coltura e in modo simmetrico per un numero infinito di volte, mantenendo le caratteristiche originarie	Possono dividersi per diverse volte (fino a 200 o più, a seconda dei tipi) ma non in modo illimitato
Una singola cellula può dare origine ad una colonia di cellule geneticamente identiche con le stesse proprietà di quella d'origine.	In alcuni tessuti, le cellule precursori possono essere identificate, isolate e coltivate; questo resta ancora da dimostrare per altri tessuti.
Le cellule pluripotenti possono dare origine a tutti i tre tipi di tessuto degli embrioni (endoderma, mesoderma ed ectoderma)	Talvolta sono multipotenti: la maggior parte dà luogo al tessuto di origine, ma in altri casi può essere in grado di dar luogo a diverse tipologie cellulari di derivazione dell'endoderma, del mesoderma e dell'ectoderma (la cosiddetta plasticità)

Box I Comparazione sommaria tra cellule staminali embrionali e da adulto

La natura delle cellule staminali e il differenziamento in specifiche tipologie cellulari

- **Martin Evans**
- Cardiff School of Biosciences
- Cardiff, United Kingdom

Introduzione

Le cellule staminali sono un componente fondamentale durante lo sviluppo embrionale e fetale, il mantenimento, la rigenerazione e la riparazione dei tessuti. Le cellule staminali sono centrali anche per lo sviluppo e la crescita dell'uomo e sono anche fonti importanti di nuove cellule per la rigenerazione terapeutica in seguito a malattie o danni ai tessuti. Il corpo è costituito da un grande numero di cellule funzionalmente specializzate (tecnicamente si dice differenziate), che sono organizzate a formare specifici tessuti e organi.

Durante lo sviluppo e la vita, molti tessuti sono in grado di autoripararsi in seguito ad un danno. Questo processo che conduce alla rigenerazione e alla riparazione dipende da una popolazione di cellule di riserva che si dividono lentamente per automantenersi ma che possono proliferare per fornire i precursori commissionati per uno specifico tipo di cellula differenziata. Queste popolazioni di cellule staminali sono specializzate (commissionate) per dare luogo a cellule con uno specifico destino di differenziamento. Nonostante siano stati fatti alcuni studi che hanno dimostrato che le cellule staminali estratte da un tessuto sono in grado di ripopolare altri tessuti, questi risultati sono controversi. Nondimeno, cellule staminali specifiche di un determinato tessuto, quindi altamente specializzate, sono quello di cui si ha bisogno se si vuole effettuare una terapia a base di cellule, sempre che siano isobili in numero sufficiente.

Nei primi stadi dello sviluppo sono presenti popolazioni di cellule in grado di dividersi con potenzialità molto ampie di sviluppo (ma non tutte queste popolazioni cellulari diventano cellule staminali proliferanti, cioè in grado di dar luogo ad un numero elevato di divisioni cellulari). Se questo è abbastanza ovvio, non lo è il momento in cui, durante la progressione da una singola linea cellulare totipotente si passa a molte linee cellulari con destini più ristretti, in cui il ciclo mitotico e il destino cellulare restano intatti. Ad ogni modo, le cellule staminali embrionali sono state isolate originariamente da un embrione di

topo e solo in seguito da un piccolo numero di altre specie, tra cui l'uomo.

Le cellule staminali embrionali sono pluripotenti, cioè sono alla base dell'albero del differenziamento e mantengono la potenzialità embrionale di dare origine a molti, se non tutti, i tipi cellulari. Il vantaggio potenziale delle cellule staminali riguarda la loro capacità di essere isolate, di duplicarsi un numero elevato di volte e di essere in grado di differenziare in altri tipi cellulari del corpo. Questo permette di avere a disposizione una strategia per ottenere una popolazione di cellule precursori, che possono essere impiegate per la terapia rigenerativa di tessuti adulti danneggiati per i quali non esistono altre fonti endogene o sufficienti.

Il trapianto dei tessuti è associato al rischio di reazioni immunologiche e rigetto, a meno che le cellule donatrici non siano immunologicamente correlate o idealmente identiche a quelle del paziente. Uno scenario affascinante (a cui si devono molti degli sforzi in questo settore) riguarda la produzione di una fonte di cellule staminali embrionali, geneticamente identiche al paziente dal per il quale è necessario sviluppare dei precursori specializzati di cellule di determinati tessuti.

Questo può avvenire grazie alla "sdifferenziazione" di una cellula del paziente allo stadio di staminale embrionale. Il solo metodo attualmente noto, che funziona nel modello animale, è il trasferimento nucleare in un oocita e la derivazione dall'embrione che si sviluppa da esso di una linea cellula di cellule staminali embrionali. Questa tecnica di trasferimento nucleare può essere utilizzata per generare una linea cellulare specifica e personalizzata per ogni paziente. La possibilità di questo scenario, che coinvolge la generazione di un embrione mediante il trasferimento del nucleo di una cellula adulta in un oocita enucleato, per ottenere una linea di cellule staminali embrionali, dalla quale ottenere cellule per ripopolare i tessuti di un organismo adulto, è stato ampiamente dimostrato nel topo (2).

Il punto della situazione

La derivazione di cellule staminali da un embrione prodotto mediante fecondazione *in vitro* è stata ottenuta in modo ripetibile e sono disponibili numerose linee adatte per la ricerca.

La derivazione di cellule staminali embrionali mediante trasferimento nucleare, invece, resta ancora da dimostrare. I risultati presenti nel report di Hwang e del suo team coreano è stato dimostrato essere falsificati (3). Non esistono altre evidenze sostanziali della derivazione di cellule staminali embrionali da un embrione clonato. La generazione di un embrione ai primi stadi di divisione mediante trasferimento nucleare è stata effettuata da altri gruppi di ricerca, ma non pubblicata su riviste scientifiche principali (4,5). La differenziazione di cellule staminali embrionali in precursori definiti o in popolazioni differenziate (cellule nervose, delle isole del pancreas,...) deve essere ancora dimostrata, come anche la dimostrazione di specifiche differenziazioni delle cellule staminali embrionali. Mentre esistono terapie cellulari che utilizzano cellule staminali da adulti, ma non da embrioni, in fase di trial clinico o consolidate.

Prospettive

L'avvento delle cellule embrionali staminali umane e l'idea di un potenziale utilizzo futuro per la terapia rappresentano una delle più grandi rivoluzioni in medicina, che potrebbe interessare campi di grande importanza, tra cui i problemi della Terza Età. L'Europa potrebbe rivestire una posizione di leadership per quanto riguarda l'applicazione etica della scienza in merito a cure centrate sul paziente e sulle evidenze sperimentali. Siamo al cospetto di un importante cambiamento in medicina, che deriva dal grande accumulo di informazioni e conoscenze sulla biologia e sulla genetica. L'assicurazione è la condivisione dei rischi non noti. L'aumento della pratica della medicina predittiva mal si associa con l'assicurazione medica. Inoltre, il cambiamento ad una specificità centrata sul paziente (chiamata selezione cellulare o genetica) delle terapie potrebbero cambiare il modello farmacologico di produzione delle medicine.

Per queste ragioni, l'Europa dovrebbe mantenersi all'avanguardia nella ricerca e applicazione delle cellule staminali. A tal fine, abbiamo bisogno di una regolamentazione che faciliti gli avanzamenti e previene gli abusi, e in cui il cittadino nutra fiducia. In assenza di un quadro etico e legale, con considerazioni separate sull'intervento sulla riproduzione in laboratorio e la biologia cellulare terapeutica. Le cellule staminali embrionali dovrebbero essere considerate come un tipo di cellula, non come un embrione.

E' noto che il nucleo di una cellula adulta può essere riprogrammato – ovvero, il differenziamento può essere revertito, ma abbiamo a disposizione un solo metodo al

momento: il trasferimento del nucleo in un oocita. I nuclei possono anche essere sdifferenziati usando la fusione cellulare. Stiamo comprendendo la maggior parte dei fattori che determinano la stabilità e lo stato differenziato, e sappiamo che sono entrambi reversibili.

I metodi per differenziare direttamente i nuclei delle cellule somatiche sono ancora in via di sviluppo. Ad ogni modo, dal momento che i prodotti terapeutici sono popolazioni di cellule precursori commissionati, abbiamo bisogno di maggiori conoscenze in merito all'induzione e validazione del differenziamento cellulare. E' importante investire pesantemente nelle cellule e nella biologia dello sviluppo utilizzando sia organismi modello (principalmente il topo) che cellule umane in coltura.

- La ricerca sulle cellule staminali embrionali, da adulti e sui precursori cellulari contiene Prospettive rivoluzionarie per il trattamento delle malattie, specialmente nella popolazione anziana, e per lo sviluppo della medicina personalizzata.
- La regolamentazione e il quadro etico/legale deve essere realizzato in modo che sia permesso all'Europa di trarre beneficio delle potenzialità delle applicazioni delle cellule staminali.
- Lo studio dello sviluppo embrionale in modelli animali e in cellule umane, potrebbe essere importante per chiarire il processo di riprogrammazione del nucleo cellulare durante il trasferimento nucleare, il differenziamento e lo sdifferenziamento.

Problemi, riflessioni e questioni aperte

Il fiasco del team di Hwang ha portato alla luce sia i problemi pratici che etici dell'approccio basato sul trasferimento nucleare. Il principale ostacolo potrebbe essere etico per il reperimento di un numero sufficiente di oociti. La derivazione di un embrione per trasferimento nucleare deve essere perfezionata, per diventare efficiente, ed è necessaria molta ricerca ulteriore prima che questo possa essere fatto.

Al fine di produrre una terapia cellulare, la fonte deve essere istocompatibile con il paziente. L'approccio personalizzato può essere ottenuto mediante clonazione o altro metodo di sdifferenziamento, ma attualmente esistono altre vie più praticabili.

Se fosse possibile istituire una grande banca di cellule staminali embrionali geneticamente diversi, sarebbe possibile trovare, probabilmente, per molti pazienti il corretto match. Un altro approccio potrebbe essere avere una banca di cellule più piccola, pre-

caratterizzata in modo da avere un assortimento tale da essere tollerata per il trapianto da molti pazienti. Il calcolo del numero di linee cellulari necessarie per un'associazione accettabile per il paziente è sorprendentemente piccolo (6). Questa banca, progettata con cura, potrebbe essere prodotta a partire da embrioni ottenuti mediante fecondazione in vitro di soggetti selezionati. Questo, da solo, presenta dei grossi problemi etici, persino maggiori dell'utilizzo del trasferimento nucleare. Al fine di rendere possibile l'applicazione terapeutica, devono essere stabilite delle linee cellulari, validate e mantenute in accordo alla regole di Buona Pratica di Produzione.

- Nel caso in cui il trasferimento nucleare diventasse una pratica affrontabile, si presenterebbero problemi etici nel reperimento degli oociti necessari
- La creazione di banche composte da cellule con genotipo allogenico (non self) selezionato potrebbe presentare problemi etici equivalenti, se non maggiori, a quelli del trasferimento nucleare
- Dovrebbero essere stabilite e validate Buone Pratiche di Produzione.

1: Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004 Mar 5;116(5):639-48.

2: Hochedlinger, K., W. M. Rideout, et al. (2004). "Nuclear transplantation, embryonic stem cells and the potential for cell therapy." *Hematol J* 5 Suppl 3: S114-7.

3: Dennis Normile, Gretchen Vogel, and Jennifer Couzin CLONING: South Korean Team's Remaining Human Stem Cell Claim Demolished *Science* 13 January 2006: Vol. 311, pp. 156 - 157

4: Cibelli JB, Lanza RP, West MD, Ezzell C. The first human cloned embryo. *Sci Am*. 2002 Jan;286(1):44-51.

5: Stojkovic, M., P. Stojkovic, et al. (2005). "Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes." *Reprod Biomed Online* 11(2): 226-31.

Cellule staminali: potere e potenzialità

- **Austin Smith**
- Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research & Institute for Stem Cell Biology
- University of Cambridge, United Kingdom

Introduzione

Le cellule staminali embrionali sono un'entità unica nel loro genere, in grado di autoriprodursi senza limiti e di dare origine a tutti i tipi cellulari che compongono un organismo. La proprietà di dare origine a tutte le tipologie cellulari è definita pluripotenza. Questa caratteristica è normalmente limitata alle cellule che compongono l'embrione nei primi giorni di sviluppo, prima della formazione del piano di divisione. Le cellule staminali embrionali, ad ogni modo, conservano la loro pluripotenza persino dopo essere state massivamente espanse in laboratorio. Quindi, possono, in linea teorica, fornire continuamente cellule specializzate per la ricerca di base, lo studio in laboratorio delle malattie, il test dei farmaci e, probabilmente, in futuro, per la terapia cellulare sostitutiva.

Il punto della situazione

La nostra capacità di produrre le cellule staminali si basa sulle ricerche effettuate per studiare le proprietà di tumori, i teratocarcinomi, che contengono numerosi tessuti specializzati, quali capelli, denti e tessuti intestinali (1). I teratocarcinomi contengono anche cellule non specializzate. Negli anni Settanta del Novecento, è stato scoperto che sono dovuti a cellule staminali cancerose. Ognuna di esse è in grado di dare origine a tutte le cellule specializzate che si trovano nei tumori. Pertanto, sono pluripotenti. Inoltre, possono essere coltivate in laboratorio. Nel contempo, è stato scoperto che impiantando embrioni precoci di topi, prelevati dall'utero, in altri tessuti, si sviluppano dei teratocarcinomi.

Queste osservazioni accentuano l'interesse per la produzione di cellule staminali pluripotenti direttamente dall'embrione.

Questo è stato fatto per la prima volta nei topi nel 1981 e quindi nei primati, uomo compreso, negli anni Novanta del Novecento.

Le cellule staminali sono derivate da embrioni precoci chiamati blastocisti. Le blastocisti sono lo stadio che precede l'impianto nell'utero per la formazione di tessuti specializzati. Possono contenere fino ad oltre 100 cellule non specializzate, pluripotenti, le fondatrici dell'intero organismo qualora l'embrione si impianta

nell'utero e si sviluppa. Le cellule pluripotenti nell'embrione non sono in grado di automantenersi dopo l'impianto, ma si trasformano in cellule specializzate, con un processo definito differenziamento. Nel laboratorio, comunque, è possibile indurre uno stato definito di automantenimento, in cui le cellule si moltiplicano senza differenziarsi. La capacità delle cellule staminali di automantenersi dipende da segnali specifici indotti da molecole chiamate fattori di trascrizione. L'automantenimento delle cellule staminali può essere indotto artificialmente in laboratorio, e se le cellule staminali embrionali del topo sono reinserite in una blastociste, smettono di automantenersi e rientrano nel normale percorso di sviluppo, differenziandosi in tutti i tipi cellulari che caratterizzano i tessuti dei feti. Gli animali che si sviluppano da queste blastocisti presentano in molti tessuti, sparsi per l'organismo, cellule derivate dalle cellule staminali embrionali introdotte artificialmente. Questi animali sono definiti chimere. Comunque, nonostante le cellule staminali embrionali possono contribuire allo sviluppo di tessuti e organi del topo, lo possono fare solo con il supporto delle altre cellule che compongono la blastociste in cui sono inserite. Pertanto, non sono totipotenti.

Le cellule staminali embrionali umane sono prodotte con un metodo simile a quelle murine, utilizzando blastocisti soprannumerarie derivate dalla fecondazione *in vitro*, o da blastocisti difettive individuate con l'analisi genetica preimpianto. In seguito al consenso informato, questi embrioni possono essere donati alla ricerca nelle nazioni in cui è permessa la derivazione delle cellule staminali embrionali. Le cellule staminali embrionali clonali possono differenziare in un ampio spettro di tipi cellulari, pertanto sono pluripotenti. E' interessante notare che le cellule staminali embrionali di topo e di uomo richiedono diverse condizioni per mantenere la capacità di automantenersi *in vitro*. Inoltre, per ragioni etiche, non è ancora noto se le cellule staminali embrionali possano contribuire alla formazione di chimere. E' un caso un po'infelice, quindi, che a cellule provenienti da due specie diverse è stato dato lo stesso nome prima che sia stata dimostrata un'identità comune (2).

- Le cellule staminali embrionali sono pluripotenti, cioè in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari che si trovano nel corpo.
- Le cellule staminali embrionali sono prodotte in laboratorio grazie a tecniche speciali di trattamento delle cellule prelevate dalle blastocisti.
- La produzione di cellule staminali embrionali umane comprende l'utilizzo di blastocisti scartate durante la terapia dell'infertilità o in seguito a diagnosi mediante screening genetico per anomalie genetiche responsabili di malattie letali.

Prospettive

Il differenziamento comporta un cambiamento stabile nell'attività dei geni, per dare origine a cellule con caratteristiche specifiche, come la contrattilità per quelle cardiache o l'attività elettrica per quelle nervose. Le cellule pluripotenti si possono differenziare seguendo diverse vie. Una delle questioni aperte per i ricercatori che studiano le cellule staminali è, infatti, capire come si possa controllare il differenziamento.

In seguito alle scoperte effettuate nella ricerca di base sulla biologia dello sviluppo, e armati con le informazioni e le tecnologie frutto della post-genomica, i ricercatori stanno acquisendo una crescente conoscenza sui meccanismi che determinano l'automantenimento e che dirigono il differenziamento nelle cellule staminali embrionali del topo (3).

Sono stati messi a punto protocolli e tecniche di selezione in grado di produrre popolazioni relativamente pure di particolari tipi cellulari. E' importante notare che queste cellule derivate non presentano il rischio potenziale delle cellule staminali indifferenziate di formare tumori.

Un problema attuale da affrontare è la comprensione delle differenze tra la biologia dello sviluppo di base nel topo e nell'uomo durante le prime fasi embrionali, ma è comunque ragionevole pensare che la produzione controllata e scalabile di popolazioni di cellule differenziate da cellule staminali embrionali si svilupperà in pochi anni. In questo modo, saranno a disposizione dei ricercatori e delle aziende biofarmaceutiche una nuova risorsa per la scoperta e lo sviluppo di farmaci. Il differenziamento diretto in tipi cellulari di rilevanza clinica, come i neuroni dopaminergici e le cellule beta pancreatiche, dovrebbe portare alla formazione di una piattaforma per una rigorosa valutazione preclinica delle terapie di sostituzione cellulare.

Un'ulteriore opportunità è fornita dalle cellule staminali embrionali per la produzione e caratterizzazione di cellule staminali embrionali, che possono essere veramente rare *in vivo*.

Questo può condurre a metodi per isolare queste cellule staminali direttamente dai tessuti adulti o, persino, per sviluppare farmaci che possono attivare le cellule staminali residenti nei tessuti in modo che riparino i danni.

Le cellule staminali sono critiche per lo sviluppo dei settori sopraccitati, perché ci sono pochissime evidenze dell'esistenza di cellule pluripotenti nell'organismo adulto. Ad ogni modo, l'utilizzo delle cellule staminali per i trapianti potrebbero indurre il rigetto da parte del sistema immunitario dei pazienti. Questo può essere superato utilizzando farmaci immunosoppressivi, che sono però costosi e presentano diversi effetti collaterali. Un obiettivo ambizioso per i ricercatori, pertanto, potrebbe essere trovare i metodi per convertire le cellule adulte in pluripotenti. E' noto che questo può essere ottenuto mediante il trasferimento nucleare negli oociti o per fusione con le cellule staminali. Inoltre, durante lo sviluppo del topo, le cellule germinali possono essere convertite, in particolari condizioni, in cellule staminali pluripotenti simili a quelle embrionali (4). La prossima sfida è identificare le proteine che mediano questa riprogrammazione e trasformare direttamente le cellule dei tessuti adulti.

- La capacità dei ricercatori di controllare l'espansione e il differenziamento delle cellule staminali embrionali per produrre nuove biorisorse sta aumentando.
- Le biorisorse di cellule staminali embrionali porteranno ad un aumento della nostra conoscenza delle cellule staminali di un tessuto e permetteranno importanti progressi nello studio dello sviluppo e delle malattie, nell'identificazione di nuovi farmaci e nel trapianto di cellule.
- La sperimentazione per permettere la creazione di cellule staminali pluripotenti direttamente da cellule prese da un organismo sarà un interessante sfida per i ricercatori.

Problemi, riflessioni, questioni aperte

La ricerca sulle cellule staminali embrionali è ancora nell'infanzia, e le sfide scientifiche per imbrigliare queste cellule non dovrebbero essere sottovalutate. Una scala di tempo realistica per lo sviluppo di nuove terapie dovrebbe essere misurata in decenni, piuttosto che in anni. Per esempio, le cellule staminali umani sono geneticamente eterogenee, ed è ancora da scoprire se possono essere trattate in modo standard come quelle, geneticamente uniformi, dei topi. La stabilità genetica delle cellule staminali durante l'espansione a lungo termine è incerta e richiederà un monitoraggio esteso prima di permettere la produzione su ampia scala di

fenotipi funzionalmente maturi, adatti per lo screening biofarmaceutico. Le complesse richieste dovute alla regolamentazione sull'uso delle terapie cellulari potrebbero impedire la traslazione clinica e aumentare enormemente i costi. Sono necessari nuovi meccanismi per sovvenzionare trial clinici multicentrici, in assenza di partner industriali. Questo problema potrebbe essere superato combinando l'inventiva scientifica con investimenti e coordinazione delle attività a livello europeo.

Comunque, il clima politico disomogeneo è attualmente una delle barriere più importanti all'avanzamento della ricerca sulle cellule staminali in Europa. Inoltre, la legislazione, in alcune nazioni, non permette ai ricercatori di studiare le cellule linee di cellule staminali embrionali ottenute dopo una data stabilita arbitrariamente. Esistono dei procedimenti penali per gli scienziati di determinate nazioni che collaborano con altri ricercatori europei sulle cellule staminali embrionali. La ricerca di base sulle cellule staminali in Europa è, pertanto, danneggiata da questa frammentazione e dal fatto che i singoli ricercatori sono sotto la minaccia di azioni legali.

Un secondo ostacolo si frappone nello sviluppo delle biotecnologie nel settore delle cellule staminali in Europa. L'Ufficio Europeo Brevetti (UPO) ha attualmente sospeso tutte le applicazioni brevettuali che coinvolgono cellule staminali umane embrionali. L'EPO ha adottato una rigida interpretazione della clausola morale nella Direttiva Europea sulle Biotecnologie, che afferma che "l'uso di embrioni umani per scopi industriali e di ricerca" non può essere brevettato (5).

A parte il fatto che le cellule staminali non sono embrioni, l'EPO ignora le opinioni del Gruppo Europeo sull'Etica, secondo il quale i brevetti dovrebbero essere permessi su cellule staminali umane modificate e sui processi che coinvolgono le cellule staminali umane, qualsiasi sia la fonte.

Nonostante alcune nazioni europee hanno deciso di seguire una linea diversa, permettendo la brevettabilità delle cellule staminali, la posizione dell'EPO mette tutta l'Europa in una posizione di svantaggio rispetto al Nord America e all'Asia, dove i brevetti sulle cellule staminali e sulle loro applicazioni sono concessi routinariamente.

- Sono necessari programmi transdisciplinari coordinati per risolvere le grandi sfide scientifiche, cliniche e tecniche che permettano di spostare le cellule staminali dal bancone al paziente, in modo sicuro, efficace e praticabile.
- Sono necessari nuovi finanziamenti per supportare i trial clinici sulla terapia cellulare di sostituzione.

- La legislazione restrittiva a livello nazionale e il fallimento della procedura di brevettabilità minano la morale e la competitività della ricerca europea, restituendo un futuro non geograficamente omogeneo dal punto di vista economico e dei benefici per la salute che possono derivare dalla ricerca sulle cellule staminali.

Conclusioni

Le cellule staminali costituiscono un'opportunità senza pari per l'applicazione delle tecnologie derivanti dalla postgenomica, volte a comprendere lo sviluppo cellulare, il differenziamento funzionale e le malattie. Oltre a questo, si può prospettare l'emergenza di altri benefici medici sotto forma di biomarcatori, implementazione dei farmaci e terapie cellulari di sostituzione. Le cellule staminali sono anche una chiave per comprendere la pluripotenza, che potrebbe permettere agli scienziati di convertire un tipo di cellula specializzata in un altro tipo, per il trattamento di malattie o di danni a tessuti nello stesso paziente da cui sono ricavate le cellule terapeutiche. Per una piena partecipazione dell'Europa, e per ottenerne i benefici, la ricerca sulle cellule staminali richiede una cooperazione transnazionale sia per quanto riguarda la ricerca stessa che per la legislazione.

1. Solter, D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell. (2006) research. *Nat Rev Genet* 7, 319-27.
2. Smith, A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Ann. (2001) Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 435-462.
3. Keller, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 19, 1129-55 (2005).
4. Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Toyoshima, M., Niwa, O., Oshimura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A & Shinohara, T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119, 1001-12 (2004).
5. Porter, G., Denning, C., Plomer, A., Sinden, J. & Torremans, P. The patentability of human embryonic stem cells in Europe. *Nature Biotechnology* In press (2006).

Il trasferimento somatico nucleare: Prospettive per la ricerca sulle malattie e per la terapia

- **Ian Wilmut**
- Centre for Regenerative Medicine, The Queen's Medical Research Institute,
- University of Edimburgh, United Kingdom.

Introduzione

Nuove opportunità per la medicina e la biologia provengono dalla capacità di derivare cellule staminali embrionali da embrioni artificiali, creati *in vitro* usando una tecnica chiamata trasferimento nucleare di cellule somatiche, e dalla possibilità di controllare il differenziamento in tutti i tipi cellulari dell'organismo adulto. Il trasferimento nucleare prevede la rimozione delle informazioni genetiche presenti in un uovo non fertilizzato e la sostituzione con il materiale genetico proveniente da una cellula presa dal corpo (o soma, da cui il termine cellule somatiche), per esempio, di un paziente. Nel caso di persone che soffrono di malattie ereditarie, l'embrione risultante avrebbe le stesse caratteristiche genetiche del paziente, così come anche le cellule staminali derivate dall'embrione risultante. Le cellule staminali potrebbero essere fatte differenziare nelle stesse tipologie delle cellule affette dalla malattia, in modo che mostrino tutte le caratteristiche tipiche delle cellule malate del paziente.

Una volta che il metodo sarà sviluppato, diventerà possibile studiare le malattie genetiche umane in un modo completamente nuovo. Questo approccio ha la potenzialità di fornire nuove opportunità – non disponibili con altri sistemi – per studiare le malattie ereditarie in cui la causa genetica non è stata identificata. Un esempio è la famiglia di malattie note con il nome di malattia dei motoneuroni (MND), quali la sclerosi laterale amiotrofica (ALS) e la Sindrome di Lou Gehrig, che sarà utilizzata come esempio nei prossimi paragrafi.

Il punto della situazione

L'approccio utilizzato per studiare le malattie ereditarie umane mediante l'espansione *in vitro* di cellule staminali clonate si sviluppa secondo due passaggi: 1. il trasferimento nucleare di cellule somatiche per produrre una singola cellula simile ad un uovo umano fertilizzato, cioè un embrione con le caratteristiche ereditate dal paziente che

soffre della malattia in studio; 2. derivazione delle cellule staminali da questa cellula; 3. ottenimento di una linea cellulare del tipo cellulare specifico che risente della patologia. Mentre il secondo e terzo passaggio sono stati raggiunti utilizzando embrioni derivati dalla fecondazione *in vitro*, non ci sono attualmente risultati di derivazione di cellule staminali embrionali da embrioni umani prodotti mediante trasferimento nucleare (passaggio numero 2).

Il fallimento nella derivazione di linee di cellule staminali mediante trasferimento nucleare probabilmente dipende da limitazioni attuali della tecnica stessa. Le cellule staminali embrionali sono ottenute da embrioni al sesto giorno di sviluppo, quando sono allo stadio di blastocisti (una palla di cellule da cui si modella in seguito la forma riconoscibile dell'embrione). La produzione di blastocisti umane mediante trasferimento nucleare è stata descritta in due laboratori. In questo momento, non è possibile capire la causa del fallimento nell'isolare le cellule staminali da questi embrioni, ma gli esperimenti per produrre animali mediante il trasferimento nucleare ha dimostrato che gli embrioni prodotti hanno potenzialità di sviluppo ridotte. Potrebbe darsi che siano necessarie, per i primati, tra cui l'uomo, modifiche nella procedura della tecnica di trasferimento nucleare.

- Le linee di cellule staminali embrionali possono essere ottenute da embrioni derivati dalla fecondazione *in vitro* e possono essere fatte differenziare in diversi tipi cellulari nell'adulto.
- E' stato dimostrato che gli embrioni derivati dal trasferimento nucleare sono in grado (in pochi casi) di svilupparsi in blastocisti.
- Non sono ancora stati stabiliti dei metodi per la produzione di cellule staminali da parte di embrioni ottenuti mediante trasferimento nucleare.

Prospettive

La capacità di produrre cellule staminali da embrioni prodotti con il trasferimento nucleare offre nuove opportunità per studiare malattie ereditarie, come la ALS, una malattia progressiva degenerativa del muscolo che causa ogni anno circa 130000 morti in tutto il mondo. La degenerazione dei motoneuroni è la causa più comune di questa patologia, ma le cause non

sono note. In una piccola proporzione di casi, la malattia si verifica ripetutamente all'interno di una famiglia, ma sembra possibile che gravi malattie genetiche e fattori ambientali contribuiscono alla patogenesi dell'ALS. Esperimenti nei topi suggeriscono che gli effetti tossici di una proteina anomala possono causare danno sia ai motoneuroni che alle cellule vicine, ma la comprensione del meccanismo dettagliato è ancora lontana. Per capire come le proteine anomale causano la malattia, potrebbe essere molto utile studiare in laboratorio le cellule nervose prelevate da pazienti con ALS. Sfortunatamente, non è possibile con le cellule prese direttamente da pazienti viventi, poiché i motoneuroni si trovano all'interno del sistema nervoso centrale. Inoltre, una volta prelevate, è improbabile che si riesca a mantenerle in coltura e ad espanderle in un numero sufficiente per lo studio. Infine, anche il prelievo nel momento della morte del paziente non è adeguato, ci potrebbero essere molti cambiamenti secondari dovuti alla malattia o all'invecchiamento naturale.

Linee di cellule staminali utilizzabili potrebbero essere ottenute da embrioni mediante trasferimento nucleare, in modo che possiedano il difetto genetico ereditario. Questa metodologia renderebbe possibile, per la prima volta, lo studio dello sviluppo della ALS in neuroni equivalenti a quelle del paziente. Si potrebbero fare confronti con neuroni da embrioni sani.

Proseguendo lo studio sulle proteine prodotte nelle cellule malate, potrebbe essere possibile sviluppare un metodo rapido di screening per potenziali farmaci, in modo da identificare composti in grado di stabilizzare la condizione dei pazienti e prevenire la progressione della malattia.

Per prima cosa è necessario capire la causa della malattia e identificare il cambiamento che potrebbe essere utilizzato come parametro di analisi per testare i composti. Utilizzando un sistema di screening ad alta resa, potrebbe essere possibile testare centinaia di farmaci in modo comparabile ed economico. Al contrario, oggi i farmaci sono testati sugli animali. Con lo stesso costo è possibile testare una manciata di farmaci in un intero anno, confronto alle centinaia in un sistema di screening ad alta resa basato sulle cellule staminali.

Lo stesso approccio potrebbe essere utilizzato per studiare le malattie ereditarie. Il vantaggio è maggiore se l'anomalia genetica che causa la malattia non è nota. Ovviamente, è essenziale che il tipo cellulare affetto dalla malattia possa essere prodotto in laboratorio a partire dalle cellule staminali. Altri possibili candidati per questo tipo di studi sono le malattie neurodegenerative, le malattie psichiatriche, le

anomalie cardiache che causano morte improvvisa (cardiomiopatie) e alcune forme di cancro.

Le cellule staminali ottenute mediante trasferimento nucleare potrebbero essere utili anche per altri scopi oltre che per la ricerca e la terapia di malattie note: per esempio, lo screening di farmaci per l'efficacia e l'identificazione di effetti collaterali su diversi tessuti dell'organismo potrebbe essere notevolmente implementato dalla disponibilità di cellule geneticamente identiche. Nell'era della medicina personalizzata, le cellule con diversi genotipi, a seconda dei pazienti, potrebbero essere prodotte in massa e utilizzate per test più realistici dell'azione di un farmaco in relazione alle diverse tipologie di pazienti in una società.

- Le cellule differenziate ottenute da cellule staminali derivate da embrioni prodotti con trasferimento nucleare potrebbero introdurre nuove opportunità per studiare le malattie ereditarie umane e per scoprire farmaci adatti al loro trattamento.
- Le cellule che hanno le caratteristiche di quelle dei pazienti con malattie ereditarie potrebbero aprire la porta ad un modo nuovo di studiare le malattie ereditarie e allo sviluppo di farmaci. Esempi sono ALS, Morbo di Parkinson e alcune forme di cancro.
- Il trasferimento nucleare potrebbe teoricamente produrre un grande numero di cellule identiche di diversi tessuti per test efficaci e sicuri di farmaci, in diverse tipologie cellulari rappresentative della popolazione di pazienti, contribuendo significativamente allo sviluppo di una medicina personalizzata.

Problemi, riflessioni e questioni aperte

Le opportunità offerte dal trasferimento nucleare potrebbero complementare quelle derivanti da altri approcci. In una piccola proporzione di casi, l'errore genetico che causa una malattia è stato già identificato. Se l'errore è stato identificato, potrebbe essere interessante introdurlo artificialmente in linee di cellule staminali esistenti, usando metodi standard della biologia molecolare per creare cellule con caratteristiche simili a quelle di cellule patologiche.

Queste cellule modificate potrebbero essere confrontate con quelle della linea originale, con le quali sono identiche ad eccezione del preciso cambiamento associato alla malattia che è stato introdotto. Questo metodo è semplice e diretto, ma possibile solo per una piccola porzione di casi in cui la mutazione genetica è stata identificata. Nel caso dell'ALS, questo riguarda il 2% dei pazienti. In questa situazione, un confronto diretto e preciso potrebbe essere fatto tra cellule

neuronali delle linee delle cellule staminali con o senza il difetto genetico.

Nel caso in cui il difetto genetico è stato identificato, si potrebbero effettuare dei test molecolari per identificare gli embrioni che hanno ereditato la malattia dal genitore affetto (noi ereditiamo una copia di ciascun gene da entrambi i genitori). Normalmente, solo una delle due copie del gene è mutata nell'ALS ereditaria. Quindi, solo metà degli embrioni prodotti da un paziente si suppone abbiano ereditato la malattia. In questi casi, le cellule possono essere prese da ciascun embrione e le tecniche molecolari possono essere utilizzate per scoprire se l'embrione ha ereditato o meno la copia mutata del gene, grazie ad una procedura chiamata diagnosi genetica preimpianto. Indirettamente, questo test identifica gli embrioni che hanno ereditato la malattia e che andrebbero distrutti se non fossero utilizzati per la ricerca. Questo approccio può essere utilizzato per ottenere cellule modelli di qualsiasi malattia per cui è nota la mutazione relativa.

Il trasferimento nucleare può risultare utile quando la causa della malattia non è nota. Comunque, i metodi attualmente disponibili per la clonazione non sono efficienti, nonostante siano ripetibili e utilizzati in diversi laboratori nel mondo. Questa bassa efficienza è il riflesso delle attuali procedure per modificare la funzione dell'informazione genetica presente nelle cellule adulte in quella adeguata per lo sviluppo embrionale. Non è noto se queste modificazioni nella funzione genica si verificano anche nelle cellule staminali derivate con trasferimento nucleare.

Nello sviluppo e nella verifica del trasferimento nucleare per questi scopi di ricerca, è essenziale indagare se eventuali anomalie indotte dal trasferimento genico influiscano o meno su quelle dovute alla malattia. Questi test dovrebbero essere effettuati su cellule staminali ottenute mediante trasferimento nucleare già disponibili, prima di passare a produrre nuove linee cellulari. Potrebbe essere possibile confrontare il manifestarsi di errori genetici tra cellule staminali convenzionali e quelle prodotte mediante trasferimento nucleare.

- Il tasso di successo del trasferimento nucleare nel produrre embrioni umani è, sostanzialmente, molto basso al momento. E' necessario un maggior approfondimento per capire come il nucleo trasferito si azzeri prima di tornare allo stato embrionale.
- E' necessaria più ricerca per stabilire metodi di produzione di cellule staminali embrionali da embrioni ottenuti mediante trasferimento nucleare (o per ottimizzare il processo di

trasferimento nucleare, se il gran numero di fallimenti risultasse dovuto a questa fase)

- Se le cellule staminali dovessero essere prodotte in modo ripetibile con il trasferimento nucleare, dovrebbero essere effettuati appropriati confronti con le cellule staminali derivate in modo convenzionale, per escludere effetti collaterali dovuti esclusivamente alla procedura di trasferimento nucleare.

Conclusioni

Le possibilità che emergono prefigurano come interessante la possibile creazione di linee di cellule staminali da embrioni ottenuti mediante trasferimento nucleare. I benefici non comprendono solo l'implementazione della ricerca e del trattamento di malattie gravi ereditarie degenerative, ma si tratta di un metodo applicabile per lo studio farmacologico generale a livello industriale, aprendo la prospettiva ad un miglioramento delle condizioni di vita per milioni di persone. Le cellule derivate in certi casi possono facilitare la riduzione del numero di animali utilizzati per cercare informazioni o testare dei farmaci per una malattia. La coltura di cellule staminali derivate da embrioni ottenuti mediante fecondazione *in vitro*, e la stabilizzazione di linee cellulari sono già state realizzate e non ci sono praticamente più problemi tecnici. E' stato dimostrato che è possibile ottenere diversi tessuti a partire da cellule staminali embrionali differenziate in modo artificiale in laboratorio (con, per esempio, appropriati fattori di crescita). Il passaggio dal trasferimento nucleare all'ottenimento di cellule di un tessuto adulto, nella sua fase più critica prevede la derivazione di cellule staminali embrionali da embrioni derivati dal trasferimento nucleare.

La ricerca per superare questo ostacolo è di cruciale importanza per raggiungere il considerevole potenziale illustrato in precedenza.

Background/further reading

- 1: Gurdon JB, Colman A. The future of cloning. *Nature*. 1999 Dec 16;402(6763):743-6.
2. McLaren A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):129-31.
3. Brambrink T, Hochedlinger K, Bell G, Jaenisch R. ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jan 24;103(4):933-8. Epub 2006 Jan 17.

Cellule staminali somatiche del sangue: le cellule staminali emopoietiche

- **Elaine Dzierzak**
- Erasmus University Medical Center,
- Department of Cell Biology
- Rotterdam, The Netherlands

Introduzione

Le cellule staminali da cui ha origine il sangue, le cellule staminali emopoietiche, sono le più ampiamente studiate e applicate nella pratica clinica, secondo un processo che comprende il differenziamento e il trapianto. Le ricerche in questo settore è in corso da diverse decadi e ha contribuito al miglioramento delle terapie di sostituzione del sangue in caso di malattie genetiche o tumorali. Le sfide attuali in questo settore comprendono: 1) l'espansione *ex vivo* delle cellule staminali emopoietiche utilizzate per il trapianto autologo (*self*, o con cellule derivate dallo stesso paziente) e allogenico (*non self*, o con cellule derivate da donatore); 2) la conoscenza del programma molecolare delle cellule staminali per poter manipolare in modo efficace cellule staminali normali e leucemiche; 3) la stimolazione della produzione di staminali emopoietiche dalle cellule staminali embrionali o altri precursori.

Il punto della situazione

Le cellule staminali emopoietiche producono quotidianamente un numero enorme di cellule del sangue, come globuli rossi, macrofagi, linfociti e piastrine, attraverso un processo di differenziamento di tipo gerarchico. Le cellule staminali emopoietiche sono identificate in modo stringente in base alla loro capacità di generare tutte le linee cellulari del sangue per un lungo periodo di tempo dopo il trapianto in un paziente privo del sistema ematopoietico. Il trapianto di queste cellule è stato applicato nell'uomo per la prima volta per terapie di sostituzione cellulare (1). Centinaia di migliaia di pazienti sono stati trapiantati con successo con cellule staminali emopoietiche derivate da donatori di midollo osseo (il tessuto adulto in cui risiedono). Più recente, le cellule del cordone ombelicale sono state utilizzate con successo per la terapia di sostituzione del sangue (1). La reazione di rigetto al trapianto è molto meno frequente nei pazienti in cui sono trapiantate le cellule che derivano dal

cordone ombelicale, cellule che sono facilmente accessibili.

Ad ogni modo, il numero di cellule emopoietiche che possono essere ottenute da questi tessuti è molto limitato. Pertanto, dato che si tratta del sistema di differenziamento cellulare meglio caratterizzato e con rilevanza clinica, le staminali emopoietiche sono state oggetto di intensi studi nella ricerca di base.

Studi della citologia, della biologia molecolare e dello sviluppo hanno aumentato le nostre conoscenze nella comprensione del processo che porta alla formazione, mantenimento, espansione e differenziamento delle cellule staminali emopoietiche (2,3). Per esempio, il differenziamento delle cellule staminali emopoietiche in eritrociti (globuli rossi), granulociti, macrofagi e linfociti (globuli bianchi) è il risultato della stimolazione con i fattori di crescita. Questi fattori di crescita sono stati identificati e sono utilizzati routinariamente in clinica per stimolare l'emopoiesi (la produzione delle cellule del sangue) e per mobilitare le cellule staminali emopoietiche nel circolo sanguigno. Comunque, conosciamo molto poco dei fattori che permettono l'automantenimento. L'automantenimento è il processo attraverso cui le cellule staminali emopoietiche si dividono per produrre due cellule figlie, di cui una si differenzia, per esempio in globulo bianco, mentre l'altra mantiene le potenzialità di cellula staminale. Al momento, non sono noti fattori di crescita, o combinazioni di questi, in grado di promuovere l'espansione delle cellule staminali emopoietiche (cioè, la produzione di due cellule staminali durante la divisione, invece che una staminale e una differenziata).

Dal momento che le cellule staminali emopoietiche risiedono normalmente in particolari sedi all'interno dell'organismo, lo studio delle cellule non emopoietiche che si trovano in queste zone è di grande interesse. Queste sono derivate dalle cellule staminali mesenchimali, che danno luogo agli osteociti (tessuto osseo), agli adipociti (grasso), ai condrociti (cartilagine), al muscolo liscio e alle cellule della vascolatura (vasi sanguigni). Queste cellule dello stroma permettono di fornire i segnali necessari per il mantenimento delle cellule staminali emopoietiche per tutta la lunghezza della vita. Si pensa che ci sia un numero definito di queste nicchie ambientali e che il numero di cellule

staminali emopoietiche sia controllato dal numero di queste nicchie e dai fattori prodotti al loro interno. Le cellule stromali del midollo osseo sono state coltivate *ex vivo* in laboratorio per studiare l'interazione molecolare tra le cellule staminali emopoietiche e l'ambiente circostante. La conoscenza della programmazione molecolare delle cellule staminali emopoietiche, come anche delle cellule stromali all'interno delle nicchie, è di grande importanza per il miglioramento delle terapie del sangue.

Lo sviluppo dell'ambiente e dei fattori adeguati è attualmente un punto caldo della ricerca del settore ematopoietico (2,3). Si pensa che le cellule staminali emopoietiche si generino solo durante lo sviluppo embrionale e che non siano più prodotte nell'adulto. Il trapianto di cellule a scopo di ricerca in modelli animali ha permesso di identificare la fonte da cui si originano le cellule staminali emopoietiche: i vasi sanguigni in via di sviluppo, come l'aorta dorsale e l'arteria ombelicale. Molti altri tessuti, tra cui il sacco vitellino e la placenta, potrebbero contribuire alla formazione delle cellule staminali emopoietiche presenti nell'adulto. La formazione delle cellule staminali emopoietiche nell'embrione umano sembra essere molto simile a quella del topo (3). Durante le prime quattro settimane dal concepimento, le cellule staminali emopoietiche si trovano nell'aorta dorsale e più tardi nel sacco vitellino. Sembrano essere potenti quanto quelle del midollo osseo nell'adulto e del cordone ombelicale. La manipolazione molecolare dei programmi genetici ed epigenetici che dirigono la generazione e l'espansione delle cellule staminali emopoietiche nello sviluppo, rappresenta un ulteriore e importante scoperta nella regolazione di queste cellule e potrebbe portare al miglioramento delle terapie di sostituzione del sangue.

- Le cellule staminali emopoietiche producono tutte le cellule del sangue nell'adulto.
- Le cellule staminali emopoietiche sono prodotte in diversi siti nell'embrione e si pensa che contribuiscano alla formazione del sistema circolatorio dell'adulto.
- Le nicchie contenenti le cellule stromali supportano la crescita delle cellule staminali emopoietiche attraverso la produzione di fattori.
- Sono in fase di studio i programmi genetici ed epigenetici delle cellule staminali emopoietiche.

Prospettive

Le Prospettive per la salute dell'utilizzo delle informazioni derivate dalla ricerca sulle cellule staminali embrionali emopoietiche comprende la

capacità di produrre *de novo* le stesse cellule staminali emopoietiche nell'adulto a partire da altre linee cellulari. La dimostrazione che lo sviluppo primordiale delle cellule staminali emopoietiche dai vasi sanguigni implica, ovviamente, che durante il processo di generazione si stabilisca un particolare stato molecolare (genetico ed epigenetico). La comprensione delle caratteristiche di questi precursori embrionali, delle cellule staminali emopoietiche e delle cellule stromali presenti al momento della formazione di quelle emopoietiche, insieme al confronto con le cellule e l'ambiente presenti nell'adulto potrebbero permettere di identificare vie di segnalazione su cui agire per stimolare o inibire le staminali nell'adulto con piccoli farmaci selettivi per il target. E' stato dimostrato che vie di segnalazione molecolare già ben descritte, quali quelle di Notch, Hedgehog e Wnt, sono coinvolte nella crescita delle cellule emopoietiche. Inoltre, sono state acquisite ulteriori conoscenze sulla formazione ed espansione delle cellule staminali emopoietiche durante lo stadio embrionale e il loro contributo potenziale al sistema emopoietico nell'adulto. E' interessante notare che non è noto se nei mammiferi le cellule staminali emopoietiche generate durante lo stadio embrionale migrino effettivamente e colonizzano il midollo osseo per formare il tessuto emopoietico definitivo.

Non è possibile escludere che rare cellule endoteliali, che fanno parte della vascolatura degli adulti, tra cui forse quelle dei molti vasi della placenta, mantengano la potenzialità di generare cellule emopoietiche. Se così fosse, si aprirebbero interessanti Prospettive per applicazioni terapeutiche basate su queste cellule dei vasi.

La disponibilità di un numero illimitato di cellule staminali per il differenziamento nelle linee cellulari desiderate, ha fatto nascere la possibilità di usare le cellule staminali embrionali per terapie di sostituzione del sangue, come metodo alternativo all'utilizzo di cellule staminali emopoietiche da midollo osseo o da cordone ombelicale (3). Inoltre, la possibilità di avere ceppi donatori universali di cellule staminali embrionali da cui derivare le staminali emopoietiche, potrebbe ovviare ai problemi relativi alla ricerca di donatori di cellule staminali compatibili. Dal momento che la prima dimostrazione del differenziamento ematopoietico nelle cellule staminali embrionali è stato effettuato circa 20 anni fa, molti approfondimenti sono stati fatti sullo sviluppo embrionale del sistema emopoietico del topo per comprendere il differenziamento delle cellule staminali in emopoietiche. Attraverso gli sforzi di pochi

laboratori, il miglioramento delle condizioni di coltura delle cellule staminali hanno permesso di aumentare la capacità di produrre cellule della linea eritroide (precursori dei globuli rossi), della linea mieloide (precursori dei globuli bianchi coinvolti nell'immunità non specifica) e della linea linfoide (precursori dei linfociti B e T del sistema immunitario specifico), e di identificare un precursore comune dei vasi e delle cellule emopoietiche (4).

Inoltre, è stato possibile ottenere anche il differenziamento delle cellule staminali embrionali umane (5).

Questi studi hanno permesso di approfondire le nostre conoscenze del programma genetico che dirige il differenziamento delle cellule staminali emopoietiche nelle prime fasi.

Ancora più interessante, sono stati fatti diversi progressi recentemente nel trattamento di tumori e leucemie con il farmaco Gleevec. Nonostante questo farmaco agisca sulle cellule che formano in gran parte la leucemia, una piccola popolazione di cellule leucemiche è in grado di sopravvivere, e nel tempo la leucemia si manifesta nuovamente. Queste cellule staminali leucemiche sono target interessanti per il trattamento di farmaci, che potrebbero essere scoperti mediante la conoscenza dei programmi genetici ed epigenetici delle cellule staminali emopoietiche normali e leucemiche.

Prospettive realistiche di applicazione della ricerca

- Stimolazione dello sviluppo dei programmi che dirigono la generazione delle cellule staminali emopoietiche de novo da precursori vascolari.
- Derivazione di cellule staminali emopoietiche in numero virtualmente infinito a partire da cellule staminali embrionali, utilizzabili per trapianti universali in terapie di sostituzione del sangue
- Trattamento farmacologico mirato di cellule staminali leucemiche per l'eliminazione di cellule autorinnovanti che agiscono come fonti di cellule leucemiche.

Problemi, riflessioni e questioni aperte

Purtroppo, al momento, non è stato ancora possibile ottenere cellule staminali emopoietiche adatte per il trapianto dalle cellule staminali embrionali di topo e dell'uomo (5). Saranno necessari più studi *in vitro* sul differenziamento delle cellule staminali emopoietiche per trovare indizi in merito alla derivazione diretta delle staminali emopoietiche da quelle embrionali. Se il differenziamento simultaneo dei tessuti che circondano i tessuti embrionali è necessario per l'induzione della formazione delle cellule staminali emopoietiche (come appare nel caso

dell'aorta dorsale durante l'embriogenesi), sarà necessario sviluppare sistemi di coltura multidimensionali per il differenziamento di cellule staminali embrionali, per la coltivazione anche delle cellule ausiliarie. Ulteriori studi potranno fornire informazioni su come le cellule staminali embrionali possano essere ottenute dalle cellule staminali embrionali operando sui programmi di sviluppo. Inoltre, dovrebbero essere sviluppate nuove opportunità per ottenere un grande numero di cellule staminali emopoietiche da un tessuto facilmente accessibile, come la placenta. Infine, questi studi forniranno informazioni che permetteranno di capire come le cellule staminali emopoietiche sono generate dalla vascolatura embrionale.

- La generazione di cellule staminali emopoietiche derivate dalle cellule staminali embrionali e/o da cellule vascolari probabilmente necessita un ambiente di sviluppo complesso.

Conclusioni

Il sistema ematopoietico è dinamico, ad altra proliferazione e possiede un complesso meccanismo di differenziamento con molti livelli di regolazione. Errori nella regolazione del rinnovamento delle cellule staminali emopoietiche possono condurre a 1) iperproliferazione, come nelle leucemia o 2) un deficit nei meccanismi di mantenimento delle cellule staminali. Un aumento della conoscenza del processo di autorinnovamento, come anche lo sviluppo di sistemi di segnalazione e ambientali adeguati, sono essenziali per la generazione e l'espansione delle cellule staminali emopoietiche (da tessuti adulti, embrionali o da cellule staminali embrionali) per il trattamento di malattie del sangue.

1. Hakim Nadey S and Pappas Vasilos E. (2003) History of Organ and Cell Transplantation, Imperial College Press, pp 304. and Leukemia and Lymphoma Society
2. Dzierzak E. (2005) The emergence of definitive hematopoietic stem cells in the mammal. Current Opinion in Hematology. 12:197- 2002.
3. Hematopoietic stem cell development: Review Issue (2005 Ed: Yoder MC. Experimental Hematology, 33.
4. Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL (2003) Normal and leukemic hemopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? PNAS 100(1):11842-11849.
5. Wang L, Li L, Shojaei F, Levac K, Cerdan C, Menendez P, Martin T, Rouleau A, Bhatia M. (2004) Endothelial and hematopoietic cell fate of

human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity*, 21:31-41.

Ricerca sulle cellule staminali nel tessuto osseo

- **Paolo Bianco**
- Università La Sapienza
- Roma, Italia

Introduzione

Ogni anno nel mondo sono effettuati oltre 80000 trapianti ossei, con un mercato che si aggira in totale intorno ai 300 milioni di euro. 27 milioni di europei si sottopongono a cure dentarie che richiedono l'aumento del tessuto osseo. L'osteoporosi colpisce circa 44 milioni di americani e un numero paragonabile di europei. Il costo totale per il trattamento di questi pazienti supera i 14 miliardi di euro l'anno. Le malattie del tessuto osseo, di interesse medico o chirurgico, stanno diventando uno dei problemi più importanti per la salute umana nei paesi occidentali. La ricerca nel settore delle cellule staminali per il tessuto osseo rappresenta una strada innovativa, razionale e d'avanguardia, che lascia intravedere importanti mete scientifiche e applicative (1,2).

Il punto della situazione

Il concetto di cellule staminali del tessuto scheletrico non è una novità recente, risale agli anni Sessanta del Novecento. Più recentemente, le cellule staminali del tessuto scheletrico hanno guadagnato una posizione centrale, in quanto rappresentano un tipo specifico di cellule staminali post-natali, e sono state rinominate "cellule staminali mesenchimali". Le cellule staminali del tessuto scheletrico sono contenute in una frazione del midollo osseo che non da origine alle cellule del sangue (il cosiddetto tessuto stromale). Possono essere isolate in coltura a partire da piccole quantità di midollo osseo, ottenute mediante una procedura di estrazione che non presenta particolari difficoltà. Si può indurre le cellule staminali del tessuto scheletrico (SSC, dall'inglese Skeletal Stem Cell) a moltiplicarsi in coltura e ad evolvere verso una forma matura, che può dar luogo a tessuto osseo (il costituente principale delle ossa), a cartilagine (il costituente principale delle aree rivolte verso le articolazioni delle ossa), il tessuto adiposo (un componente del midollo osseo che riempie le cavità ossee e le parti molli intorno alle ossa), il tessuto fibroso (il costituente principale dei tendini e legamenti) e il tessuto necessario per l'emopoiesi (lo stroma ematopoietico, che crea

l'ambiente per la formazione delle cellule sangue all'interno del midollo delle ossa).

Tutti questi tessuti, insieme, costituiscono lo scheletro e possono essere generati a partire da una singola cellula staminale del tessuto scheletrico. Questo può essere dimostrato utilizzando un modello di trapianto appropriato, in cui le cellule originate *in vitro* da una singola SSC possono dare origine ad uno o più tipi di tessuti dello scheletro *in vivo*. Inizialmente progettati come esperimenti per provare il principio teorico, con topi immunodeficienti come riceventi, gli studi sui trapianti si sono evoluti in modelli preclinici e, quindi, in studi clinici pilota, con lo scopo di utilizzare le SSC per la rigenerazione del tessuto osseo. A questo punto, i trial clinici sono già in corso, o comunque già pianificati, in tutto il mondo. L'uso delle SSC per la rigenerazione del tessuto osseo attraverso l'ingegneria tissutale è un traguardo che si può ipotizzare raggiungibile – se non domani, al massimo nel futuro prossimo.

Al momento, l'approccio più comune all'ingegnerizzazione del tessuto osseo è basta sulla generazione di un costrutto composto da cellule e biomateriali che viene trapiantato localmente. La componente cellulare del costrutto è ottenuta attraverso la coltura *in vitro* delle SSC isolate dal midollo osseo del paziente stesso. Le linee cellulari ottenute in questo modo sono combinate con materiale di supporto, solitamente composte da una fase minerale (idrossiapatite, fosfato di tricalcio, carbonato di calcio o combinazioni di questi). Le cellule aderiscono alla porzione minerale, che a sua volta, facilita la deposizione di nuovo tessuto osseo da parte delle cellule presenti nel supporto. Idealmente, la struttura di supporto deve essere riassorbibile dall'organismo del ricevente nel tempo, lasciando in loco solo il tessuto osseo neoformato.

- Le cellule staminali del tessuto scheletrico (mesenchimali) possono essere facilmente isolate dal midollo osseo post-natale.
- Le cellule staminali del tessuto scheletrico possono dare origine al tessuto osseo, alla cartilagine, al tessuto adiposo, al tessuto fibroso e allo stroma ematopoietico.
- L'abilità delle SSC di dare origine a specifici tessuti dello scheletro è stata studiata e può essere sfruttata per rigenerare il tessuto osseo, e probabilmente altri tessuti in futuro.

Prospettive

È presumibile che potremmo avere i risultati dei trial clinici in corso per l'ingegnerizzazione del tessuto osseo nei prossimi due anni. I risultati di questi studi risponderanno a domande relative alla fattibilità, sicurezza ed efficacia dell'approccio. Nel contempo, ci si aspetta anche che portino alla luce problemi specifici. Tra questi, saranno probabilmente compresi la necessità di confrontarsi con i diversi approcci chirurgici e la necessità di sviluppare strategie specifiche per diverse applicazioni (per esempio, la ricostruzione di segmenti ossei, l'aumento del tessuto osseo, la fusione spinale e così via).

Altre Prospettive importanti risiedono nell'area della terapia cellulare, utilizzando le cellule staminali del tessuto scheletrico. Mentre la scala che riguarda i problemi clinici, e il relativo mercato, è enorme per l'ingegnerizzazione del tessuto osseo: le singole malattie che potrebbero, in linea teorica, essere trattate con l'uso della terapia cellulare sono relativamente rare. Comunque, la gravità clinica, l'interesse sociale e sul piano umano che rappresentano sono forze sufficienti per giustificare gli studi in questa direzione. Come la nozione di cellule staminali nell'emopoiesi ha permesso ai ricercatori di trovare cure per malattie apparentemente incurabili come la leucemia, così il grande interesse e la sfida riposta nello studio delle cellule staminali risiedono anche nella prospettiva di curare malattie invalidanti e talvolta letali che colpiscono il tessuto scheletrico. Gli approcci terapeutici attuali per malattie come l'osteogenesi imperfetta e la displasia fibrotica non costituiscono una cura. Ad ogni modo, gli sforzi per percorrere la strada innovativa della terapia basata sulle cellule staminali per queste malattie necessitano più di un'opzione investigativa.

Anche ad altre caratteristiche, meno evidenti, delle SSC sono associate interessanti Prospettive. La capacità delle SSC di generare il giusto quadro stromale per la produzione delle cellule del sangue ha importanti implicazioni teoriche e applicative, che collegano il campo delle SSC con quello dell'emopoiesi e delle malattie emopoietiche. L'interesse emergente in questa area di studio porterà probabilmente ad importanti avanzamenti di rilievo sia per lo studio del tessuto dello scheletro che per l'emopoiesi (3).

- I trial clinici per testare l'uso delle SSC per la riparazione del tessuto osseo sono attualmente in corso.
- Con le SSC è teoricamente possibile curare diverse malattie dello scheletro attualmente non curabili.

- Le SSC e le cellule derivate sono funzionalmente correlate alle cellule emopoietiche (che formano le cellule del sangue).

Problemi, riflessioni e questioni aperte

Nell'ingegneria dei tessuti per le ossa sono necessari, e sono attesi, avanzamenti per quel che riguarda lo sviluppo dei biomateriali. I materiali utilizzati nelle prime fasi di studio (preclinica e clinica) sono stati selezionati sulla base della capacità di facilitare la formazione del tessuto osseo da parte di cellule che normalmente svolgono questa funzione *in vivo* (materiale osteoconduttivo). L'utilizzo di cellule staminali per l'ingegnerizzazione dei tessuti ossei pone peculiari sfide e i materiali utilizzati come supporto dovranno essere adattati per mantenere le caratteristiche proprie delle cellule staminali nel lungo termine, dopo il trapianto *in vivo*. Sono in corso degli studi per progettare e validare una nuova generazione di materiali, tra cui quelli disegnati per rilasciare fattori bioattivi in modo controllato.

L'utilizzo delle SSC per riparare altri tessuti scheletrici, quali le cartilagini articolari (che coprono la superficie delle giunture), è un'applicazione meno immediata, che richiede ancora molti studi in fase preclinica. Anche in questo caso, la dimensione del problema clinico e del mercato corrispondente è molto larga. Nonostante sia semplice ottenere cartilagine funzionale dalle SSC, (utilizzando sia esperimenti *in vitro* che modelli *in vivo*), sono necessari altri studi per identificare biomateriali migliori e per assicurare la stabilità del tessuto.

Nell'area della terapia cellulare, sono attesi avanzamenti nelle tecnologie per: a) modificare le cellule staminali prima del loro utilizzo *in vivo*; b) per veicolare le cellule staminali al luogo dell'impianto in modo diverso da quello diretto. Sono necessari progressi in entrambe le aree per la realizzazione e la progettazione di studi che utilizzino le cellule staminali come terapia per le malattie genetiche.

Questo è importante anche per altre malattie che colpiscono l'intero scheletro, piuttosto che un singolo componente o una singola parte di un osso. Le cellule staminali geneticamente modificate sono strumenti di base che sono state sviluppate in anni recenti (come i vettori virali) e devono essere adattate per l'utilizzo in sistemi cellulari specifici.

Inoltre, devono essere anche sviluppati sistemi in cui i singoli geni non devono essere solo trasferiti nelle cellule, ma silenziati. Questo è necessario per la cura di specifiche malattie scheletriche in cui l'eccessiva attività di un prodotto genico – e non la mancanza dello stesso – causa anomalie

nella struttura e nella funzione delle ossa. Lo sviluppo di metodi efficaci per veicolare le cellule staminali in tutti i punti dello scheletro è un punto importante per la cura delle malattie che coinvolgono l'intero organismo. Al momento, non ci sono solide evidenze che si possano veicolare le SSC all'intero scheletro utilizzando il torrente sanguigno, per esempio con un'iniezione intravenosa.

Nell'area della biologia delle cellule staminali che ha risvolti diretti per la clinica, sono necessari e attesi progressi nella purificazione di frazioni cellulari di cellule staminali, comprese nelle popolazioni cellulari che possono essere attualmente espianate e messe in coltura. Questa popolazione include una popolazione in relazione gerarchica di cellule staminali e progenitrici con potenzialità diverse nella duplicazione cellulare e nella maturazione in specifici tipi cellulari del tessuto scheletrico (differenziamento). La disponibilità di una popolazione di cellule staminali purificate permetterebbe la progettazione di strategie che non necessitano della cultura *in vitro* prima del passaggio alla clinica. Questo semplificherebbe enormemente l'uso clinico delle SSC, e probabilmente aumenterebbe l'efficacia.

- Deve essere sviluppata una nuova generazione di materiali di supporto adatti alla cellule staminali per l'ingegneria tissutale.
- Le strategie per correggere i difetti genetici delle SSC richiedono ancora sviluppo e validazione.
- Le strategie per veicolare le SSC richiedono ancora sviluppo e validazione.

Conclusioni

La ricerca nel settore delle malattie che colpiscono il tessuto osseo apre nuove e importanti Prospettive in molteplici aree, quali quella della chirurgia medica e ortopedica. Nella chirurgia ortopedica, apre la strada all'utilizzo delle cellule staminali per generare tessuti richiesti alla riparazione dei difetti del tessuto osseo (per esempio, per rimpiazzare un segmento di un osso, per aumentare la massa di un osso in un sito specifico o per porre rimedio a difetti risultanti da fratture che non si sono rinsaldate, ecc.). Sul confine con la chirurgia ortopedica, la nozione di tessuto scheletrico che origina dalle cellule staminali apre la prospettiva di usare le cellule staminali per la cura di malattie ora incurabili, come malattie invalidanti del tessuto scheletrico. Inoltre, fornisce informazioni per progettare nuovi farmaci e per comprendere a fondo i meccanismi di queste malattie. La ricerca ha evidenziato come le cellule staminali per il tessuto scheletrico

possano essere considerate come dei target per l'intervento farmacologico in un ampio campo di disordini del tessuto osseo, incluse le malattie con elevata prevalenza e ad alto impatto sociale ed economico.

1. Bianco P & Gheron Robey P: Skeletal stem cells. In RP Lanza, HM Blau, DA Melton, MAS Moore, E. Donnall Thomas (Hon), C M Verfaillie, IL Weissman, MD West (eds) (2004) Handbook of adult and foetal stem cells, vol 2. *Academic Press*, New York, pp 415-424
2. Bianco P, Gheron Robey P: Stem cells in tissue engineering. (2001) *Nature* 414: 118-121,
3. Kuznetsov SA, Riminucci M, Ziran N, Tsutsui TW, Corsi A, Calvi L, Kronenberg HM, Schipani E, Gheron Robey P, Bianco P: (2004) The interplay of osteogenesis and hemopoiesis: Expression of a constitutively active PTH/PTHrP receptor in osteogenic cells perturbs the establishment of hemopoiesis in bone and of skeletal stem cells in the bone marrow. *Journal of Cell Biology* 167:1113-1122,

Cellule staminali e tumori

- **Riccardo Fodde**
- Department of Pathology
- Josephine Nefkens Institute, Erasmus MC
- Rotterdam, The Netherlands

Introduzione

Le cellule staminali cancerose sono un modello utile – come sostenuto da un numero crescente di studi sperimentali – per spiegare e studiare il cancro. In generale, il cancro si pensa che origini da un tessuto normale, in seguito ad un processo progressivo attraverso diversi stadi, a partire dalla lesione primarie fino allo stadio invasivo (maligno). Le metastasi locali e a distanza derivano dalle lesioni maligne primarie e rappresentano una delle principali cause di elevata frequenza di mortalità tra i pazienti affetti da cancro nel mondo industrializzato. Insieme a questa sequenza di eventi, l'accumulazione progressiva di alterazioni geniche in specifici geni tumorali è considerata la forza trainante per l'inizio, la progressione e la metastasi del cancro.

Un numero di cambiamenti cellulari ben definiti, come l'autosufficienza nella segnalazione con fattori di crescita, la resistenza alla morte cellulare programmata (apoptosi), l'insensibilità ai fattori di crescita inibitori, la mancanza di limiti nella duplicazione cellulare e la capacità di indurre la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi), si pensa che siano le caratteristiche essenziali per la crescita e l'invasività in siti di distanti di una cellula cancerosa (1).

Comunque, nonostante sia formalmente corretto, questo modello non prende in considerazione altre caratteristiche essenziali del cancro nell'uomo, come l'elevata eterogeneità cellulare (molti tipi cellulari diversi sono presenti all'interno di una stessa massa tumorale) e il ruolo putativo giocato da una sottopopolazione di cellule, le cellule staminali cancerose (CSC), nel guidare la crescita del tumore e nel determinare l'invasione a livello locale nei tessuti circostanti e in metastasi distali (2,3).

I tumori non sono macchinari in grado di proliferare in modo autonomo, ma presentano aspetti molto eterogenei per quanto riguarda la morfologia e gli aspetti funzionali. Infatti, un singolo tumore può presentare aree diverse con comportamenti diversi: proliferazione,

arresto del ciclo cellulare, differenziamento epiteliale, adesione cellulare e disseminazione. In accordo a questo modello più dinamico delle SCS (figura 1), la maggior parte dei tipi tumorali derivano da nicchie di cellule staminali caratterizzate da un bilancio finemente coordinato tra automantenimento, migrazione, proliferazione, differenziamento e apoptosi. Le mutazioni in geni noti per essere responsabili di questo bilanciamento nei tessuti normali danno luogo alla formazione di masse tumorali parzialmente differenziate ed eterogenee che, in seguito a mutazioni addizionali e sotto l'influenza positiva dei fattori microambientali, progrediscono verso il tumore maligno.

Le cellule tumorali si staccano dalla massa tumorale per disseminarsi nel microambiente. Riflettono comunque l'eterogeneità del tumore primario e solo in poche, le cellule staminali cancerose migranti, hanno la plasticità necessaria a subire il trans-differenziamento e a migrare e situarsi in organi distali (3). In accordo a questo, la progressione del cancro verso una forma aggressiva è stata correlata con la perdita dell'identità epiteliale e l'acquisizione del fenotipo migratorio. Questo fenomeno, definito come transizione da epitelio a mesenchima (EMT, dall'inglese epithelial to mesenchymal transition), è considerato un evento cruciale nella progressione della malignità. Ulteriori passaggi che permettono la disseminazione e la metastasi possono essere reversibili (come la transizione dal mesenchima all'epitelio, MET – mesenchymal to epithelia transition), e non possono essere spiegate solo con la teoria delle alterazioni genetiche irreversibili, indicando l'esistenza di una componente dinamica nella progressione del tumore umana e un ruolo regolatorio per l'ambiente tumorale.

Per riepilogare:

- l'eterogeneità tumorale non è spiegata dall'attuale modello genetico per l'inizio e progressione verso lo stadio maligno e metastasi dei tumori
- le CSC derivano dalla controparte normale all'interno delle nicchie delle cellule staminali
- le CSC rappresentano una piccola ma rilevante sottopopolazione all'interno della massa tumorale.

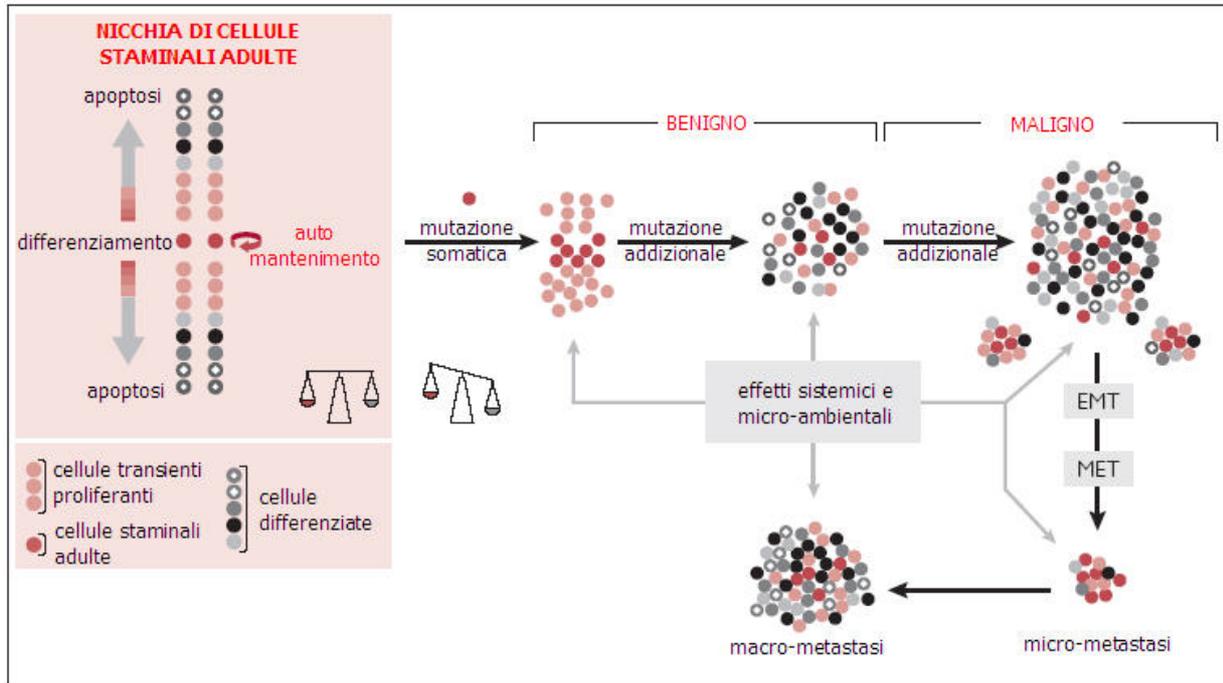


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'ipotesi delle cellule staminali cancerose nella formazione e progressione dei tumori maligni. Nella nicchia delle cellule staminali adulte, le cellule staminali pluripotenti sono in equilibrio con i precursori commissionati e le cellule totalmente differenziate (specializzate). Le mutazioni geniche conducono ad alterazioni nell'equilibrio tra cellule staminali e cellule specializzate. Questo disequilibrio ha come conseguenza una proliferazione eccessiva e/o la mancanza di risposta alla morte cellulare programmata (apoptosi), che conduce alla formazione di una massa cellulare eterogenea (tumore benigno). Mutazioni geniche addizionali inducono la progressione verso forme sempre più maligne del tumore. Dal tumore primario si staccano diversi tipi cellulari. Le cellule staminali cancerose, a causa della loro plasticità e capacità di trans-differenziare, sono in grado di muoversi all'interno dell'organismo invadendo organi distanti e formando micro-metastasi, ricche in cellule staminali, ed eventualmente macro-metastasi, che assomigliano al tumore primario in termini di composizione cellulare ed eterogeneità.

Il punto della situazione

Un'area importante della ricerca in questo settore riguarda lo studio dei marcatori di superficie che caratterizzano le CSS quando presenti difetti molecolari e cellulari.

Il concetto di cellula staminale cancerosa è stato proposto per la prima volta più di cento anni fa, ma solo recentemente è tornato alla ribalta grazie alle ultime scoperte nella biologia delle cellule staminali. Le cellule staminali normali sono comunemente definite da due caratteristiche intrinseche particolari: la capacità di automantenersi (attraverso la duplicazione cellulare) e di acquisire ed esercitare alcune funzioni (attraverso il differenziamento). L'automantenimento e il differenziamento sono relativi alla capacità delle cellule staminali di dividersi in modo asimmetrico, cioè ad ogni divisione cellulare si producono sia cellule pluripotenti (del tipo staminale) che commissionate (differenziate o specializzate) in un modo finemente regolato.

Al contrario della loro controparte embrionale, le cellule staminali adulte esistono, anche se sono poche, in tutti gli organi dell'organismo e giocano un ruolo essenziale nel preservare e mantenere i tessuti nell'adulto. Inoltre, specifiche nicchie di cellule staminali possono essere espanse (per esempio, le ghiandole mammarie durante la gravidanza) o reclutate per riparare danni tissutali (per esempio, durante una ferita). All'interno di queste nicchie di cellule staminali, è molto importante l'automantenimento e il differenziamento, ma anche la migrazione cellulare e la morte cellulare programmata, che devono essere mantenuti in stretto equilibrio per evitare la perdita di massa cellulare (perdita di tessuto dovuta a più differenziamento che automantenimento) o l'aumento (crescita del tessuto o neoplasia, dovuta a più automantenimento che differenziamento).

Le cellule staminali cancerose derivano probabilmente dalla loro controparte normale attraverso mutazioni che alterano le vie di trasduzione del segnale nelle cellule (esempio, le vie di Wnt, Hedgehog e Notch), note per regolare finemente questo bilancio. Questo può essere dovuto, per esempio, ad un semplice sbilanciamento della divisione cellulare da simmetrica verso asimmetrica o all'insensibilità ai segnali di crescita inibitori rilasciati dalle cellule circostanti.

Inoltre, in accordo con il modello SCS, una piccola sottopopolazione di cellule mantiene le proprietà di cellule staminali ed è responsabile della crescita tumorale (per automantenimento) e dell'eterogeneità (per differenziamento). Sono

state ottenute evidenze sperimentali per l'esistenza delle cellule staminali cancerose in diversi tipi tumorali, quali leucemia, mieloma multiplo, tumore alla mammella, al cervello, alla prostata e al polmone (tabella 1). Questi studi consistono nella dissociazione dei tumori umani in singole cellule, mantenute in sospensione e quindi separate in base ai marcatori presenti sulla loro superficie, quindi trapiantate in animali immunodeficienti (NOD/SCID).

Le cellule staminali cancerose sono identificate in base alla loro capacità di replicare la tumorigenesi anche se trapiantate in basso numero nei modelli sperimentali. Per esempio, una cellula su 10^5 cellule della leucemia mieloide acuta esprime il marcatore di superficie $CD34^+CD38^+$ ed è in grado di dar luogo all'eterogeneità istologica della malattia quando trapiantata in animali SCID. Analogamente, il cancro alla mammella comprende una sottopopolazione (1-10%) di $CD44^+CD24^{low}$ lin⁻. Queste cellule CSC putative della mammella possono formare tumori in topi NOD/SCIP anche se l'impianto prevede l'introduzione di sole 200 unità. È interessante notare come molti marcatori di superficie siano presenti in SCS isolate da diversi tipi di cancro, forse ad indicare che si attivano le stesse vie di segnalazione della trasduzione. La deregolazione della segnalazione della via di Wnt, per esempio, è stato dimostrato essere un evento precoce nella progressione maligna dei tumori del colon, della mammella, della pelle e del tessuto ematopoietico ed è probabilmente responsabile dell'attivazione dell'automantenimento delle cellule staminali in corrispondenza delle nicchie tessuto-specifiche.

Per riepilogare:

- l'automantenimento e il differenziamento rappresentano le caratteristiche principali del CSC: il primo guida la formazione e la crescita del tumore mentre il secondo determina l'eterogeneità
- la deregolazione delle vie di segnalazione note per modulare l'automantenimento e il differenziamento durante lo sviluppo e nelle nicchie di cellule staminali adulte è un evento che prelude la nascita delle CSC e al comportamento invasivo
- la separazione delle cellule grazie a specifiche combinazioni di marcatori cellulari di superficie e il trapianto in topi immunodeficienti ha permesso di identificare e isolare specifiche CSC in diversi tipi di cancro umano.

Tipo di cancro	Marcatore specifico delle CSC	Referenza
Leucemia	CD34 ⁺ / CD38-	<i>Nat Med</i> 3: 730 (1997)
Mammella	CD44 ⁺ / CD24 ^{low lin-}	<i>PNAS</i> 100: 3983 (2003)
Cervello	CD133 ⁺	<i>Nature</i> 432: 396 (2004)
Mieloma	CD138 ⁻	<i>Blood</i> 103: 2332 (2004)
Prostata	CD44 ⁺ / 2 1 ^{hi} /CD13 3 ⁺	<i>Blood</i> 103: 2332 (2004)
Polmone	Sca-1 ⁺ / CD45 ⁻ / Pecam ⁻	<i>Cell</i> 121: 823 (2005)

Tabella 1. Cellule staminali cancerose identificate e marcatori corrispondenti.

Prospettive

Le cellule staminali cancerose offrono Prospettive per il miglioramento della prognosi e il trattamento del cancro. La dimostrazione dell'esistenza in diversi tumori maligni umani di una minoranza di cellule staminali cancerose in grado di riprodurre l'eterogeneità e la malignità delle malattie umane in esperimenti animali ha diverse implicazioni per la prognosi e il trattamento del cancro. Uno degli strumenti attualmente considerati come una promettente risorsa per la prognosi e la valutazione della risposta a trattamenti farmacologici è l'analisi del profilo di espressione. Se la nascita del tumore e il comportamento invasivo è dovuto ad una minoranza di cellule CSC, la loro quantità all'interno della massa tumorale potrebbe correlare con il rischio per il paziente di sviluppare metastasi locali e a distanza. Inoltre, il profilo di espressione di un intero tumore mediante analisi di microarray, analizzando l'intero assetto di geni umani, è improbabile che aiuti ad individuare l'espressione di geni caratteristici delle CSC, dal momento che queste cellule sono diluite in una maggioranza di cellule con caratteristiche eterogenee. Analogamente, il profilo di espressione di interi tumori potrebbe avere un basso impatto nella progettazione di approcci fatti su misura.

L'identificazione di caratteristiche specifiche delle CSC grazie al profilo di espressione di CSC permetterebbe l'analisi bioinformatica del profilo tumorale e una maggiore accuratezza nella predizione clinica del comportamento metastatico e in risposta al trattamento. Inoltre, faciliterebbe l'identificazione di nuove terapie che hanno le CSC come target. Oltre che dalle tradizionali chemioterapie e radioterapie, la riduzione del tumore potrebbe derivare dalla morte di cellule tumorali differenziate. Inoltre, se le CSC costituiscono una minoranza delle cellule tumorali e se, come riportato in letteratura, sono

caratterizzate da una resistenza intrinseca alla radiazione e agli agenti chimici, probabilmente sono in grado di resistere a terapie adiuvanti e dare origine alla ripresa del cancro. Quindi, lo sviluppo di terapie che agiscono in modo specifico contro le CSC è probabile che dia luogo ad un aumento considerevole della sopravvivenza a lungo termine dei pazienti.

L'ipotesi delle cellule staminali cancerose suggerisce nuove Prospettive per la rilevazione delle cellule cancerose circolanti dopo la rimozione chirurgica del tumore maligno primario. In generale, le cellule cancerose circolanti nel sangue e nel midollo osseo sono note essere presenti in elevate quantità nei pazienti affetti da cancro. Le cellule cancerose circolanti, ad ogni modo, riflettono l'eterogeneità della massa tumorale primaria e solo una minoranza è in grado di dare metastasi in organi distanti. Le CSC, a causa della loro plasticità intrinseca e della capacità di transdifferenziare in seguito a stimoli provenienti dall'ambiente circostante, rappresentano una sottopopolazione, molto rilevante dal punto di vista clinico, di cellule cancerose migranti in grado di riprodurre la lesione primaria in siti distanti. L'identificazione dei marcatori di superficie delle CSC per specifici tipi di cancro (tabella 1) probabilmente permetterà l'identificazione e la quantificazione di CSC migranti nei fluidi corporei, per guidare il trattamento e la sorveglianza postclinica del decorso del paziente affetto da cancro.

Per riepilogare:

- il profilo di espressione dell'intero tumore probabilmente riflette l'eterogeneità dei profili cellulari mascherando quello specifico delle sottopopolazioni clinicamente rilevanti delle CSC
- la definizione di geni specifici delle CSC aumenterà la nostra capacità di predire la prognosi del cancro e di rispondere a trattamenti basati sul profilo di espressione degli interi tumori
- lo stesso profilo di espressione delle CSC faciliterà l'identificazione dei target terapeutici per interventi personalizzati.

Conclusioni

L'ipotesi delle cellule staminali cancerose rappresenta un concetto molto innovativo nella biologia del cancro con profonde e fondamentali implicazioni per la clinica. La ricerca sulle cellule staminali cancerose si muoverà in parallelo con quella sulle normali cellule staminali embrionali e adulte. È centrale in entrambi i casi, lo studio e l'identificazione dei marcatori di superficie, per la loro possibilità di essere utilizzati, in prospettiva, per distinguere tessuti sani da tessuti malati. La

caratterizzazione molecolare conseguente delle cellule staminali purificate attraverso l'analisi del profilo genetico e proteico porrà le basi per la gli studi che potrebbero portare a chiarire i meccanismi molecolari e cellulari che regolano l'automantenimento e il differenziamento nell'omeostasi e nel cancro. Questi progressi nella nostra conoscenza della biologia delle cellule staminali cancerose apriranno nuove porte per il miglioramento della diagnosi di rischio, nella prognosi, nella sorveglianza, nella prevenzione e nella terapia mirata del cancro. A questo scopo, sia la ricerca applicata che di base devono essere sostenute, combinando l'analisi genetica, cellulare e molecolare di modelli sperimentali *in vivo* e *in vitro* di CSC con l'identificazione, purificazione e analisi delle stesse ottenute da biopsie e fluidi corporei di pazienti affetti da cancro.

1. Hanahan, D and Weinberg, RA The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70
2. Reya, T, Morrison, SJ, Clarke, MF, and Weissman, IL Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-11
3. Brabletz, T, Jung, A, Spaderna, S, Hlubek, F, and Kirchner, T Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;5:744-9
4. Reya, T and Clevers, H Wnt signalling in stem cells and cancer. (2005) *Nature*;434:843-50
5. Gaspar, C and Fodde, (2004) R APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *Int J Dev Biol*;48:377-86

Riparare il cuore: la ricerca nelle cellule staminali nell'infarto acuto del miocardio e nelle malattie croniche delle coronarie

- **Michael Brehm, Bodo E. Strauer**
- Heinrich-Heine-University
- Düsseldorf, Germany

Introduzione

I successi terapeutici nell'area della ricerca sulle cellule staminali hanno aperto nuove strade per la cura delle malattie cardiovascolari dovute ad attacco cardiaco acuto (infarto acuto del miocardio causato da mancanza improvvisa e prolungata di ossigenazione) o a malattie croniche delle coronarie (diminuzione graduale dell'apporto di ossigeno dovut all'assottigliamento progressivo del lume delle coronarie).

Nella sola Germania, circa 330000 persone ogni anno vanno in contro ad infarto acuto del miocardio, il cosiddetto attacco cardiaco. Attualmente è in fase di studio sperimentale per il trattamento dell'infarto acuto del miocardio e per le malattie delle coronarie la somministrazione di cellule staminali derivate dal midollo osseo nelle coronarie (somministrazione intracoronarica), nel ventricolo (somministrazione transendocardica) o direttamente nel muscolo cardiaco durante la realizzazione di un bypass (somministrazione intramiocardica).

Tutti i metodi di applicazione inseguono lo stesso obiettivo di rigenerazione del miocardio (muscolo cardiaco) danneggiato, sia attraverso il transdifferenziamento di cellule staminali derivate dal miocardio del paziente in cellule cardiache che mediante la riparazione del muscolo cardiaco in degenerazione con citochine o attraverso l'arricchimento di cellule staminali cardiache nel muscolo cardiaco infartuato.

Questi meccanismi di azione differenti giocano ruoli diversi nelle varie malattie cardiache, il che implica che possono avere un effetto decisivo sulla natura individuale dei trattamenti.

Il punto della situazione

Le cellule staminali derivate dal midollo osseo sono in grado di dividersi e, a seconda dell'ambiente, di trasformarsi in diverse cellule cardiache funzionali (per esempio cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e cardiomiociti, le cellule muscolari del cuore), anche se si pensa che questo accada a basso livello, secondo le ultime ricerche, ancora molto discusse. Nonostante ciò, le applicazioni terapeutiche delle cellule staminali e il rilascio delle loro citochine

intracellulari e dei fattori di crescita prevengono la morte per apoptosi delle cellule site al confine con la zona infartuata. Inoltre, l'applicazione locale delle cellule staminali permette di avere un'elevata concentrazione delle stesse nella zona infartuata. Le citochine regolano, infine, la migrazione delle cellule staminali endogene dalle loro nicchie nel cuore (per esempio, l'atrio e l'apice del ventricolo sinistro) alle aree danneggiate del miocardio.

Il concetto di rigenerazione è stato confermato originariamente attraverso un modello *in vivo*, nel topo, di infarto del miocardio nel 2001 (1), attraverso lo studio di sezioni colorate del cuore osservate al microscopio (una tecnica ben consolidata chiamata istologia). Il vecchio dogma che diceva che le cellule che mancano di un meccanismo di riparazione intrinseco è stato smentito e il concetto di crescita muscolare (neomiogenesi) e di crescita dei vasi sanguigni (neangiogenesi) sono stati confermati. In questo ambito, sono stati compiuti diversi esperimenti su animali e un numero minore di studi clinici nell'uomo, in pazienti che avevano subito infarti acuti del miocardio o con malattie croniche delle coronarie. Questi studi hanno confermato l'ipotesi della capacità di rigenerazione del miocardio, dopo l'applicazione delle cellule staminali derivate dal midollo osseo, utilizzando diversi metodi investigativi: istologia, immunohistologia (utilizzo di anticorpi per colorare i tessuti), biologia molecolare e approcci clinici. Comunque, i meccanismi cellulari e molecolari sono ancora oggetto di intensa ricerca, e il monitoraggio *in vivo* e *in vitro* dell'applicazione delle cellule staminali derivate dal midollo osseo è di particolare interesse, per comprendere a fondo il processo rigenerativo che avviene all'interno del muscolo cardiaco.

- Le cellule che derivano dal midollo osseo possono differenziare in cellule cardiache specifiche (per esempio, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e cardiomiociti).
- La riparazione dei tessuti che si osserva nel miocardio potrebbe essere dovuta a questo transdifferenziamento, oppure alla migrazione e al differenziamento delle cellule staminali cardiache residenti, in risposta ai fattori rilasciati dalle cellule introdotte nuovamente.
- Vari studi clinici hanno confermato che le cellule staminali autologhe del midollo osseo,

prese dallo stesso paziente, possono riparare il cuore, migliorando la funzionalità cardiaca, la per +fusione e il metabolismo in diversi stati patologici del cuore.

Prospettive per la ricerca

Nel trattare le malattie cardiache è importante valutare tre diversi approcci per applicare le cellule staminali ai fini di riparare il miocardio: (I) il trapianto di cellule staminali derivate dal midollo osseo, attraverso diversi metodi di applicazione, preferibilmente attraverso la tecnica di somministrazione intracoronarica, (II) la stimolazione della biogenesi e dell'angiogenesi da parte di cellule staminali, o precursori, residenti nel miocardio e (III) la mobilitazione delle cellule staminali dal midollo osseo mediante citochine verso il miocardio danneggiato.

L'infarto acuto del miocardio e le malattie delle arterie coronarie hanno ricevuto dei benefici dal trapianto di cellule staminali derivate dal midollo osseo. La maggior parte dei progressi sono stati fatti sull'infarto del miocardio e sono andati avanti senza grandi complicazioni negli ultimi cinque anni. Strauer e collaboratori sono stati i primi ad iniettare le cellule staminali autologhe derivate dal midollo osseo durante la cateterizzazione di routine nell'arteria coronaria (arteria coronaria anteriore discendente) in un paziente con infarto della parte anteriore nel marzo 2001. Il risultato è stato un recupero stabile del movimento e della perfusione della parete anteriore e della funzione globale di pompa del cuore (2). In studi clinici più ampi, il beneficio dell'utilizzo di cellule autologhe del midollo osseo per pazienti con infarto acuto del miocardio è stato confermato dopo 3 e 24-36 mesi. In una piccola frazione di studi questo effetto non si è manifestato così chiaramente: le cellule sono state inoculate durante la fase acuta, entro le prime 24 ore dopo l'infarto acuto, nel momento in cui la degradazione dei cardiomiociti morenti era al culmine, e in questi casi si dovrebbe considerare il coinvolgimento della risposta immunitaria.

Risultati diversi sono stati ottenuti negli studi a lungo termine sul trapianto di cellule staminali. In uno studio è stato registrato un aumento della funzionalità di pompa cardiaca nella maggior parte dei pazienti, persistente per oltre tre anni. In un altro studio, in cui la valutazione era effettuata mediante tomografia in risonanza magnetica, è stato osservato solo un effetto temporaneo dopo tre mesi e dopo 12 mesi non è stato rilevato alcun miglioramento rispetto al gruppo di controllo di pazienti non trapiantati. Ad ogni modo, in uno studio controllato a doppio cieco è stato osservato un miglioramento significativo della funzionalità cardiaca sia a livello regionale che globale, dopo quattro mesi dal trattamento

con cellule staminali, rispetto al gruppo di controllo (che non ha ricevuto cellule staminali).

Il grande beneficio delle terapie a base di cellule staminali derivate del midollo osseo per la riparazione del miocardio non comprende solo la sostituzione del tessuto cardiaco danneggiato (per esempio, cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisci), ma anche la capacità funzionale delle nuove cellule muscolari all'interno del tessuto esistente. Le cellule staminali derivate dal midollo osseo possono mediare indirettamente benefici addizionali attraverso la stimolazione di cellule staminali locali cardiache, residenti. Le cellule staminali derivate dal midollo osseo possono produrre citochine cardiotropiche (fattori di crescita, fattori chemioattraenti), che possono promuovere la sopravvivenza di cellule muscolari cardiache morenti o modulare la risposta immunitaria che si attiva in seguito a danneggiamento al cuore.

Un'alternativa attraente al trapianto delle cellule staminali autologhe derivate dal midollo osseo, è la riattivazione del differenziamento delle cellule cardiache endogene o di precursori cellulari in nuove cellule cardiache. Le cellule staminali residenti si trovano in quelle che sono definite le nicchie nel tessuto cardiaco. Questo approccio potrebbe avere il vantaggio di essere potenzialmente non invasivo e potrebbe utilizzare solo le cellule staminali residenti del paziente. Alla prima occhiata, questo potrebbe apparire estremamente interessante, dal momento che coinvolge diversi passaggi, tra cui la migrazione, la proliferazione e il differenziamento, che hanno tutti un ruolo per la buona riuscita della terapia. In ogni caso, quello che è chiaro è che il tessuto muscolare del cuore nell'adulto ha la capacità di riparare sé stesso. In studi sperimentali è stato dimostrato che le cellule staminali cardiache residenti possono essere attratte da alcune citochine (fattori cardiotropici) quando iniettate nel cuore.

Probabilmente l'ultima sfida per la miogenesi terapeutica (ri-generazione muscolare) è l'aumento del processo di mobilitazione delle cellule staminali dal midollo osseo con l'aiuto di molecole definite chemioattrattori quali G-CSF o GM-CSF. Questo aumento della mobilitazione nel sangue periferico delle cellule staminali emopoietiche, delle cellule staminali mesenchimali e dei precursori cardiaci dal midollo osseo. Quindi, le cellule staminali migranti potrebbero migrare nelle aree danneggiate del cuore. Questo approccio – che potrebbe dimostrare il beneficio del trattamento per malattie cardiache – è stato seguito per la prima volta da Anversa e collaboratori (3). L'applicazione sistemica di fattori chemioattraenti (chemochine) come il fattore stimolante le colonie

dei granulociti (G-CSF) o quello dei fattori stimolanti le colonie macrofagiche-granulocitiche (GM-CSF) promuove (i) la migrazione delle cellule staminali derivate dal midollo osseo nel muscolo cardiaco infartuato, e (ii) la proliferazione delle cellule staminali derivate dal midollo osseo o i precursori cellulari nel muscolo cardiaco per la rigenerazione e il recupero funzionale del cuore dopo un infarto. Inoltre, gli studi nell'uomo hanno evidenziato solo leggeri effetti dopo l'iniezione di G-CSF nei pazienti con infarto acuto del miocardio, nonostante alcuni ricercatori abbiano dimostrato che il lieve miglioramento nell'arteria interessata non è significativo. E' importante segnalare che la sostituzione del miocardio può coinvolgere regioni dove la crescita del muscolo (biogenesi) non avviene a livelli misurabili in condizioni normali.

- Diversi studi hanno dimostrato che il trapianto di cellule staminali derivanti dal midollo osseo è benefico per il trattamento dell'infarto acuto del miocardio e per le malattie croniche delle coronarie.
- Le cellule staminali derivanti dal miocardio e le cellule endoteliali riducono i sintomi clinici come l'angina pectoris e la dispnea (respirazione difficile) e aumentano l'attività quotidiana e migliorano la qualità della vita nelle persone affette da malattie cardiache.
- La stimolazione farmaceutica della formazione del muscolo cardiaco da parte di cellule staminali cardiache endogene potrebbe rappresentare un metodo non invasivo per la riparazione del miocardio.
- La mobilitazione delle cellule staminali dal midollo osseo indotta dalle citochine potrebbe essere una tecnica alternativa per la rigenerazione del miocardio, ma gli studi attuali clinici sul miglioramento delle coronarie per ora sbilanciano a sfavore di questo approccio.

Problemi, riflessioni e questioni aperte

La principale sfida nello sviluppo di qualsiasi terapia a base di cellule staminali è il controllo della migrazione cellulare, della proliferazione e del differenziamento *ex vivo*, come anche *in vivo*; per esempio, l'ottenimento di un'elevata proporzione di precursori cellulari cardiaci commissionati, purificati da altri tipi cellulari non desiderati. Questo è importante per migliorare l'effetto clinico al momento, e anche per il trapianto di queste cellule nell'anziano, che hanno una riserva di cellule staminali ridotta nel midollo osseo. La valutazione degli effetti clinici e sperimentali nei modelli animali o nei trial clinici è difficile, perché sono coinvolti diversi meccanismi in diverse malattie del miocardio.

- Il differenziamento delle cellule staminali cardiache deve essere controllato per assicurare la generazione del tipo cellulare desiderato.
- La generazione di tipi cellulari non desiderati dovrebbe essere evitata.
- Gli studi clinici per rintracciare le cellule staminali e valutare il loro destino cellulare (l'esatta localizzazione ed identità) sono importanti.

Conclusioni

Il dogma, una volta convenzionale, che il cuore non ha le capacità di autorigenerarsi è ora in discussione. Molti trial clinici hanno dimostrato l'effetto benefico della terapia di sostituzione dopo il trapianto di cellule staminali nelle malattie dell'arteria coronaria (4). Altre malattie del cuore probabilmente potrebbero essere trattate con l'aumento di conoscenze dei processi di migrazione e delle vie di segnalazione delle cellule staminali e dei precursori, accanto allo sviluppo di processi di fusione cellulare e l'utilizzo degli ormoni di crescita o di altre molecole di segnalazione nelle vicinanze del tessuto cardiaco.

1. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, *et al.* (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*; 410:701-705.
2. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, *et al.* (2001) Myocardial regeneration after intracoronary transplantation of human autologous stem cells following acute myocardial infarction. *Dtsch med Wschr.* 2001; 126:932- 938.
3. Anversa P, Torella D, Kajstura J, *et al.* (2002) Myocardial regeneration. *Eur Heart J.*; 4 (Suppl. G): G67-G71.
4. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, *et al.* (2005) Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease – the IACT study. *JACC*; 46:1651-1658.

Ricerca sulle cellule staminali nell'endotelio vascolare

- **Stefanie Dimmeler**
- Molecular Cardiology
- Department of Internal Medicine III
- University of Frankfurt, Germany

Introduzione

Il rivestimento interno delle pareti vascolari, l'endotelio, gioca un ruolo cruciale nella prevenzione dell'aterosclerosi e nelle prime fasi della formazione di nuovi vasi sanguigni, dopo l'otturazione dei vasi o la riduzione della perfusione di ossigeno (ischemia). L'integrità del monostrato di cellule endoteliali sembra essere mantenuto dai precursori circolanti di queste cellule, che accelerano la riparazione del rivestimento (ri-endotelializzazione) e limitano la formazione di lesioni aterosclerotiche. I precursori circolanti delle cellule si trovano anche nei siti del danno e contribuiscono alla formazione di nuovi vasi sanguigni.

Il punto della situazione

Cellule staminali/precursori nell'aterosclerosi

L'integrità e l'attività funzionale dell'endotelio gioca un ruolo cruciale nella formazione delle lesioni aterosclerotiche. Il danno in questo tessuto che si verifica per via meccanica (per esempio, espandendo il vaso con un catetere a palloncino o inserendo uno stent semi rigido) o per attivazione della risposta infiammatoria delle stesse cellule endoteliali, induce una cascata di eventi pro-infiammatori che risultano nell'infiltrazione delle cellule immunitarie e nella proliferazione delle cellule muscolari lisce. Questo processo culmina nella formazione delle lesioni aterosclerotiche, che culminano nella rottura della placca e nell'infarto del miocardio (attacco cardiaco acuto), che è ancora la principale causa di morte nel mondo occidentale. Il mantenimento dell'integrità endoteliale, quindi, è di cruciale importanza per prevenire il processo iniziale nell'infarto acuto del miocardio e nelle malattie delle coronarie.

La sostituzione delle cellule endoteliali si pensava avvenisse molto lentamente. Ad ogni modo, l'aumento di evidenze suggeriscono che i fattori di rischio per le malattie delle coronarie aumentano la morte cellulare programmata (apoptosi) delle cellule endoteliali (EC), conducendo ad anomalie del monostrato cellulare dell'endotelio. Scoperte recenti hanno suggerito che il danno endoteliale può essere recuperato mediante precursori cellulari circolanti (1). In accordo a queste scoperte, impianti di Dacron sono stati rapidamente popolati da

particolari cellule staminali emopoietiche derivanti dal midollo osseo. Nell'uomo, la superficie del dispositivo inserito nel ventricolo sinistro per supportare la funzione cardiaca può venire ricoperto da un strato ancora più immaturo di queste cellule. Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato che i precursori endoteliali circolanti possono risiedere in parti esposte dell'arteria dopo il danno indotto da un catetere a palloncino. E' stato dimostrato che le cellule incorporate derivano dal midollo osseo. L'aumento dell'incorporazione di certe cellule derivate dal midollo osseo è associato ad un'accelerazione nella riparazione del tessuto endoteliale e nella riduzione del riassottigliamento dei vasi in seguito all'intervento clinico. Presi nel complesso, questi studi implicano che i precursori endoteliali circolanti contribuiscono significativamente alla riendotelializzazione.

La seguente osservazione è degna di nota: il numero di precursori endoteliali circolanti, che possono avere un'attività anti-aterogena, è significativamente ridotta in pazienti con malattie croniche delle coronarie. I fattori di rischio classici per l'aterosclerosi, come l'età o il diabete, riducono il numero di precursori circolanti, indicando che le persone a rischio di malattia cronica delle coronarie potrebbero avere una capacità di rigenerazione endoteliale ridotta. Questa ipotesi è consolidata da recenti scoperte che hanno dimostrato che la valutazione dei precursori endoteliali circolanti predicono la prognosi di pazienti con malattie croniche delle coronarie (2).

- La circolazione delle cellule staminali derivate dal midollo osseo possono contribuire alla rigenerazione del monostrato endoteliale dopo le lesioni e migliorare la riparazione vascolare.
- I pazienti con malattia cronica delle coronarie mostrano un numero e una funzionalità ridotti dei precursori endoteliali delle cellule staminali.
- La misurazione della quantità di precursori endoteliali potrebbero essere utile nel monitorare i pazienti a rischio di aterosclerosi.

Prospettive

Basandosi sugli studi preliminari che indicano che i precursori circolanti delle cellule staminali contribuiscono ai processi di riparazione endoteliali e hanno un effetto anti-aterosclerosi, si potrebbero definire strategie terapeutiche per aumentare il numero di precursori cellulari circolanti. Inoltre, la misurazione di queste cellule potrebbe essere utilizzata come marcatore

cellulare per predire la prognosi di pazienti a rischio per malattie dell'arteria coronaria.

Problemi, riflessioni e questioni aperte

I programmi di ricerca in corso stanno cercando risposte alle seguenti domande, relative all'identificazione e al contributo dei precursori endoteliali nel trattamento dell'aterosclerosi:

- caratterizzazione e identificazione di diversi precursori cellulari endoteliali. Vari studi forniscono evidenze che i precursori cellulari endoteliali possono essere derivati dalle cellule staminali emopoietiche che esprimono le proteine CD133 o CD34 e usate per identificare e misurare i precursori cellulari endoteliali nell'uomo (per esempio CD34/KDR, CD133/KDR). Comunque, non si esclude che la presenza di cellule progenitrici endoteliali che derivano da altre fonti all'interno del midollo osseo (per esempio le cellule staminali mesenchimatiche, cellule SP) o da altre cellule staminali residenti. Inoltre, gli intermedi mieloidi (cellule che maturando si trasformano in globuli bianchi) potrebbero avere la capacità di contribuire alla riparazione endoteliale. La definizione e la caratterizzazione di questi precursori endoteliali è in fase di studio (3).
- il doppio ruolo dei precursori cellulari. Migliorando la neovascolarizzazione (la formazione di nuovi vasi sanguigni), le cellule progenitrici endoteliali possono anche contribuire alla formazione di vasi nelle placche aterosclerotiche, quindi potenzialmente le destabilizzano (una conseguenza negativa). Nonostante ciò, i trial clinici e gli esperimenti negli animali non confermano un importante effetto pro-aterosclerotico dei precursori endogeni o inoculati. Una valutazione accurata dei possibili effetti collaterali deve essere considerata negli studi successivi.

Cellule precursori e staminali nella formazione di nuovi vasi sanguigni

Gli studi sperimentali indicano che i precursori endoteliali circolanti risiedono in corrispondenza di lesioni e contribuiscono alla neoangiogenesi, facilitando l'apporto di sangue nei tessuti e la riparazione cellulare. In accordo con queste osservazioni, l'introduzione di precursori cellulari da fonti diverse (per esempio sangue periferico, midollo osseo, cellule associate ai vasi, tessuto adiposo, tessuto cardiaco,...) hanno dimostrato di migliorare il recupero dopo l'ischemia (mancanza di ossigenazione in un tessuto). Basandosi su queste scoperte, nel 2001 sono stati iniziati dei trial clinici in fase I per verificare se la terapia cellulare può esercitare un effetto benefico nei pazienti con infarto acuto del miocardio o malattie

dei vasi periferici (4). Questi studi pilota iniziali indicano che l'infusione (basandosi su tecnologie che usano cateteri) o l'iniezione di cellule progenitrici derivate dal midollo osseo o precursori circolanti, migliorano l'apporto di sangue al cuore o alle gambe in pazienti affetti da ischemia.

Il risultato è un miglioramento della funzione cardiaca o la possibilità di fare lunghe passeggiate senza la sensazione del dolore. Nel contempo, questi studi clinici iniziali sono stati confermati da trial randomizzati su larga scala e in doppio cieco, consolidando la scoperta che la terapia cellulare ha un effetto benefico per l'apporto di sangue al cuore.

Mentre un aumento nella formazione di nuovi vasi sanguigni è un trattamento importante per pazienti con ischemia acuta o cronica, un aumento nella formazione di vasi sanguigni nei tumori, da parte di cellule precursori circolanti potrebbe essere dannoso. E' interessante notare che gli studi nei topi in cui le cellule staminali ed emopoietiche non possono essere mobilitate, hanno rivelato una riduzione della crescita tumorale, a supporto dell'ipotesi che i precursori circolanti facilitano la formazione dei vasi sanguigni nei tumori e quindi la crescita tumorale. Nonostante il contributo dei precursori cellulari al tumore sia variabile, il blocco del reclutamento o della mobilitazione potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico per il trattamento dei tumori.

- L'infusione delle cellule derivate dal midollo osseo o dei precursori circolanti migliora la formazione di nuovi vasi sanguigni e l'apporto di sangue ai tessuti ischemici in studi sperimentali e nei trial clinici di fase II e III.
- Il contributo dei precursori endoteliali nella formazione dei vasi sanguigni dipende dal tipo di tumore. La misura dei precursori endoteliali circolanti potrebbe essere utile per monitorare la risposta alla terapia anti-tumorale.

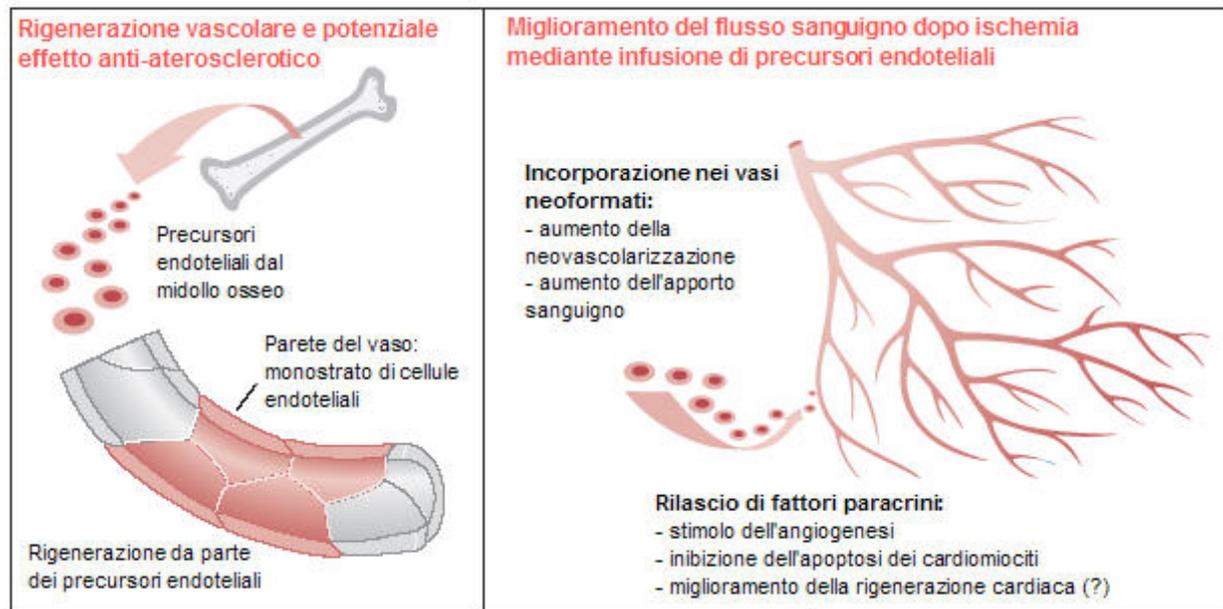


Figura 1. Effetto terapeutico ipotizzabile per l'utilizzo dei precursori endoteliali per il sistema cardiovascolare.

■ Prospettive

L'utilizzo della terapia cellulare per il trattamento delle malattie ischemiche è attualmente in fase di analisi clinica e necessita di essere confermata in trial clinici di larga scala con solidi punti fissi. Al momento sono stati utilizzati per l'angiogenesi terapeutica (formazione dei vasi sanguigni) nei pazienti solo i precursori derivanti dal midollo osseo o circolanti nel sangue. Altre popolazioni di cellule staminali e precursori adulti dovrebbero essere valutate per confronto, per stabilire il trattamento più efficace per le malattie ischemiche. Probabilmente, per migliorare le strategie di terapia cellulare, è necessario sviluppare delle tecniche migliori per aumentare il numero di cellule (per esempio, miglioramento della sopravvivenza cellulare, proliferazione), la capacità di stabilizzare le cellule in determinati punti (per esempio, aumentando l'adesività delle cellule nel tessuto target) e stimolando il tessuto target per facilitare l'acquisizione delle cellule. Ampie evidenze dimostrano che i progenitori cellulari giocano un ruolo nel bloccare la formazione di vasi sanguigni (neoangiogenesi) nei tumori (5). Sono necessari altri studi per chiarire se strategie che interferiscono con la mobilitazione o il reclutamento dei precursori circolanti possa essere utilizzata come approccio terapeutico. In alternativa, la misura dei precursori cellulari potrebbe essere utilizzata per monitorare la risposta dei singoli pazienti alle terapie anti-tumorali (5).

■ Problemi, riflessioni e questioni aperte

In questo momento, il principale ostacolo è relativo all'enorme differenza nell'incorporazione di precursori circolanti nell'endotelio vascolare. Secondo studi sperimentali il tasso di incorporazione di precursori cellulari varia dallo 0 al 100% di nuovi vasi sanguigni nell'ischemia e nei modelli tumorali. L'estensione dell'incorporazione potrebbe dipendere in modo cruciale da modelli sperimentali (per esempio, estensione del danno, tipo di tumore, ecc.) e la fonte di precursori cellulari utilizzata. Ad ogni modo, l'effetto terapeutico della terapia cellulare delle malattie ischemiche potrebbe non dipendere solo dall'incorporazione fisica delle cellule nel rivestimento endoteliale. Potrebbe essere dovuto anche a fattori di crescita rilasciati dagli stessi precursori che, a loro volta, potrebbero promuovere la formazione di nuovi vasi sanguigni e la riparazione dei tessuti in modo paracrino (per esempio, agendo localmente in un tessuto vicino). I precursori possono essere anche incorporati nella parte vascolare (localizzazione perivascolare) invece che nel monostato endoteliale, supportando quindi la stabilità vascolare e la maturazione. Non

è chiaro al momento se il miglioramento nella formazione dei vasi sanguigni indotta dalla terapia a base di precursori o cellule staminali dipenda, invece, dalla "staminalità" di queste cellule o possa essere ottenuta anche con altri tipi cellulari, come quelli che danno origine ai globuli bianchi (linea mieloide).

1. Urbich, C. and Dimmeler, S. (2004) Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*, 95, 343-353.
2. Dimmeler, S. and Zeiher, A.M. (2004) Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med*, 82, 671-677.
3. Ingram, D.A., Caplice, N.M. and Yoder, M.C. (2005) Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*, 106, 1525-1531.
4. Dimmeler, S., Zeiher, A.M. and Schneider, M.D. (2005) Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*, 115, 572-583.
5. Schneider, M., Tjwa, M. and Carmeliet, P. (2005) A surrogate marker to monitor angiogenesis at last. *Cancer Cell*, 7, 3-4.

Ricerca sulle cellule staminali negli epiteli

- **Michele de Luca**
- 1. Department of Biomedical Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy.
- 2. The Veneto Eye Bank Foundation, Epithelial Stem Cell Research Center, Venice, Italy

Introduzione

La medicina rigenerativa, il cui obiettivo è portare al recupero permanente dei tessuti e degli organi danneggiati, è strettamente correlate alla biologia delle cellule staminali. La medicina rigenerativa include la terapia cellulare (un trattamento clinico in cui le cellule staminali sono isolate, solitamente coltivate e trapiantate nei pazienti) e la terapia genica (un trattamento clinico in cui le cellule staminali sono anche modificate geneticamente per curare una malattia genetica). L'autorinnovamento dei tessuti, come quello che avviene per il sangue e gli epiteli, è dovuto ad una popolazione di cellule staminali che sono responsabili della loro formazione e rigenerazione. L'integrità dei tessuti e la loro riparazione dipendono completamente da queste cellule.

Il punto della situazione

I progressi che sono stati compiuti nel comprendere come le cellule staminali epiteliali possono svilupparsi in tessuti come la pelle sono notevoli. Un tipo di cellule staminali dell'epidermide (lo strato protettivo esterno della nostra pelle, che non ha vasi sanguigni) è noto come oloclone ed è già stato dimostrato poter essere un promettente agente terapeutico. Per prima cosa gli olocloni sono multipotenti – per esempio, possono (ri)generare tutti i tipi cellulari dei tessuti di origine. Inoltre, sono in grado di recuperare in modo permanente l'epitelio quando trapiantati in pazienti con danni o difetti epiteliali estesi. Questo è, in parte, derivato dalla proprietà dell'automantenimento: un oloclone umano può essere prelevato dalla pelle e rigenerato per anni dopo il primo trapianto. Queste cellule così speciali non subiscono il consueto processo di accorciamento dei cromosomi che porta all'invecchiamento delle cellule normali e hanno un'incredibile capacità di proliferare. Un singolo oloclone epidermico può raddoppiarsi un numero sufficiente di volte per produrre una superficie epidermica di un essere umano (8×10^{10} cellule). In condizioni appropriate, questi cheratinociti

staminali (che danno origine allo strato rigido di cheratina nella nostra pelle) possono essere tenuti in coltura e usati correntemente in molti protocolli di terapia cellulare, come sottolineato più avanti.

I cheratinociti dell'epidermide umana possono essere cresciuti in laboratorio per dare origine a strati di quello che viene definito epitelio stratificato (la parte esterna della nostra pelle), ed hanno le caratteristiche della pelle normale. I cheratinociti ottenuti dallo stesso paziente che deve essere trattato, i cosiddetti cheratinociti autologhi, sono stati utilizzati in giro per il mondo per rigenerare un epidermide funzionale in pazienti che soffrono di ustioni gravi. L'epidermide umana si rinnova ogni mese. E' stato possibile ottenere in questi pazienti la ripresa della rigenerazione epidermica – con oltre 20 anni di monitoraggio, cioè in oltre 200 cicli di rinnovamento. Questa tecnologia si è dimostrata essere salvavita.

L'epitelio della cornea degli occhi ha dato una grande quantità di informazioni sulle cellule staminali dei cheratinociti. A seconda della loro esatta localizzazione nella cornea o in tessuti adiacenti, hanno diverse caratteristiche e proprietà. Le cosiddette cellule in moltiplicazione transiente continuano a migrare nella cornea da luoghi talvolta distanti alcuni millimetri, in pratica l'equivalente di spingere una persona da una parte di un affollato stadio all'altro, senza gambe! Le ustioni chimiche agli occhi hanno come conseguenza la perdita di un gruppo particolare di cellule al confine tra la cornea (parte trasparente) e la sclera (parte bianca) dell'occhio, le cosiddette cellule del limbus. Sorprendentemente, il danno è riparato da cellule che derivano dalla regione della congiuntiva (la sottile membrana che ricopre la superficie esterna dell'occhio). Questo anomalo processo di cicatrizzazione induce la formazione di nuovi vasi sanguigni, infiammazione cronica e la cicatrice. In questo modo la capacità di vedere dell'occhio può essere fortemente compromessa, fino anche alla cecità. I trapianti allogenici (da donatori) di cornea non hanno buon esito a meno di prendere le cellule del limbus dell'occhio danneggiato e trapiantarle in contemporanea. Questo approccio è stato applicato con successo (il monitoraggio più lungo al momento è di cinque anni dopo l'operazione), ridando la vista normale a pazienti che non avrebbero potuto essere aiutati dalla chirurgia convenzionale.

L'uretra, il tubo in cui l'urina scorre all'interno del pene, è rivestita da un epitelio pluristratificato. In una malattia congenita chiamata ipospadia, l'uretra finisce a livello della superficie ventrale del pene e, in casi estremi (circa il 20%) alla sua base, in pratica l'uretra è totalmente assente. Il trattamento richiede la ricostruzione dell'uretra, generalmente con un autotrapianto (trapianto di tessuto proveniente dallo stesso donatore), fatto ripiegando pelle adiacente o trasferendo la pelle presa da un'altra parte del corpo o, persino, dall'epitelio che riveste la vescica. Questo è talvolta problematico, perché possono crescere peli, si possono avere secrezioni sebacee, calcificazione e persino forature all'interno dell'uretra. Le cellule epiteliali prese da un estremo dell'uretra possono essere cresciute in laboratorio e quindi usate per ricostruire la sessione mancante dell'uretra. Quattordici anni dopo il trattamento, l'epitelio dell'uretra di questi pazienti continua ad essere normale. Questo dimostra che persino quando l'estremo dell'uretra non è localizzato correttamente, mantiene ugualmente cellule staminali in grado di essere utilizzate per la rigenerazione permanente del tessuto epiteliale in siti diversi.

I pazienti che hanno vitiligine o piebaldismo (pelle con ampie e irregolari zone che mancano di pigmentazione) sono stati trattati con successo con i loro stessi melanociti (cellule che producono i pigmenti della pelle) cresciuti in laboratorio. Quando una coltura dei melanociti dei pazienti, mescolata con i cheratinociti, è applicata in un piccolo taglio in una zona affetta della pelle, l'epidermide ricostruita diventa popolata da melanociti e questi restano per almeno sette anni. I melanociti umani normali crescono e si dividono poco in coltura, ma quando crescono insieme con i cheratinociti si riproducono in numero sufficiente per essere trasferiti in ampie aree affette da vitiligine. Quindi, i cheratinociti giocano un indispensabile ruolo accessorio nella ripigmentazione.

- cellule staminali in grado di essere cresciute adeguatamente in numeri enormi in laboratorio possono essere ottenute da diversi tessuti epiteliali
- esistono solide evidenze che le cellule staminali epiteliali coltivate possono rigenerare e riparare i tessuti quando trapiantate nei pazienti
- frequentemente questo approccio permette di ottenere risultati non ottenibili mediante trapianti con chirurgia convenzionale e possono essere salva-vita (per esempio, in vittime delle ustioni).

Prospettive

Lo sviluppo naturale della ricerca sulle cellule staminali dei cheratinociti potrebbe essere: (i) il loro impiego nelle procedure di terapia cellulare

per la rigenerazione di altri epitelii stratificati, per esempio la bocca, la vescica, la vagina e il retto; (ii) lo sviluppo di metodi per riparare difetti genetici nelle cellule prima di reintrodurle nel paziente (le cosiddette terapie geniche *ex vivo*), per esempio per il trattamento di malattie genetiche degli epitelii, come l'epidermolisi bullosa (EB). Le EB sono un gruppo di malattie ereditarie molto gravi, caratterizzate da pelle fragile anche negli strati profondi. Generalmente si riconoscono tre tipi principali di EB, a seconda del livello di mancanza di integrità dei tessuti. L'analisi genetica ha portato all'identificazione di mutazioni in almeno 10 diversi geni espressi nella membrana basale, che spiegano ampiamente lo spettro di gravità osservato nelle EB. Le forme ereditarie di EB colpiscono circa 30000 persone in Europa e circa 400000-500000 persone nel mondo. La gravità della manifestazione clinica dipende dal tipo di EB e può implicare la formazione continua di vesciche in seguito a traumi minori o a cambiamenti di temperatura, perdita di unghie, alopecia (perdita di capelli), protuberanze bianche sulla pelle, bolle intorno alla bocca e alla gola, lesioni all'esofago e problemi respiratori. La mortalità raggiunge l'87% nel primo anno di vita per i bambini con una forma letale di EB giovanile. Non ci sono cure per l'EB al momento e sono in corso trial clinici di fase I e II per la terapia genica *ex vivo* dell'EB giovanile. L'obiettivo è validare le procedure *ex vivo* per la correzione genica delle cellule staminali dell'epidermide in clinica e analizzare punti critici come: (i) la sicurezza generale del trattamento, (ii) la sopravvivenza a lungo termine delle cellule modificate geneticamente, (iii) la risposta immunitaria contro il (nuovo) gene riparato, (iv) la persistenza dell'espressione del nuovo gene. L'applicazione dei protocolli di terapia genica ai cheratinociti del limbus nell'occhio ha portato alla correzione di anomalie genetiche che colpiscono la superficie della cornea, come le distrofie della cornea (malattie dello sviluppo).

- Le cellule staminali cheratinocitiche potrebbero essere usate per riparare o rigenerare altri epitelii pluristratificati.
- L'approccio combinato della terapia genica e delle cellule staminali offre grandi promesse per il trattamento di almeno una delle malattie gravi che colpiscono gli strati profondi della pelle nei bambini
- Nel futuro, lo sviluppo di tecniche per modificare geneticamente le cellule staminali dei cheratinociti potrebbe aprire nuove Prospettive in altri settori della medicina rigenerativa.

Problemi, riflessioni e questioni aperte

Sono passati circa trent'anni da quando è stato scoperto un metodo per crescere in modo artificiale un grande numero di cheratinociti dell'epidermide umana a partire da una piccola biopsia della pelle. La procedura è spesso efficace, ma il tasso di fallimenti resta abbastanza elevato. Il successo dipende in primo luogo dalla qualità delle colture usate per preparare i trapianti. Questo significa che le colture devono contenere un numero sufficiente di cellule staminali cheratinocitiche per la rigenerazione dell'epidermide. Una volta che questo obiettivo sarà raggiunto, e solo allora, il resto del lavoro sarà messo nelle mani dei chirurghi. In assenza di un numero adeguato di cellule staminali, il fallimento della rigenerazione epiteliale è inevitabile e non causerà solo sofferenza nelle persone e la perdita di vite umane, ma anche una confusione generale su quali sono i risultati che ci si può attendere.

Nel campo farmacologico, la qualità e la sicurezza sono spesso imposte per regolamentazione da enti deputati. Questo è comprensibile, dal momento che un farmaco è normalmente un prodotto chimico ben definito. Una cellula vivente, invece, è un'entità complessa. Infatti, nel settore della medicina rigenerativa, la qualità e la sicurezza dovrebbero essere considerati aspetti separati. Ovviamente non è desiderabile trasmettere malattie o esporre i pazienti a composti tossici derivanti da colture cellulari, per cui sono necessari dei controlli di sicurezza appropriati. Comunque, i controlli di qualità che assicurano la conservazione delle caratteristiche di cellule staminali in coltura dovrebbero essere ugualmente obbligatori. I controlli di sicurezza possono essere identici per la coltivazione di tutti i tipi di cellule, ma per quanto riguarda i controlli di qualità, devono essere diversi per ogni tipo di cellula.

La coltivazione delle cellule staminali dei cheratinociti da nuove colture, la proposta di nuovi sistemi di coltivazione e/o nuovi sistemi di veicolazione di cheratinociti autologhi destinati al recupero permanente di difetti epiteliali che interessano vaste aree, dovrebbero prescindere: (i) dalla dimostrazione diretta della presenza di olocloni in coltura, (ii) dall'analisi periodica della clonalità di un ceppo di cheratinociti di referenza (sia in termini di capacità di replicarsi automantenendosi, sia in termini di potenzialità di crescita), (iii) dalla valutazione della percentuale di colonie abortite durante la coltivazione, (iv) quando applicabile (come nel caso delle colture umane dal tessuto della cornea), dalla valutazione dell'espressione di marcatori degli olocloni. Questi controlli di base della qualità dovrebbero eliminare un importante pericolo di

incorrere in variabili incontrollabili nella valutazione della performance delle colture epiteliali.

- Le cellule staminali sicure sono un pre-requisito per l'applicazione in medicina, ma la qualità è ugualmente importante e la sua misurazione deve essere controllata in modo specifico per ogni tipo cellulare
- Nuove strutture e metodi per la coltivazione devono essere sottoposti a questi controlli prima che possano essere utilizzati per l'applicazione clinica.

Conclusioni

E' già stato dimostrato il valore delle cellule staminali derivate dagli epiteli per riparare difetti congeniti e altri danni, alcuni dei quali ben oltre i risultati derivati dal trapianto convenzionale di cellule e tessuti. La dimostrazione del principio è attualmente in fase di valutazione per la terapia genica *ex vivo* utilizzando cellule staminali, per riparare anomalie genetiche in cellule di pazienti coltivate *in vitro*, prima di trapiantarle per riparare la lesione. La prospettiva di un aumento di applicazioni nelle aree già in studio e in altre aree di ricostruzione dei tessuti epiteliali sono buone. Per assicurare la sicurezza dei pazienti, controlli sulla qualità e specificità delle cellule dovrebbero essere imposti dagli enti regolatori e nuove strutture e metodi dovrebbero essere validati attentamente secondo questi controlli.

La ricerca sulle cellule staminali del cervello e del sistema nervoso

- **Jonas Frisé**
- Karolinska Institute,
- Stockholm, Sweden

Introduzione

La ricerca sulle cellule staminali nello sviluppo del sistema nervoso degli adulti è un settore di attività molto attivo. Molti gruppi di ricerca studiano lo sviluppo del sistema immunitario e la scoperta della permanenza di cellule staminali nel cervello adulto, insieme alla continua rigenerazione dei neuroni, hanno attirato un crescente interesse negli ultimi dieci anni.

Esistono due modi concettualmente diversi per utilizzare le cellule staminali per riparare i neuroni: il trapianto di cellule derivate da staminali o la stimolazione della neurogenesi da parte delle cellule staminali endogene. Si tratta di approcci complementari, il cui utilizzo in concomitanza si pensa sia sinergico. Inoltre, è probabile che malattie diverse richiedano trattamenti con strategie specifiche diverse (trapianto di cellule e/o uso del potenziale endogeno).

Il punto della situazione

Il sistema nervoso è formato da un tubo, inizialmente composto di cellule staminali neuronali in grado di dare origine sia ai neuroni che alle cellule di supporto. Le cellule staminali neuronali sono cellule immature che hanno la potenzialità di generare i tipi principali di cellule per il sistema nervoso centrale: neuroni, astrociti e oligodendrociti (1,2). Una altra caratteristica chiave è la capacità di dare origine a nuove cellule staminali, cioè con capacità di autorinnovamento, rendendo possibile la persistenza e l'attività del sistema nervoso. Le cellule staminali neuronali danno origine ad una varietà di cellule non neuronali come, per esempio, cellule muscolari, della cartilagine, delle ossa e cellule pigmentate durante la migrazione nelle prime fasi dello sviluppo delle cosiddette cellule della cresta neurale che originano nel tubo neurale. Una grande quantità di conoscenze relative alla funzione di diversi tipi cellulari e al controllo molecolare delle cellule staminali durante lo sviluppo del sistema nervoso sono state ottenute, per esempio, dagli studi compiuti su moscerini della frutta, topi, scimmie ed embrioni umani. Al momento, abbiamo conoscenze sostanziali sullo sviluppo delle cellule staminali neuronali e sui segnali che controllano la loro generazione in un'ampia

varietà di tipi cellulari diversi. Alcune delle scoperte ottenute sulla segnalazione sono state utilizzate per indurre in cellule embrionali staminali in coltura la trasformazione in tipologie particolari di cellule, le quali si sono dimostrate funzionali dopo il trapianto in modelli animali di malattie umane neurologiche. Lo studio dello sviluppo del sistema nervoso deve essere visto come un grosso successo in termini di aiuto nello sviluppo delle strategie di trapianto delle cellule (vedi oltre qui sotto).

Si è dovuti aspettare gli anni Novanta del Novecento con l'introduzione di nuove tecniche e la dimostrazione inequivocabile da parte di molti laboratori della capacità di produzione di nuovi neuroni nel cervello adulto perché cadesse il dogma che la rigenerazione neuronale non fosse possibile dopo la nascita e il concetto della neurogenesi nell'adulto venisse pienamente accettato. Oggi sappiamo che i nuovi neuroni sono generati durante la vita in regioni discrete del cervello. Molti neuroni, comunque, non sembra che siano sostituiti. In uno studio del 1998, Eriksson e collaboratori hanno dimostrato per la prima volta la neurogenesi nell'ippocampo degli adulti usando la marcatura con BrdU, ma le conoscenze in merito al coinvolgimento di questo processo, sia per estensione che per potenzialità, nelle patologie è ancora molto poco noto nell'uomo. I neuroni generati nell'adulto derivano da cellule staminali o precursori. Le cellule staminali sono notoriamente difficili da identificare a causa del loro fenotipo immaturo o la mancanza di marcatori specifici. Molte ricerche hanno tentato di identificare le cellule staminali nel cervello degli adulti, ma molti dei risultati sono contraddittori. Questo è dovuto principalmente alla mancanza di metodi per identificare le cellule staminali e c'è necessità di sviluppo di nuove strategie per l'identificazione dei diversi stadi nelle linee cellulari *in vivo*.

- Le cellule staminali neuronali danno origine ai neuroni e alle cellule di supporto
- Conoscere lo sviluppo del sistema nervoso ha permesso di indirizzare il differenziamento delle cellule staminali per applicazioni terapeutiche
- I neuroni derivano da cellule staminali situate in aree discrete del cervello adulto.

Prospettive

Esistono due vie concettualmente differenti per utilizzare le cellule staminali per riparare i neuroni: il trapianto di cellule e la stimolazione

della neurogenesi di precursori cellulari o cellule staminali endogene. Sono state candidate diverse patologie neurologiche per la cura con il trapianto di cellule, ma la maggior parte degli studi e dei progressi sono stati fatti per il morbo di Parkinson. I pazienti sono stati trapiantati con tessuti derivanti dal mesencefalo ventrale di feti umani abortiti, contenenti neuroni dopamminergici, i neuroni prevalentemente danneggiati nel morbo di Parkinson, e sono stati ottenuti risultati promettenti (3). In alcuni studi, i pazienti hanno ricevuto un sostanziale beneficio dai trapianti, mentre altri studi sono stati meno incoraggianti o hanno persino evidenziato la presenza di effetti collaterali indesiderati, indicando che è necessario sviluppare ulteriormente questo tipo di strategia terapeutica. Le cellule staminali potrebbero, in teoria, essere una fonte inesauribile di neuroni per i trapianti (4). Si possono considerare diverse fonti di cellule staminali, le più studiate al momento in questo contesto sono quelle embrionali e le cellule staminali neuronali fetali. Studi condotti in animali, utilizzando cellule embrionali staminali o staminali neuronali fetali, hanno supportato il concetto di terapia di sostituzione a base di cellule staminali per il morbo di Parkinson (4). Probabilmente, il beneficio più intuitivo delle terapie a base di cellule staminali per il tessuto neuronale è la sostituzione in caso di perdita di neuroni. Le cellule staminali neuronali potrebbero mediare effetti benefici in modo indiretto agendo sulle cellule residenti. Le cellule staminali neuronali trapiantate possono produrre fattori neurotrofici, che possono promuovere la sopravvivenza dei neuroni o avere effetti immunomodulatori. In ogni caso, il trapianto di cellule staminali nei modelli animali di malattie metaboliche suggeriscono che le cellule staminali o le loro progenie, potrebbero ridurre sostanzialmente l'accumulo di prodotti tossici. Un'alternativa attraente al trapianto delle cellule è l'induzione di cellule staminali o precursori residenti a produrre nuove cellule. Questo approccio potrebbe avere il vantaggio di essere potenzialmente non invasivo e utilizzare le cellule dello stesso paziente, senza necessità di trattamenti immunosoppressivi. Questo potrebbe apparire a prima vista una sfida molto intrigante, in quanto ci sono diversi passaggi da considerare quali la proliferazione cellulare, il differenziamento e la migrazione che devono funzionare in modo appropriato. Comunque, sembra che il tessuto del cervello adulto sia in grado di mantenere i segnali necessari. Inoltre, molti farmaci comunemente prescritti in psichiatria per la neurogenesi, potrebbe contribuire parzialmente all'effetto terapeutico. Forse l'approccio più intrigante per la

neurogenesi è il potenziamento di questo processo nelle regioni che normalmente sono deputate alla neurogenesi. La caratterizzazione delle vie molecolari che normalmente controllano i diversi passaggi per la generazione dei neuroni nel cervello adulto hanno suggerito metodi per aumentare questo processo. Un'importante indicazione del fatto che questo approccio potrebbe essere effettivamente efficace per le patologie neurologiche arriva dagli studi di Nakatomi e collaboratori. Hanno dimostrato che la somministrazione del fattore di crescita dell'epidermide (EGF, dall'acronimo inglese epidermal growth factor) e del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF, dall'acronimo inglese fibroblast growth factor) promuove la proliferazione dei precursori/cellule staminali dal ventricolo laterale, che ha come conseguenza la sostituzione dei neuroni e il recupero funzionale dopo un infarto (5). È importante notare che la sostituzione neuronale sembra comprendere regioni in cui la neurogenesi non avviene a livelli apprezzabili in condizioni normali.

- Molti studi suggeriscono che il trapianto di cellule potrebbe essere efficace per la cura del Parkinson.
- I neuroni derivati dalle cellule staminali embrionali riducono in sintomi in modelli animali di malattie neurologiche.
- Lo stimolo farmacologico della neurogenesi da parte delle cellule staminali endogene offre un approccio non invasivo per il recupero neuronale.

Problemi, riflessioni e questioni aperte

La sfida principale per lo sviluppo di qualsiasi terapia a base di cellule staminali è il controllo del differenziamento cellulare, per esempio per essere sicuri di ottenere il tipo cellulare desiderato, piuttosto che tutti gli altri tipi di cellule del repertorio delle staminali. Questo non è importante solo per ottenere un effetto clinico, ma anche per evitare lo sviluppo di cellule ad elevato ritmo proliferativi e la formazione di tumori.

Molte delle sfide nella ricerca sulle cellule staminali sono comuni in diversi settori. La valutazione degli effetti in modelli di danno del cervello in animali o in trial clinici è spesso incredibilmente complessa nelle malattie neurologiche. Questo a causa dell'ampia variazione interindividuale del recupero spontaneo dopo, per esempio, un infarto e per via della lentezza della dinamica della plasticità neuronale. Un'indicazione di questo sono i costi elevati e l'ampia popolazione coinvolta in casi clinici in neurologia che non sono andati a buon fine.

- Il differenziamento delle cellule staminali neuronali deve essere controllabile in modo da generare le cellule desiderate.
- La generazione di tipologie cellulari non desiderate deve essere evitata.
- Gli studi clinici in neurologia sono difficili e costosi.

Conclusioni

Il cervello è stato tradizionalmente visto come un organo statico con poche possibilità di riparazione. L'aumento vorticoso delle conoscenze sullo sviluppo del sistema nervoso – che è stato tradotto in protocolli per dirigere il differenziamento delle cellule staminali ai fini del trapianto – insieme alla scoperta dell'esistenza delle cellule staminali nel cervello adulto, ha portato allo sviluppo di un crescente ottimismo sul fatto che le terapie di sostituzione possano essere realmente sviluppate per la cura delle malattie neurologiche.

1. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287:1433- 1438.
2. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science* 1997;276:6671.
3. Björklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nature Neuroscience* 2000;3:537-544.
4. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez- Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disordershow to make it work. *Nat Med* 2004;10 Suppl:S42-50.
5. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurones after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002;110:429-441.

La ricerca sulle cellule staminali per il pancreas

- **Helena Edlund**
- Umeå Center for Molecular Medicine
- Umeå University
- Umeå, Sweden

Nell'Unione Europea oltre 30 milioni di persone soffrono di diabete (principalmente di tipo 2), che porta a gravi e costose complicazioni come le malattie cardiovascolari, l'infarto, l'insufficienza renale, la cecità e l'amputazione degli arti. Le previsioni sono per un aumento ulteriore fino a 50 milioni di casi nel 2030. Le due forme più note di diabete – di tipo 1 o giovanile e di tipo 2 o degli adulti – stanno aumentando in modo allarmante. Nel diabete di tipo 1 le cellule beta del pancreas che producono insulina sono distrutte dal sistema immunitario, conducendo ad una parziale o completa mancanza di cellule beta. Il diabete di tipo 2 è dovuto alla resistenza all'insulina e all'insufficienza delle cellule beta ed è strettamente correlato all'obesità. Nelle forme più gravi e avanzate del diabete 2 si osserva anche una perdita massiva di cellule beta. Pertanto, il diabete di tipo 1 e le forme più gravi di diabete di tipo 2 possono ricevere una terapia significativa dalla sostituzione cellulare attraverso il trapianto di cellule beta normali, funzionali e in grado di produrre insulina. Gli sviluppi recenti di nuovi protocolli, in particolare il protocollo noto come Edmonton (1), per prevenire il rigetto e migliorare la vitalità delle cellule beta pancreatiche trapiantate – o delle isole (figura 1) – ha confermato la validità in linea di principio di questo approccio per restaurare il numero di cellule beta funzionali necessarie per normalizzare il livello di glucosio nel sangue e, quindi, per curare il diabete. Questa terapia, ad ogni modo, non è praticabile su larga scala a causa della non disponibilità di un numero sufficiente di isole pancreatiche umane.

Il pancreas è un organo misto, in parte esocrino e in parte endocrino (secerne sostanze nel canale alimentare e nel sangue), in cui la parte esocrina, che produce e secerne una serie di enzimi digestivi, costituisce la maggior parte dell'organo. Le cellule pancreatiche endocrine (circa il 2-3% dell'intero pancreas) sono di quattro tipologie diverse – una delle quali è rappresentata dalle cellule beta che producono l'insulina – e si trovano aggregate nelle isole di Langerhans (dette anche semplicemente "isole" – figura 1). Le cellule beta controllano la concentrazione di

glucosio nel sangue secernendo insulina in risposta all'aumento del livello di zucchero nel flusso sanguigno. Inoltre, le cellule che producono i diversi ormoni nel pancreas formano un'entità integrale, o miniorgano, che assicurano una regolazione fine del livello di glucosio nel sangue in risposta a cambiamenti fisiologici.

- Il diabete si sviluppa come conseguenza della perdita di cellule beta o per l'insufficienza delle stesse ed è in forte aumento in tutto il mondo.
- Le cellule beta che producono insulina sono aggregate con altre cellule endocrine del pancreas in piccoli miniorgani chiamati isole che costituiscono solo il 2-3% dell'intero pancreas.
- Il trapianto di isole è una terapia promettente per il trattamento del diabete ma le isole umane non sono sufficienti.

Il punto della situazione

Tutte le cellule pancreatiche sono di origine cosiddetta endodermica (si originano dal tessuto embrionale da cui si formano i polmoni, il tratto digerente e gli organi correlati). Lo sviluppo morfologico e strutturale del pancreas è stato molto ben caratterizzato, e lo studio dell'espressione genica nel pancreas ha portato all'identificazione di numerosi fattori che caratterizzano i diversi stadi dello sviluppo del pancreas e del differenziamento delle cellule pancreatiche (2). La dissezione genetica dello sviluppo del pancreas nel topo ha fornito informazioni importanti sui meccanismi di base dell'organogenesi pancreatico, sul differenziamento delle cellule esocrine ed endocrine, sulla funzione delle cellule beta e sul mantenimento di un livello normale di zuccheri del sangue (2). Molti studi hanno portato all'identificazione di fattori che sono stati associati, per espressione o funzione, allo sviluppo del pancreas umano e alla funzione delle cellule beta, fornendo evidenze sull'esistenza di una cascata evolutivamente conservata di fattori che controllano lo sviluppo del pancreas e la funzione delle cellule beta.

Un approccio molto interessante per generare un numero sufficiente di cellule pancreatiche per il trapianto è la produzione di cellule beta funzionali a partire da cellule staminali o precursori *in vitro*. Un approccio alternativo potrebbe essere la stimolazione delle divisione cellulare delle cellule beta o la neogenesi *in vivo*. Sono stati provati, o

sono in fase di prova, diversi approcci (3-4) per la produzione di cellule beta produttori di insulina:

- cellule staminali embrionali
- cellule staminali del midollo osseo
- cellule staminali del pancreas dell'adulto
- cellule staminali trans-differenziate
- cellule beta adulte.

Le cellule staminali embrionali sono indubbiamente quelle con maggiore capacità di automantenimento e di pluripotenza tra tutte le altre cellule staminali. Queste proprietà le rendono le candidate principali per le terapie a base di cellule staminali. L'uso delle cellule staminali embrionali per la produzione di cellule pancreatiche ha, comunque, incontrato numerose difficoltà nell'ottenere con certezza l'endoderma da cui origina il pancreas. I progressi recenti, sia sulle cellule staminali embrionali del topo che dell'uomo, stanno permettendo di raggiungere questo obiettivo, stabilendo un passaggio importante verso la prospettiva della produzione di cellule pancreatiche a partire da cellule staminali embrionali.

L'originaria affermazione che le cellule staminali del midollo osseo – che derivano da cellule durante lo sviluppo che appartengono al mesoderma (da cui originano il tessuto muscolare, le ossa e il sangue) – possono differenziare in altre linee cellulari, tra cui quelle che producono insulina, è stata ampiamente confutata da diversi studi indipendenti. Il differenziamento delle cellule staminali del midollo osseo in linee cellulari non mesodermiche è, nella migliore delle ipotesi, dubbio.

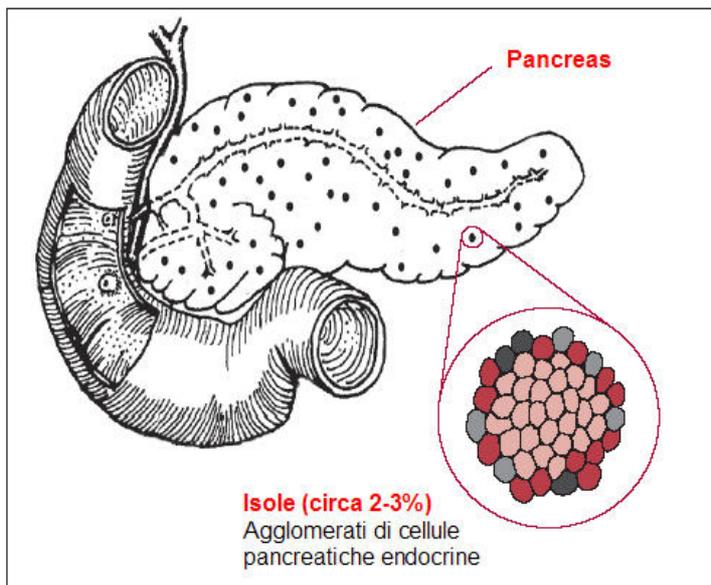
Il pancreas dell'adulto sembra possedere alcune capacità, anche se limitate, di rigenerazione in seguito a malattie come il diabete o la pancreatite, o ad altri tipi di danni tissutali.

Queste osservazioni hanno dato origine al concetto di esistenza di cellule staminali pancreatiche nell'adulto. L'esistenza di queste cellule nel pancreas resta elusivo e uno studio recente (nel topo) ha dimostrato che la formazione di cellule beta *in vivo* nel topo adulto, in seguito alla rimozione del pancreas, deriva dalla semplice duplicazione delle cellule beta. Il trans-differenziamento di cellule adulte non beta è stato suggerito come metodo alternativo con cui si formano nuove cellule beta.

Il fegato è correlato, dal punto di vista dello sviluppo, al pancreas e ha importanti capacità di rigenerazione. Conseguentemente, molti ricercatori hanno cercato di capire se fosse possibile il trans-differenziamento delle cellule epatiche in cellule pancreatiche, sia nel topo che nell'uomo. Con questo approccio, è stata osservata l'attivazione di un numero limitato di geni pancreatici, sia *in vivo* che *in vitro*. L'efficacia e la riproducibilità di questo approccio necessita di essere ulteriormente indagata e il trans-differenziamento cellulare deve essere rigorosamente caratterizzato a livello molecolare e funzionale.

Una fonte alternativa nell'adulto di cellule beta potrebbero essere le stesse cellule beta. Studi svolti da ricercatori indipendenti hanno suggerito che cellule beta isolate possono essere espanse in seguito a de-differenziazione, quindi indotte a ri-differenziare nuovamente in cellule beta. Però, le cellule risultanti producono bassi livelli di insulina e non è ancora chiaro quale sia la vera origine delle cellule espanse. Di nuovo, l'efficacia e la riproducibilità di questo approccio necessitano di essere rigorosamente analizzate.

- La dissezione genetica dello sviluppo del pancreas nel topo ha generato informazioni



Ormoni prodotti dal pancreas endocrino	
● cellule α	→ glucagone
● cellule β	→ insulina
● cellule δ	→ somatostatina
● cellule PP	→ polipeptide pancreatico

chiave in merito ai fattori che controllano il differenziamento delle cellule pancreatiche.

- Diverse fonti di cellule staminali pancreatiche per la generazione di cellule beta sono attualmente in fase di studio.
- Le recenti scoperte che permettono di ottenere endoderma dalle cellule staminali embrionali rappresentano un passo molto importante verso la produzione di cellule beta a partire da cellule staminali embrionali.

■ Prospettive e questioni aperte

L'utilizzo di cellule staminali per la generazione di cellule beta che producono insulina è di grande interesse, ma resta un'illusione piuttosto che un fatto fin tanto che non siamo in grado di produrre cellule completamente funzionali in modo efficiente e riproducibile *in vivo* o *in vitro*. Ad oggi le cellule beta non sono ancora state ottenute da cellule staminali o precursori cellulari. La ricerca attuale sulle cellule staminali, in particolare gli sviluppi recenti in merito al differenziamento *in vitro* delle cellule staminali è incoraggiante, ma la prospettiva di un differenziamento totale *in vitro* o *in vivo* di cellule beta è ancora parte del futuro. Data la stretta interazione delle cellule pancreatiche endocrine e la fine regolazione della secrezione ormonale in risposta al livello di zucchero nel sangue, una domanda importante è se la generazione di cellule beta che producono insulina sia di per sé sufficiente per assicurare l'omeostasi del glucosio, o se sia necessario ricreare l'intera isola pancreatica con tutte le cellule endocrine integrate fra di loro.

Un aspetto ugualmente importante per la prospettiva della cura del diabete mediante terapia cellulare di sostituzione è il rigetto immunologico. Come per ogni altro tipo di trapianto, sia nel diabete 1 che nel diabete 2 si riscontra alloimmunità, cioè rigetto immunologico di cellule o organi estranei. Inoltre, la causa primaria del diabete di tipo 1 è l'autoimmunità: il sistema immunitario dell'organismo distrugge le proprie cellule beta del pancreas. Questo significa che anche le cellule beta derivate dai precursori cellulari o dalle cellule staminali del paziente sono suscettibili di attacco o distruzione dopo l'impianto. Quindi, il successo delle terapie basate sul semplice trasferimento cellulare dipenderà dallo sviluppo di farmaci immunosoppressivi migliori.

- Nella terapia basata sul trapianto di cellule staminali per il diabete non è chiaro se le cellule beta da sole siano sufficienti o se sia necessario l'impianto di isole complete e funzionali.

- Anche se il trapianto autologo divenisse una realtà, il problema di come proteggere le nuove cellule beta dalla distruzione autoimmunitaria deve essere risolto.

■ Conclusioni

La sostituzione cellulare è un approccio molto interessante per il trattamento e la cura del diabete. Esistono già dimostrazioni della validità del principio per la cura del diabete: il trapianto di isole ha permesso a molti pazienti di smettere di praticarsi iniezioni di insulina. Affinché possa diventare una terapia totalmente funzionale devono essere ulteriormente ottimizzati i protocolli immunosoppressivi e deve essere aumentata la disponibilità di cellule che producono insulina per il trapianto. In generale, l'uso di cellule staminali o precursori cellulari come fonte di terapie per la sostituzione di cellule beta potrebbe offrire un inesauribile fonte di cellule trapiantabili. Però, questo dipende da due fattori importanti: i) l'uso di appropriati marcatori che permettano la classificazione dei diversi stadi di differenziamento cellulare (l'insulina è solo una di molti marcatori chiave che caratterizzano le cellule beta funzionali), e ii) la conoscenza dei fattori chiave nella segnalazione – e la loro attività sequenziale – che operano nei diversi stadi del differenziamento che guida le cellule verso la forma matura. Come già anticipato, lo studio dello sviluppo del pancreas nei modelli animali ha prodotto diverse informazioni importanti per entrambi questi aspetti, e continuerà a farlo. Le informazioni ottenute in questo modo devono essere integrate con la nostra conoscenza sullo sviluppo del pancreas, sul funzionamento e il differenziamento delle cellule beta, per assicurare criteri stringenti sullo studio di marcatori dell'espressione genica e sulla funzionalità siano usati nella valutazione delle cellule beta derivate da precursori o cellule staminali. Qualsiasi sia il modo con cui questi criteri saranno raggiunti, per essere clinicamente utili in sostituzione delle attuali terapie, le cellule devono secernere insulina completamente processata in risposta a concentrazioni fisiologiche di glucosio.

- Il differenziamento *in vitro* dei precursori cellulari o delle cellule staminali rappresenta una fonte interessante per la produzione di cellule beta che producono insulina.
- Le cellule beta derivate dalle cellule staminali devono essere rigorosamente caratterizzate per assicurare la funzionalità; l'insulina da solo non costituisce un marcatore delle cellule beta. L'identificazione di fattori che dirigono la generazione di vere cellule beta durante lo sviluppo è un punto critico per lo sviluppo di

tecniche per la produzione di cellule beta da cellule staminali.

1. Shapiro, A.M. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 343:230-238, 2000.
2. Edlund, H. Pancreatic organogenesis – developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 3:524-532, 2002.
3. Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. New sources of pancreatic β -cells. *Nature Biotechnology* 23:857-861, 2005.
3. Cozar-Castellano, I., and Stewart, A.F. Molecular engineering human hepatocytes into pancreatic beta cells for diabetes therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:7781-7782, 2005.
4. Rukstalis, J.M., and Habener, J.F. Islets break off from the mainland. *Nature Medicine* 12:273-274, 2006.

La ricerca sulle cellule staminali nel muscolo scheletrico

- **Giulio Cossu**
- San Raffaele del Monte Tabor Foundation
- Stem Cells Research Institute (SCRI)
- Milan, Italy

Introduzione

Le malattie che colpiscono in modo specifico il muscolo scheletrico – al contrario di quelle in cui il muscolo scheletrico è interessato solo secondariamente – sono spesso associate a distruzione progressiva delle stesse fibre muscolari, e in molti casi gravi, alla sostituzione progressiva del tessuto muscolare con tessuto fibroso e adiposo. Questo conduce ad una paralisi progressiva ed irreversibile e, alla fine, alla morte del paziente. Come nel caso delle distrofie muscolari (1), un gruppo di diverse malattie, la più comune e devastante delle quali è la distrofia muscolare di Duchenne (DMD), di cui non esiste nessuna terapia efficace.

Come altre distrofie muscolari, la DMD è dovuta ad una mutazione in geni che codificano le proteine che collegano il citoscheletro delle cellule muscolari alle strutture di supporto esterne alla cellula.

Queste proteine formano un'unità composita con altre proteine e la mancanza di un singolo componente conduce alla distruzione dell'intera unità funzionale (a vario grado nelle diverse forme di distrofia) e quindi alla fragilità della membrana muscolare. Durante la contrazione, i difetti della membrana causano l'ingresso del calcio nelle cellule muscolari che sono danneggiate o morte. Queste fibre sono inizialmente riparate o rimpiazzate da cellule satelliti residenti (precursori cellulari di riserva), ma anche queste cellule hanno lo stesso difetto genetico e danno luogo a nuove fibre che a loro volta degenerano. Con il passare del tempo, la popolazione di cellule satelliti si esaurisce, non avviene più la rigenerazione delle fibre e il tessuto è progressivamente rimpiazzato da tessuto fibroso e adiposo. La morte delle fibre muscolari è associata all'infiammazione cronica e gli steroidi anti-infiammatori sono attualmente l'unica terapia disponibile. Però, l'effetto positivo è modesto mentre gli effetti collaterali possono essere molto importanti. La ricerca sulle cellule staminali comprendente la riparazione del gene difettivo prima della reintroduzione nel paziente potrebbe rappresentare una speranza per le

generazione successive di pazienti affetti da DMD.

Il punto della situazione

Fino a tempi recenti, un solo tipo di precursore cellulare miogenico (precursore delle cellule muscolari mature) è stato identificato con sicurezza e parzialmente caratterizzato nelle fibre muscolari postnatali. Descritte per la prima volta nel 1961, le cellule satellite sono state identificate e così chiamate per via della loro posizione "satellite" rispetto alle fibre muscolari, tra la membrana muscolare e la lamina basale che circonda ogni fibra (2). Nei topi adulti sani, queste cellule si trovano in una fase di riposo, con un nucleo molto piccolo e condensato. Se il muscolo subisce un danno, si attivano rapidamente e iniziano a dividersi per generare una progenie che ripara le fibre danneggiate e/o produce nuove fibre per rimpiazzare quelle degenerate. Però, una parte della progenie non differenzia, e assume la posizione di cellula satellite, assicurando la possibilità di rigenerazioni successive in caso di un nuovo danno. Questa possibilità non è infinita: durante il corso della distrofia muscolare, il danno continuo alle fibre muscolari e la degenerazione causa una continua attivazione di cellule satellite. Questa riserva è progressivamente esaurita finché non può più avvenire la rigenerazione muscolare.

Nel 1998 è stato scoperto che il midollo osseo, noto per contenere i precursori delle cellule del sangue, contiene cellule che, a bassissima frequenza, possono partecipare alla rigenerazione del muscolo scheletrico e contribuire alla riparazione delle fibre muscolari o alla rigenerazione (3). La natura di queste cellule è stata inizialmente – e lo è ancora – piuttosto elusiva, ma negli anni successivi la letteratura scientifica è stata inondata da report di differenziamenti non ortodossi di cellule precursori di un tessuto in cellule differenziate di tessuti distanti e non correlati (per esempio, le cellule staminali del sangue possono differenziare in neuroni e viceversa). Questo fenomeno, definito plasticità ha un impatto importante anche al di fuori della comunità scientifica: infatti, la possibilità di indurre il differenziamento di cellule staminali da un tessuto non danneggiato in un tipo cellulare colpito da una determinata malattia, apre una nuova prospettiva terapeutica e apre dei dubbi sulla necessità di investire nella ricerca sulle

cellule staminali embrionali, ma la prospettiva di evitare controverse etiche molto calde che caratterizzano la ricerca sulle cellule staminali embrionali ha avuto una vita molto corta. In realtà, la plasticità è un evento molto raro, spesso – se non sempre – dovuto alla fusione cellulare. Fino a quando non saranno chiariti i meccanismi molecolari e la biologia di queste cellule, la plasticità sarà irrilevante dal punto di vista terapeutico. Nonostante ciò, negli ultimi anni sono state accumulate diverse evidenze sul fatto che diversi precursori cellulari non correlati al muscolo, come quelli dei vasi sanguigni, del tessuto adiposo, del tessuto sinoviale e di quello nervoso, sono in grado di differenziare in cellule del muscolo scheletrico (4). Questo differenziamento avviene a bassa frequenza (in genere meno del 10% del totale della popolazione cellulare) e non necessita di essere indotto da segnali rilasciati da cellule miogeniche *bona fide* (cellule da cui originano i muscoli) o da farmaci che modificano le istruzioni genetiche. Il significato possibile dello sviluppo di questo differenziamento non ortodosso del muscolo è complesso e non ancora compreso a fondo: ma la sua discussione va oltre lo scopo di questo articolo.

- Lo sviluppo, il mantenimento e la crescita muscolare sono conosciuti a fondo e il ruolo delle cellule staminali satelliti nel rinnovare e riparare il muscolo è stato chiarito.
- Le cellule satelliti rimpiazzano le fibre muscolari danneggiate, ma in certe distrofie muscolari le fibre sono distrutte ad una frequenza talmente elevata che la riserva di cellule satelliti, prima o poi, si esaurisce.
- Le cellule staminali di altri tessuti potrebbero avere un valore per la terapia, ma il loro differenziamento è una questione complessa e richiede studi ulteriori.

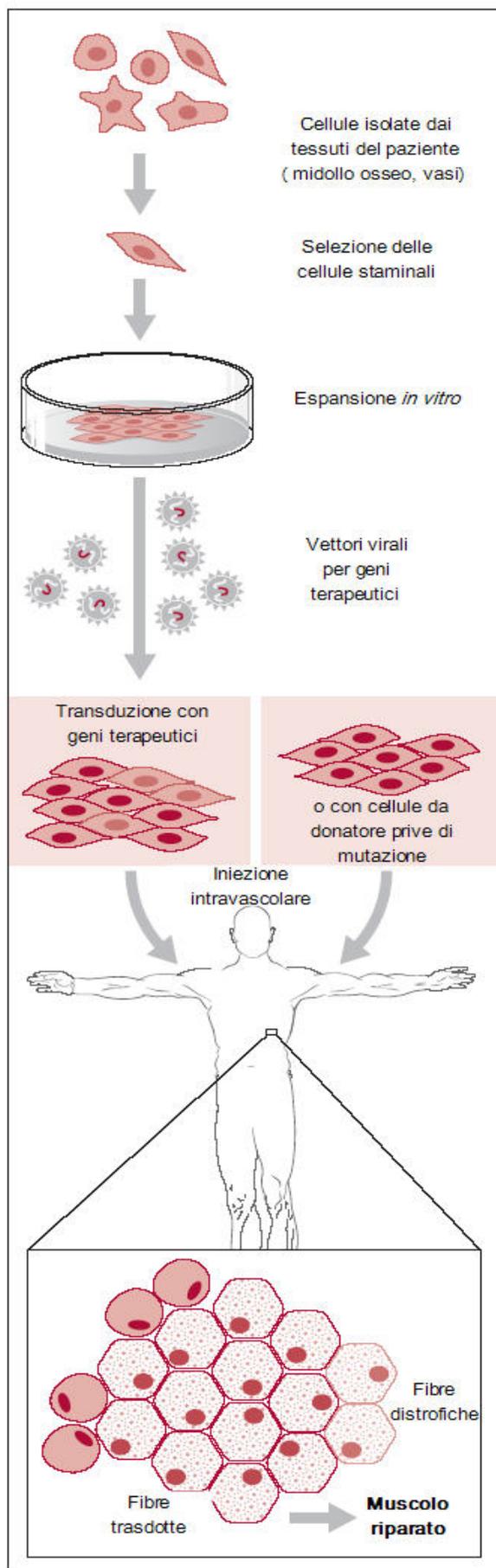
Prospettive

La terapia cellulare attuale per la distrofia muscolare può essere ottenuta sia usando cellule satellite o uno dei precursori cellulari non ortodossi citati in precedenza, le cui caratteristiche positive devono essere valutate attentamente. Quando possibile, le cellule devono essere derivate dallo stesso paziente (autologhe) o da un donatore sano (eterologhe): nel primo caso il gene difettivo deve essere corretto o sostituito per rendere il trapianto efficace; nel secondo caso la correzione del difetto genico non è necessaria ma il paziente deve essere sottoposto a terapia immunosoppressiva per prevenire il rigetto di cellule estranee.

In entrambi i casi, per ottimizzare le probabilità di successo delle cellule staminali per la terapia

della distrofia muscolare è necessario a) isolare le cellule da un sito anatomico accessibile; b) crescerle in laboratorio senza la perdita della capacità di automantenersi e di generare cellule muscolari differenziate; c) introdurre efficientemente il gene riparato (per le cellule autologhe); d) raggiungere il muscolo malato attraverso la circolazione del sangue. Uno schema teorico di questo processo è illustrato nella figura 1. Le cellule possono essere isolate da biopsie del muscolo scheletrico (cellule satellite ma anche vasi), tessuto adiposo, midollo osseo, sinovie e derma.

Le cellule satellite derivate dai pazienti affetti da DMD dovrebbero essere, ovviamente, la prima scelta ma esistono dei problemi che seriamente ostacolano questa strada: sono già esaurite nei pazienti con DMD, non possono attraversare la parete dei vasi – quindi non possono essere introdotte per via sistemica – e, inoltre, non possono migrare dal sito dell'iniezione intramuscolare, per cui richiedono migliaia di iniezioni. Per tutti gli altri tipi cellulari è imperativo fornire evidenze di differenziamento efficiente in tessuto muscolare *in vivo* e *in vitro*, dopo il trapianto in topi distrofici immunodeficienti. Per i progenitori miogenici non standard, ci sono evidenze recenti di efficacia da uno studio che utilizza precursori associati ai vasi nei modelli murini di distrofia muscolare dei cingoli (5). Più di recente, è stato dimostrato che le cellule umane dal tessuto adiposo e dal midollo osseo possono ricostruire il muscolo nei topi distrofici, ma l'estensione della ricostruzione resta da valutare.



La La ricerca sulle cellule staminali probabilmente chiarirà maggiormente l'identità, le caratteristiche biologiche e la relazione tra le linee delle cellule satelliti e di altri precursori cellulari non tipici del muscolo. Nel contempo, i protocolli di terapia cellulare - con benefici derivanti dalla corrente ricerca di base - sono applicati in animali più grandi, come i cani distrofici. Questo metterà a punto (forse in un paio di anni) le linee per i trial clinici in pazienti distrofici. Inevitabilmente, all'inizio i risultati saranno modesti (miglioramenti, più che cure), perché il metodo richiede ottimizzazione. Nei prossimi cinque - dieci anni, se saranno disponibili fondi appropriati (le distrofie muscolari sono rare e di scarso interesse per le aziende), l'ottimizzazione dei protocolli migliorerà il risultato clinico e una cura completa di questa malattia intrattabile e devastante potrebbero essere a vista.

- A meno che non sia risolto il problema del numero limitato di cellule satelliti, i migliori candidati per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne sembrano essere altre cellule staminali mesodermiche, sia residenti nel muscolo o (meno probabilmente) derivate da altri tessuti.
- L'origine di queste cellule, la loro relazione con le cellule satellite, la caratterizzazione e l'abilità di formare muscolo scheletrico dovrebbero essere approfonditi per valutare meglio la loro utilità per la terapia.

Problemi, riflessioni e questioni aperte

Per il trattamento efficace della DMD, resta da calcolare quante cellule vitali possano essere isolate da una biopsia; quasi certamente questo numero non è sufficiente per un trapianto diretto (magari dopo la correzione del gene), per cui l'amplificazione delle cellule in coltura è un passaggio obbligato per ottenere il numero di cellule (miliardi) necessari a trattare i muscoli più importanti del paziente. Durante questo processo le cellule potrebbero diventare senescenti (invecchiare), quindi smettere di proliferare e differenziare. Questo può succedere più facilmente per cellule satelliti derivate da un paziente distrofico, dal momento che potrebbero aver già esaurito le loro potenzialità proliferative durante i cicli di rigenerazione avvenuti *in vivo*.

Per le cellule derivate dai pazienti, è necessaria la correzione efficace del gene e questo potrebbe essere problematico per il gene molto grande della distrofina, che non può essere inserito in un vettore di trasferimento virale, ma altre strategie molecolari alternative, come i mini-geni o i metodi di salto della mutazione durante la trascrizione, sembrano essere promettenti.

I vettori derivati dai lentivirus sembrano essere molto efficienti nella correzione delle cellule malate, ma il loro uso dipende ancora dall'approvazione dagli enti deputati alla regolamentazione.

Infine, il trasporto fino al tessuto muscolare scheletrico è uno dei problemi tecnici principali che deve essere risolto, soprattutto per le cellule satelliti, che non possono attraversare le pareti dei vasi.

- Una delle principali incognite è se le cellule prese dal paziente e coltivate in laboratorio potrebbero essere sufficienti per crescere e differenziare in modo appropriato nel paziente.
- Sono necessari metodi alternativi ai vettori virali comunemente usati per trasferire il gene corretto nelle cellule del paziente.

Conclusioni

La ricerca biomedica ci ha permesso di conoscere la natura della riparazione e rigenerazione muscolare al punto tale che possono essere iniziati gli esperimenti con cellule staminali correlate al muscolo. L'obiettivo finale è mettere a punto una terapia, o persino una cura completa, per malattie gravi e debilitanti come le distrofie muscolari. E' necessario molto lavoro per capire l'origine e il differenziamento dei tipi diversi di cellule staminali del muscolo per capire l'utilità nella terapia delle distrofie muscolari nell'uomo.

La riparazione dei geni difettivi in queste cellule potrebbe essere una reale possibilità, associata

alla coltura delle cellule in grande numero in laboratorio, per dimostrare la validità del principio nei pazienti in pochi anni. Esistono ancora molti ostacoli da superare, ma la possibilità di combinare in futuro la terapia con cellule staminali con nuovi approcci farmacologici dovrebbe condurre ad un cauto ottimismo sul fatto che l'efficacia clinica potrebbe essere raggiunta in un futuro non troppo distante.

1. Emery, A.E. (2002) The muscular dystrophies. *Lancet* 317, 991-995.
2. Mauro, A. (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biochem. Cytol.* 9, 493-495.
3. Ferrari, G. et al. (1998) Skeletal muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530.
4. Wagers, A. and Conboy, I.M. 2005 Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell* 122:659-667
5. Sampaolesi, M. et al. (2003) Cell therapy of alpha sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301, 487-49

Valutare le potenzialità terapeutiche delle cellule staminali

- **Frank Barry**
- Regenerative Medicine Institute (REMEDI), National University of Ireland
- Galway, Ireland

Introduzione

Negli ultimi cinque anni l'attenzione è stata focalizzata sulle cellule staminali e sul potenziale straordinario che offrono nel trattamento di un numero di malattie attualmente intrattabili. Questa lista è lunga: malattie cardiache, artrite, danno delle corda spinale, infarto, morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, diabete, cancro e disordini del sistema immunitario. Esistono molte evidenze ottenute in studi preclinici che indicano che l'uso delle cellule staminali possa essere efficace. In un piccolo numero di studi sull'uomo, già pubblicati, soprattutto su pazienti affetti da insufficienza cardiaca, suggeriscono anche che le cellule staminali potrebbero rappresentare una speranza per i pazienti. A questo punto, si è aperta una visuale piuttosto ottimistica sulla terapia a base di cellule staminali e sulla probabilità che questa sarà efficace in un ampio spettro di malattie.

Questo ottimismo è prematuro, perché l'esperienza con le cellule staminali nell'uomo è ancora molto limitata. Molti progetti di ricerca sono in corso d'opera in diverse parti del mondo e molti governi hanno deciso di investire grandi proporzioni dei loro budget in ricerca e sviluppo per la ricerca sulle cellule staminali. Ora è un buon momento per posizionare la terapia sulle cellule staminali in una prospettiva realistica ed esaminare l'accuratezza scientifica e degli approcci clinici attuali. La tecnologia delle cellule staminali offre diverse opportunità per lo sviluppo commerciale su ampia scala ma ci sono ostacoli che devono essere superati per veicolare prodotti cellulari di successo.

Molte caratteristiche delle cellule staminali le rendono uniche in confronto con altre cellule di mammifero. Per prima cosa, esistono cellule specializzate che mancano di caratteristiche tessuto-specifiche e che sono in grado di mantenere il fenotipo indifferenziato fino all'esposizione ad appropriati segnali. In secondo luogo, hanno la capacità per un autorinnovamento esteso. In terzo luogo, sotto l'influenza di un segnale biologico specifico, possono differenziare in cellule specializzate con diverse caratteristiche e funzioni. Le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo sono

aderenti a questa definizione. Queste cellule, come indica il nome, sono precursori delle cellule della linea mesenchimale (termine che indica un particolare strato di tessuto nell'embrione in fase di sviluppo), tra cui cartilagine, tessuto osseo, grasso, muscolo e tendini. Sono facilmente isolabili dal midollo osseo e dal tessuto adiposo (grasso) e da molte altre fonti. A questo punto, abbiamo a disposizione una conoscenza abbastanza completa della regolazione del differenziamento, del commissionamento e della plasticità di questa popolazione di cellule. Possiamo identificare un numero di segnali che attivano le cellule per differenziare in specifiche linee cellulari e che possono essere descritte come fenotipo di cellule completamente differenziate, ma conosciamo poco degli stati intermedi. E nemmeno siamo in grado di comprendere il trans-differenziamento (la trasformazione di un tipo cellulare in un altro) o la capacità delle cellule di differenziare orizzontalmente da una linea cellulare all'altra.

Inoltre, c'è poca conoscenza intorno alle nicchie, o microambienti tessuto-specifici, in cui risiedono le cellule staminali. Nonostante la carenza di conoscenze su queste cellule e della loro storia naturale, è presumibile che abbiano delle potenzialità terapeutiche in un'ampia varietà di applicazioni cliniche. Le cellule staminali mesenchimali possono essere isolate da piccole quantità di midollo osseo e cresciute in laboratorio. Lo svantaggio di queste, e di altre cellule staminali nell'adulto, è il limite nella capacità di differenziamento, in confronto con quelle embrionali. Il vantaggio è che non pongono dilemmi etici.

Il punto della situazione

Esistono numerosi studi nella letteratura scientifica relativi a risultati di esperimenti sulla veicolazione delle cellule staminali in modelli animali di malattie. In molti casi gli studi sono stati ben condotti, interpretati in modo attento e sottoposti alla revisione stringente che è lecito aspettarsi. In molti casi i risultati hanno suggerito anche possibili effetti benefici per l'uomo. I report recentemente pubblicati indicano anche il miglioramento della funzionalità quando le cellule staminali da midollo osseo sono inserite nella corda spinale dei ratti. Altri studi suggeriscono che, in modelli d'infarto nel ratto, la somministrazione di cellule staminali induce un buon recupero. Gli studi sulla somministrazione

di cellule staminali nei ratti e nei topi, modelli rispettivamente di malattie cardiache/vascolari e artrite, sono in corso d'opera. Risultati preliminari indicano risultati positivi.

Tutte queste ricerca contribuiscono alla rapida crescita della banca dati delle cellule staminali ed è fondamentale che questo lavoro sia supportato e sia permesso il suo proseguimento. E' necessaria cautela, comunque, e c'è ancora una lunga strada davanti. Con qualsiasi terapia in fase di sviluppo, abbiamo bisogno di conoscere a fondo quello che riguarda l'ambiente che circonda le cellule staminali. I buoni risultati ottenuti nei ratti non sono necessariamente trasferibili in buoni risultati nell'uomo. Inoltre, conosciamo quasi nulla sugli effetti a lungo termine delle cellule staminali in un ospite immunocompetente. C'è la possibilità che le cellule staminali possano formare dei tumori o tessuto sbagliato nel posto sbagliato (tessuti ectopici). Al momento, ci sono pochissime evidenze in merito al fatto che queste problematiche possano rappresentare un problema reale, ma bisogna essere cauti e continuare la ricerca con studi a lungo termine disegnati per valutare l'effetto cronico della terapia a base di cellule staminali.

Un'altra area di interesse è la ricerca sul problema dell'esaurimento delle cellule staminali in determinate malattie, specialmente negli anziani. Le cellule staminali presenti nel tessuto adulto agiscono con un preciso meccanismo di riparazione. Sono mobilizzate e diventano attive in seguito al danno tissutale, come risultato di un trauma o di una malattia. Quando un osso si frattura, le cellule staminali nel midollo osseo migrano nel sito del danno, differenziano in cellule ossee e partecipano al processo di riparazione. Alcune malattie degenerative, in cui l'abilità di riparare il tessuto danneggiato è ridotta, potrebbero derivare da una riduzione della popolazione delle cellule staminali o della loro funzionalità. Per esempio, è stato dimostrato che gli individui affetti da osteoartrite cronica, che necessitano di sostituzione totale chirurgica delle giunture, hanno gravi compromissioni nelle cellule staminali del midollo osseo. Altri ricercatori hanno dimostrato che, in topi soggetti all'aterosclerosi, la popolazione di cellule staminali nel sangue è ridotta. Queste osservazioni hanno condotto all'idea che alcune di queste malattie degenerative possano essere causate dall'esaurimento delle cellule staminali. Per ragioni ancora non note al momento, questi individui hanno un ridotto o compromesso funzionalmente della già povera riserva di cellule staminali. Questa teoria, anche se preliminare, è attraente e potrebbe aiutarci a comprendere molto in merito ai meccanismi che stanno sotto lo

sviluppo delle malattie. Se la teoria fosse corretta, si potrebbe suggerire che la terapia a base di cellule staminali, applicata precocemente nella vita, potrebbe ridurre la suscettibilità alle malattie degenerative in un secondo momento.

- Molti studi attendibili hanno dimostrato il beneficio della terapia a base di cellule staminali in modelli animali in una varietà di malattie umane. Questa terapia si è dimostrata essere una promessa in poche applicazioni negli uomini, ma il settore si trova ad uno stadio molto precoce di sviluppo.
- Il differenziamento e la plasticità (la capacità di trasformarsi in altri tipi cellulari) sono solo parzialmente noti, come anche la stabilità a lungo termine delle popolazioni di cellule staminali trapiantate.
- La teoria dell'esaurimento delle cellule staminali, nonostante richieda molta più ricerca, suggerisce una spiegazione per alcune malattie degenerative a livello di rinnovo cellulare.

Prospettive, Problemi, riflessioni e questioni aperte

Assumendo che i dati iniziale che abbiamo ora siano confermati e che non ci siano importanti effetti collaterali correlati alla somministrazione di cellule staminali, è probabile che nei prossimi 5-10 anni vedremo lo sviluppo di importanti aziende commerciali nell'area delle cellule staminali da adulti. Alcune sono già state fondate negli Stati Uniti e in Europa, ma sono ancora di piccola o media dimensione. Se le cellule staminali continueranno a dimostrarsi efficaci nel trattamento degli effetti dell'artrite e delle malattie cardiache, milioni di pazienti potrebbero essere potenzialmente trattati ogni anno.

Prima di questo, alcuni ostacoli importanti devono essere ovviati. Non conosciamo a pieno come la tecnologia delle cellule sia adattabile ad un mercato di questa entità. Inoltre, i metodi attuali per la conservazione a lungo termine e il mantenimento delle cellule staminali richiedono temperature molto basse, in genere ottenute con azoto liquido. Questo pone problemi logistici e la necessità di conoscenze tecniche ed equipaggiamenti adeguati nelle cliniche. Per il momento, questo potrebbe significare che le procedure terapeutiche saranno relegate inizialmente ai principali centri medici.

L'ultimo obiettivo è la capacità di somministrare in modo universale la terapia a base di cellule staminali, a questo scopo la tecnologia deve diventare più semplice e i metodi più accessibili. Un altro serio ostacolo è relativo al siero bovino fetale usato nei terreni di coltura delle cellule in laboratorio. I problemi che sorgono

immediatamente sono: (1) il rischio di trasmissione di agenti infettivi e (2) la dipendenza da industrie che si trovano in aree geografiche limitate. Sono stati fatti molti sforzi nel passato per sviluppare le condizioni di coltura indipendenti dal siero, ma è ancora un settore poco approfondito. Finché questo obiettivo non sarà raggiunto l'utilizzo ad ampio spettro della tecnologia delle cellule staminali non verrà alla luce.

- I metodi di produzione e la capacità di conservare a lungo termine (coinvolgendo esperti nelle cliniche) necessitano di essere scalati per soddisfare la domanda potenzialmente molto ampia.
- Per la somministrazione universale di terapie basate sulle cellule staminali, la tecnologia deve essere semplificata e i metodi di somministrazione devono diventare più accessibili.
- Un mezzo di coltura adeguato, sicuro e ricco di tutti i nutrienti necessari deve essere identificato per la produzione di cellule adeguate al trattamento terapeutico.

Conclusioni

Il settore della ricerca delle cellule staminali necessita di muoversi a passo veloce in modo che le nuove terapie siano disponibili per i pazienti il prima possibile. Al contrario, se i risultati non fossero quelli desiderati, il che è improbabile, i legislatori e gli enti di finanziamento dovrebbero essere messi al corrente di questo il prima possibile. La questione più importante è il sostegno della qualità elevate delle ricerche insieme all'accelerazione dei programmi di ricerca per aumentare la competitività della ricerca sulle cellule staminali in Europa e per condurre a conclusioni chiare e non ambigue.

Chiaramente, il passo della ricerca deve essere aumentato, i fondi per i progetti di alta qualità per la valutazione dei benefici terapeutici delle cellule staminali dovrebbero essere aumentati. Inoltre, l'approccio medico tradizionale dovrebbe essere incorporato maggiormente nella ricerca sulle cellule staminali. Molti trial nell'uomo devono essere completati e si spera che i risultati di questi studi siano promettenti come quelli iniziali. I successi iniziali in studi piccoli, spesso poco controllati, rendono gli studi multicentrici controllati in doppio cieco un metodo di procedere estremamente importante. Ci sono molte ragioni per essere ottimisti in merito alla terapie con cellule staminali, ma sono necessari molta ricerca e molti studi per ottenere dei successi clinici.

Lo sviluppo commerciale delle cellule staminali: in rapporto preliminare di un'azienda che opera negli Stati Uniti

- **Thomas Okarma**
- Geron Corporation
- California, USA

Introduzione

L'obiettivo delle terapie basate sulle cellule staminali embrionali è recuperare la funzionalità degli organi, ridotta in seguito a lesioni o a malattie croniche degenerative. La Geron ha l'obiettivo di realizzare cellule viventi utilizzabili in futuro come farmaci, introducendo cellule funzionali derivate da cellule staminali embrionali umane nell'organo affetto. Stiamo lavorando nel settore delle cellule staminali da oltre dieci anni, basandoci sulla derivazione iniziale delle cellule staminali embrionali umane all'Università del Wisconsin nel 1998 e, quindi, sviluppando molti prodotti candidati per la terapia di diverse malattie.

Le cellule staminali sono generalmente cellule primitive in grado di automantenersi che possono svilupparsi in cellule funzionali e differenziate. Le cellule staminali embrionali umane, che derivano da uno stadio molto precoce dello sviluppo chiamato blastociste, sono uniche nel loro genere perché:

- sono pluripotenti, il che significa che possono svilupparsi in tutte le cellule e tessuti dell'organismo e
- sono in grado di automantenersi e proliferare indefinitamente quando coltivate in condizioni appropriate.

La capacità delle cellule staminali embrionali di dividersi in modo infinito mantenendo lo stato indifferenziato, senza perdere la pluripotenza, è una caratteristica unica che le distingue da tutte le altre cellule staminali scoperte finora nell'uomo. E' stato dimostrato che le cellule staminali embrionali esprimono continuamente la telomerasi, caratteristica delle cellule immortali (1). Altre cellule staminali, come quelle del sangue o dell'intestino, esprimono la telomerasi a livello molto basso o solo periodicamente; quindi invecchiano, limitando il loro utilizzo nella ricerca o nelle applicazioni terapeutiche. Le cellule staminali embrionali umane possono essere espanse in colture senza limiti e, quindi, possono essere conservate e testate per la qualità per la produzione su ampia scala (2).

Abbiamo sviluppato un metodo per crescere, mantenere e scalare la produzione di cellule staminali embrionali umani indifferenziata, usando cellule coltivate in assenza di cellule di supporto nel mezzo di coltura (3). Abbiamo anche sviluppato procedure operative per differenziare le cellule staminali in tipologie cellulari rilevanti dal punto di vista terapeutico (4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12). Ora stiamo testando sei diverse tipologie cellulari in modelli animali. In cinque di questi tipi cellulari, risultati preliminari suggeriscono che l'efficacia sia evidenziata da un trapianto durabile o un miglioramento nella funzione dell'organo dell'animale trattato.

Il punto della situazione

GRNOPC1, progenitori gliali per il trattamento dei danni alla spina dorsale

Le cellule neuronali principali del sistema nervoso centrale generalmente non rigenerano dopo un danneggiamento. Se la cellula neuronale è danneggiata in seguito ad una malattia o ad una lesione, attualmente non esiste alcun trattamento per recuperare la funzionalità persa. Milioni di pazienti nel mondo soffrono di danni al sistema nervoso o di malattie associate alla sua degenerazione. In seguito a danni della spina dorsale, i pazienti sono spesso parzialmente o interamente paralizzati perché le cellule di supporto o le cellule neuronali sono state danneggiate e non possono rigenerare. Questi pazienti sono disabili permanenti e possono necessitare l'assistenza a vita.

Abbiamo derivato i precursori degli oligodendrociti dalle cellule staminali embrionali in coltura e li abbiamo testati in modelli animali per determinare se possono o meno recuperare la normale funzione neuronale. Utilizzando un sistema di coltura senza cellule di supporto e con il siero da noi prodotto, abbiamo ottenuto le prime cellule prodotte da partire da cellule staminali embrionali umane, le GRNOPC1, progenitori dell'oligodendrogliia usati per trattare i danni dovuti a traumi acuti della spina dorsale. I risultati di studi per dimostrare la validità del principio – derivati da una collaborazione tra l'accademia e l'industria – sono stati pubblicati nel Journal of Neuroscience (10), 2005. Lo studio ha mostrato che le cellule GRNOPC1 quando sono iniettate nella corda spinale dei ratti in cui è presente una lesione, si osserva ri-

mielinizzazione dell'assone nervoso danneggiato, che evolve nel miglioramento dell'attività locomotrice degli animali che hanno subito il danno rispetto ai controlli. Stiamo attualmente completando il nostro studio preclinico e ci aspettiamo di iniziare a testare queste cellule nei pazienti con danno acuto della spina dorsale nel 2007.

GRNCM1, cardiomiociti per le malattie cardiache

Le cellule muscolari cardiache (cardiomiociti) non rigenerano durante la vita degli adulti. Mentre il muscolo cardiaco è danneggiato da lesioni o dalla diminuzione del flusso cardiaco, il tessuto muscolare in grado di contrarsi è rimpiazzato con tessuto fibroso non funzionale. L'insufficienza cardiaca, come comune conseguenza del danno al muscolo o alle valvole cardiache, colpisce circa 5 milioni di persone negli Stati Uniti. Questo anno, si stima che circa 1,2 milioni di persona hanno avuto un infarto, che è la principale causa di danno del tessuto muscolare cardiaco.

Abbiamo derivato i cardiomiociti umani dalle cellule staminali embrionali umane e abbiamo osservato il loro normale funzionamento durante la contrazione e la risposta ai farmaci per il cuore (4). Abbiamo trapiantato queste cellule in modelli animali e al momento queste cellule sembrano sopravvivere nel miocardio degli animali infartuati, e si osserva anche un recupero della funzionalità (13).

GRNIPC1, cellule delle isole per il diabete

Si stima che esistano circa un milione di americani che soffrono del diabete di tipo 1 (diabete mellito insulino dipendente). In condizioni normali, alcune cellule del pancreas, chiamate cellule beta delle isole, producono insulina che promuove l'assorbimento del glucosio da parte delle cellule dell'organismo. La degenerazione delle isole beta del pancreas ha come conseguenza la mancanza di insulina nel sangue con conseguente sviluppo di diabete. Nonostante i diabetici possano essere trattati con iniezioni quotidiane di insulina, queste possono garantire solo un controllo intermittente dei livelli di glucosio. Come risultato, i pazienti con diabete soffrono di degenerazione cronica di molti organi, inclusi occhi, reni, nervi e vasi sanguigni. In alcuni casi, i pazienti con il diabete sono stati trattati con il trapianto delle isole beta. In ogni caso, la poca disponibilità di fonti appetibili per il trapianto di cellule beta e le complicazioni della necessità di co-somministrare farmaci immunodepressivi, ha reso questo approccio poco pratico per il trattamento di un numero crescente di individui che soffrono di diabete. Abbiamo derivato le cellule beta che producono insulina della cellule

staminali embrionali umane e stiamo lavorando per migliorare la resa di queste cellule e per caratterizzare la secrezione di insulina in risposta al glucosio (12). Abbiamo trapiantato le isole in modelli animali di diabete e al momento le cellule mostrano la presenza di cellule che producono il peptide c (insulina) a tre mesi dal trapianto. Il peptide umano c è stato trovato anche nel siero di questi animali trattati, dopo la stimolazione con alti livelli di glucosio.

Cellule emopoietiche per prevenire il rigetto immunitario

Il sistema ematologico (le cellule circolanti del sangue) sono uno dei rari tessuti dell'organismo umano in grado di rinnovarsi lungo tutta la vita. Nonostante sia complesso e costoso, l'utilizzo del trapianto di cellule staminali del midollo osseo sta aumentando in tutto il mondo. Uno dei principali problemi nella procedura è la mancanza di disponibilità di donatori di midollo osseo compatibili, che limita in modo importante il numero di pazienti che può essere trattato con il trapianto. Abbiamo derivato delle cellule staminali da quelle embrionali umane e le abbiamo testate in modelli animali di trapianto del midollo osseo, osservando un trapianto stabile (11). Le cellule staminali emopoietiche, e alcuni tipi di cellule dendritiche, prodotte a partire dalle cellule staminali embrionali umane potrebbero trovare impiego non solo nella terapia di trapianto in campo ematologico ma anche in procedure per prevenire il rigetto immunitario di altre cellule trapiantate derivate sempre dalle staminali embrionali umane. La co-somministrazione delle cellule tollerogeniche derivate dalle staminali embrionali potrebbero educare il sistema immunitario del ricevente ad accettare le cellule terapeutiche senza rigettarle.

Epatociti per la scoperta di farmaci e per l'insufficienza epatica

Molti farmaci putativi falliscono nei trial clinici a causa della loro tossicità epatica o perché non sono assorbiti in modo sufficiente, o distribuiti in modo adeguato o il composto attivo è eliminato troppo rapidamente dall'organismo. La maggior parte dell'efficacia e sicurezza di un farmaco dipende da come è metabolizzato in una forma attiva o inattiva e dagli eventuali metaboliti tossici che possono essere generati durante questo processo. Gli epatociti, le cellule più importanti del fegato, metabolizzano la maggior parte dei composti e possono essere usate per predire molte caratteristiche farmacologiche di un farmaco.

Non esistono sistemi completamente efficaci disponibili oggi per predire accuratamente il metabolismo o la tossicità di un composto per l'uomo. Lo sviluppo di diversi farmaci è stato interrotto tardivamente, nei trial clinici, perché i

sistemi dei roditori utilizzati nelle fasi iniziali del processo di sviluppo non sono stati in grado di predire la tossicità dei farmaci per l'uomo. Le linee cellulari di epatociti attualmente disponibili non hanno le stesse caratteristiche della loro controparte normale nell'organismo e possono essere trasformate in modo da poter mantenere la capacità di proliferare in coltura. L'accesso a tessuti epatici primari umani freschi per l'utilizzo in studi di tossicità è molto limitato e sottoposto ad elevata variabilità che può essere osservata a seconda del donatore individuale, il tempo e il processo di raccolta e le condizioni di coltura per gli esperimenti.

Stiamo sviluppando metodi per derivare epatociti funzionali standardizzati (cellule del fegato) da cellule staminali embrionali umane per rispondere alle necessità non ancora soddisfatte per predire il metabolismo, la biodistribuzione e la tossicità di candidati farmaci in via di sviluppo (8). Queste cellule potrebbero fornire un numero consistente di cellule umane epatiche che potrebbero, con buona probabilità, predire se un nuovo farmaco potrebbe influenzare il fegato del paziente che lo assume o potrebbe essere metabolizzato. Stiamo anche valutando l'utilizzo di queste cellule in modelli animali di insufficienza epatica.

Problemi, riflessioni e questioni aperte

A causa della riduzione dei fondi governativi negli Stati Uniti, lo sviluppo di prodotti a base di cellule staminali embrionali umane avviene primariamente nell'industria e non nelle università. Al contrario di altre rivoluzionarie e paradigmatiche tecnologie, come il DNA ricombinante o gli anticorpi monoclonali, che sono stati ampiamente studiati nei laboratori universitari prima di essere sviluppati dall'industria, la ricerca sulle cellule staminali embrionali umane e lo sviluppo dei prodotti è attualmente sottosviluppato nel settore biotecnologico americano. L'aumento della collaborazione tra industria ed università e l'applicazione di programmi quadro che finanziano la ricerca accademica sulle cellule staminali embrionali sono priorità impellenti prima che anche il mondo accademico europeo si ritrovi permanentemente dietro quello industriale, come sta avvenendo negli Stati Uniti.

- La posizione dell'Ufficio Brevetti Europeo (EPO) sulla brevettabilità delle cellule staminali embrionali umane è contrastante a quella della maggior parte del resto del mondo – persino degli Stati Uniti – a causa di obiezioni morali. Questa posizione dovrebbe essere revisionata il prima possibile se l'Unione Europea vuole attrarre seriamente la

presenza di industrie interessate alla ricerca sulle cellule staminali embrionali umane sul suo territorio. La Corte di Appello Allargata dell'EPO dovrebbe risolvere questo problema rapidamente.

- Un clima politico non unificato ha prevenuto la nascita di infrastrutture tecniche per supportare, caratterizzare e disseminare la tecnologia delle cellule staminali embrionali umane in Europa. Questo dovrebbe (1) essere una risorsa centrale per la caratterizzazione e il mantenimento delle linee cellulari (una banca di cellule staminali embrionali umane); (2) un meccanismo consolidato per condividere la conoscenza, le linee cellulari, i reagenti e che migliorano la collaborazione tra i laboratori, tra e all'interno di tutte le nazioni membri dell'Unione Europea; (3) una risorsa di finanziamento dedicata alla realizzazione di corsi di formazione e all'erogazione di borse di studio per la formazione di ricercatori sulla biologia delle cellule staminali embrionali umane; e (4) la definizione degli standard in sede regolamentare, lo sviluppo clinico e la registrazione valida in tutta l'Unione Europea, e non una procedura da applicare paese per paese.
- Dovrebbe essere favorito un programma di educazione pubblica in tutta l'Unione Europea sull'impiego delle terapie basate sulle cellule staminali per il trattamento di malattie croniche, in modo da evitare quello che è accaduto con i cibi OGM.

Conclusioni

Le cellule staminali embrionali umane rappresentano un'importante finestra nella nostra battaglia contro le malattie croniche e il danno tissutale. La tecnologia offre per la prima volta, a basso costo, un modo scalabile per realizzare un grande numero di cellule viventi per sostituire le cellule e ripristinare la funzione di quasi tutti gli organi del corpo colpiti da malattia cronica o danno. Sono necessarie leggi e regolamentazioni che siano in grado di favorire lo sviluppo di questo potenziale in tempi brevi. I costi sociali ed economici delle malattie croniche nella nostra popolazione, sempre più fatta di anziani, non chiede niente di meno.

1. Lebkowski, J., Gold, J., Xu, C., Funk, W., Chiu, C., Carpenter, M. (2001). Human Embryonic Stem Cells: Culture, Differentiation, and Genetic Modification for Regenerative Medicine Applications, *The Promise of Cellular Therapy*, *The Cancer Journal*, Vol. 7(2):S83-S93.

2. Rosler, E., Fisk, G., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M., Carpenter, M. (2004). Long-Term Culture of Human Embryonic Stem Cells in Feeder-Free Conditions, *Developmental Dynamics*, 229:259- 274.
3. Xu, C., Rosler, E., Jiang, J., Lebkowski, J., Gold, J., O'Sullivan, C., Delavan-Boorsma, K., Mok, M., Bronstein, A., Carpenter, M. (2005). Basic Fibroblast Growth Factor Supports Undifferentiated Human Embryonic Stem Cell Growth without Conditioned Medium, *Stem Cells*, Vol. 23:315-323.
4. Xu, C., Police, S., Rao, N., Carpenter, M. (2002). Characterisation and Enrichment of Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells, *Circulation Research*, Vol. 91:501-508.
6. Carpenter, M., Inokuma, M., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C., Rao, M. (2001). Enrichment of Neurons and Neural Precursors from Human Embryonic Stem Cells, *Experimental Neurology*, Vol. 172:383-397.
7. Sottile, V., Thomson, A., McWhir, J. (2003). *In vitro* Osteogenic Differentiation of Human ES Cells, *Cloning and Stem Cells*, Vol. 5(2):149-155.
8. Rambhatla, L., Chiu, C., Kundu, P., Peng, Y., Carpenter, M. (2003). Generation of Hepatocyte-Like Cells from Human Embryonic Stem Cells, *Cell Transplantation*, Vol. 12:1-11.
9. Nistor, G., Totoiu, M., Haque, N., Carpenter, M., Keirstead, H. (2004). Human Embryonic Stem Cells Differentiate into Oligodendrocytes in High Purity and Myelinate After Spinal Cord Transplantation, *GLIA*, Vol. 49(3):385-396.
10. Keirstead, H., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., Steward, O. (2005). hESC Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury, *Journal of Neuroscience*, Vol.25(19)4694-4705.
11. Wang, L., Menendez, P., Shojaei, F., Li, L., Mazurier, F., Dick, J., Cerdan, C., Levac, K., Bhatia, M. (2005). Generation of Haematopoietic Repopulating Cells from Human Embryonic Stem Cells Independent of Ectopic HOXB4 Expression, *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 201(10):1603-1614.
12. Jiang, J., Eshpeter, A., Fisk, G., Au, M., Lovelace, P., Lebkowski, J., Korbitt, G., Majumdar, A. Human Embryonic Stem Cells to Pancreas Differentiation: A Three-Stage Protocol to Generate Producing, Glucose Responsive Cell Clusters *via* Pancreatic Endoderm, *Keystone Symposia 2006 Abstract Book, Abstract 215, and Taos, New Mexico*.
13. Laflamme, M.A., Gold, J., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., Schurb, K., Chen, K., Minami, E.A., Gill, S., Ueno, S., Muskheli, V., Murry, C.E. "Cardiac Applications For Human Embryonic Stem Cells" 2nd World Congress International Academy of Cardiovascular Science, 2006 Book, Abstract 691, Sapporo, Japan

La prospettiva di una organizzazione internazionale di pazienti

- **Robert Goldstein**
- Chief Scientific Officer
- Juvenile Diabetes Research Foundation International (JDRF)
- New York, United States of America

Introduzione

La Fondazione per la Ricerca sul Diabete Giovanile (JDRF, dall'acronimo inglese) è una fondazione senza fini di lucro, non governativa che ha sede negli Stati Uniti. E' stata fondata oltre trenta anni fa da genitori di bambini affetti da diabete di tipo I e la sua missione è stata costante, per trovare una cura per il diabete di tipo 1 e le sue complicazioni, attraverso il supporto alla ricerca. La JDRF sostiene economicamente la ricerca sul diabete in tutto il mondo ed è la principale fonte di finanziamento nel mondo in questo settore. Nel 2005 ha impiegato oltre 98 milioni di dollari per sostenere la ricerca in 19 paesi (di cui circa 25 milioni di dollari sono stati impiegati in Europa). Oltre a raccogliere fondi per la ricerca, la JDRF gioca un ruolo importante nella promuovere pubblicamente i temi importanti per le persone affette da diabete.

Il punto della situazione

Il diabete di tipo 1 è una malattia immunitaria caratterizzata dalla distruzione delle cellule beta del pancreas, che producono l'insulina, da parte del sistema immunitario. Le iniezioni di insulina non sono però una vera cura, perché persino i pazienti che si sottopongono ad un trattamento estremamente accurato possono sperimentare le complicazioni del diabete. Il diabete di tipo 1 è riconducibile al 5-10% di tutti i casi diagnosticati di diabete, ma è la causa principale del diabete nei bambini (1). L'International Diabetes Federation stima che nel 2003, 48,4 milioni di Europei saranno affetti da diabete (sia di tipo 1 che 2), circa il 7,8% della popolazione prevista (2). Questo va di pari passo con la stima del 7% della popolazione americana che aveva il diabete nel 2005 (circa 20,8 milioni di adulti e bambini) (3). L'impatto economico del diabete è significativo, i costi sanitari diretti annuali in tutto il mondo (nel 2003) sono stati almeno di 153 milioni di dollari. In Europa, le complicazioni del diabete costituiscono circa il 5-10% di tutta la spesa totale per la salute (4). Il numero di persone affette da diabete è previsto aumentare

in tutto il mondo, con l'aumento corrispondente dei costi sanitari.

La JDRF è una delle prime fondazioni non profit che agiscono in tutto il mondo per supportare pubblicamente la ricerca sulle cellule staminali embrionali umane, con la stesura della carta delle intenzioni e lo statuto pubblico nel Dicembre del 1998. Le motivazioni iniziali possono derivare dalla possibilità che la ricerca sulle cellule staminali embrionali umane potrebbero condurre alla scoperta di nuovi metodi per sviluppare un numero illimitato di cellule beta che producono insulina (6), e con la speranza che tutte le persone affette da questa malattia possano essere curate. Questo è stato annunciato in modo importante nel luglio del 2000, con la comunicazione da Edomonton, Canada (7), del successo del trapianto di isole umane pancreatiche in sette persone affette da diabete di tipo 1, con ipoglicemia disabilitante e problemi di trattamento della malattia con la terapia tradizionale. Questo risultato così eclatante ha consolidato la validità del principio che il trapianto di isole può migliorare significativamente il diabete di tipo 1 e ha fornito basi scientifiche per la speranza di sviluppo di terapie di sostituzione cellulare per il trattamento e la cura del diabete di tipo 1. Da quel momento, la JDRF ha creato un portfolio di ricerche che sostengono sia la ricerca sulle cellule staminali umane che animali, e la ricerca che utilizza le linee di cellule staminali derivate da fonti embrionali, fetali e adulte. Il finanziamento della JDRF ha sostenuto la derivazione di nuove linee cellulari di cellule staminali embrionali umane, la caratterizzazione delle stesse secondo criteri accettati a livello internazionale, assicurando la disponibilità delle linee cellulari per i ricercatori e anche le ricerche per lo sviluppo di terapie di sostituzione a base di cellule beta, e di altre tipologie cellulari, per il trattamento del diabete e delle sue complicazioni. La JDRF ha ulteriormente ampliato il proprio finanziamento attraverso la creazione di partnership internazionale su ricerche sulle cellule staminali rilevanti per la sua missione. I partner della JDRF fuori degli Stati Uniti per sostenere la ricerca sulle cellule staminali comprendono agenzie di finanziamento in Australia, Canada, Finlandia, Francia, Svizzera, Singapore e nel Regno Unito. La JDRF è tra le principali organizzazioni dell'International Stem Cell Forum (ISCF), costituito per incoraggiare la collaborazione internazionale e il sostegno alla

ricerca sulle cellule staminali. Dal momento che i finanziamenti della JDRF non sono limitati ai confini nazionali, siamo stati in grado di fornire supporto per la cooperazione internazionale. Per esempio, la JDRF sostiene le collaborazioni tra due programmi dell'Unione Europea, l'European Consortium for Stem Cell Research (EuroStemCell) e il Beta Cell Therapy Consortium. Il principale obiettivo di questa collaborazione è migliorare il coordinamento e lo scambio di dati tra gli esperti di cellule staminali e gli esperti in biologia delle cellule beta. Negli Stati Uniti, la JDRF lavora a stretto contatto con il National Institute of Health Stem Cell Task Force per facilitare la ricerca che può essere sostenuta dal governo federale, e per disseminare l'informazione tra la comunità dei ricercatori. La JDRF lavora in stretto contatto con l'International Society for Stem Cell Research e anche con un network di centri per le cellule staminali in tutto il mondo, compresi quelli in Canada, Australia e in Europa.

Per assicurare la condotta sotto il profilo etico di queste ricerche nel 2000 la JDRF ha istituito lo Stem Cell Oversight Committee composto da ricercatori di punta del settore, legislatori, eticisti, politici, volontari, incaricati di fornire un secondo livello di valutazione (oltre alla revisione tra pari sui contenuti scientifici) per le applicazioni della ricerca sulle cellule staminali embrionali umane. La Oversight Committee è stata anche una risposta pratica alla presenza di diverse regolamentazioni per questo tipo di ricerca in tutto il mondo. Non c'era l'intenzione di sostituirsi alla revisione etica istituzionale, o regionale o nazionale, ma piuttosto di assicurare che la ricerca fosse ben giustificata e soggetta ad appropriati scrutini. La Oversight Committee comunica anche al direttivo del JDRF le considerazioni etiche sulla ricerca sulle cellule staminali.

Insieme agli sforzi regolatori per trovare fondi per la ricerca sulle cellule staminali, i volontari della JDRF hanno partecipato a numerosi forum sull'educazione pubblica, sul dialogo e sulla disseminazione di informazioni sulla ricerca sulle cellule staminali e sul trasferimento nucleare. I rappresentanti della JDRF hanno partecipato ad un panel per stabilire le linee guida per la ricerca sulle cellule staminali embrionali umane (8), hanno partecipato a diversi forum a carattere formativo e sono stati interpellati prima del Congresso degli Stati Uniti.

Nel 2001, la partnership del JDRF con l'American Society for Cell Biology, per costituire la coalizione per l'avanzamento della ricerca medica (CAMR) (9), composta da organizzazioni di pazienti, universitari, società scientifiche e fondazioni, per promuovere la garanzia e

l'espansione delle opportunità dei finanziamenti federali sulla ricerca biomedica che coinvolge l'uso delle cellule staminali embrionali. Il vice presidente della JDRF per le relazioni governative, Larry Soler, è stato il primo presidente del CAMR. Gli incontri dei membri del Congresso con i volontari della JDR e i loro bambini affetti dal diabete di tipo 1 sono cruciali per aiutare ad informare chi si occupa della legislazione. Nel 2005, il CAMR e i suoi membri hanno favorito l'approvazione dell'H.R.810, una bozza di legge per aumentare il sostegno federale alla ricerca sulle cellule staminali.

I membri della CAMR sono stati anche molto attivi a livello locale (statale) (10), iniziando delle campagne per sostenere la legislazione proattiva sulle cellule staminali, come anche opponendosi all'approvazione di disegni di legge potenzialmente dannosi (11).

La sensibilizzazione pubblica è stata molto importante per indurre la legislatura statale ad allocare le risorse per la ricerca sulle cellule staminali (tabella 1), un ruolo fondamentale per procedere in favore della ricerca biomedica.

Tabella 1. Stati che hanno programmi di finanziamento appropriati per la ricerca sulle cellule staminali

California	3 miliardi di dollari in oltre dieci anni
Connecticut	100 milioni di dollari in oltre dieci anni
Illinois	10 milioni in finanziamenti elargiti nel 2006
New Jersey	10,5 milioni inizialmente messi a budget nel 2005
Maryland	20 milioni di dollari proposti

Inoltre, i donatori privati hanno supportato la fondazione degli Stem Cell Institutions come alle Università di Harvard (12) e Stanford (13). Il regalo di oltre 58 milioni di dollari al The John Hopkins University School of Medicine ha permesso di fondare l'Institute for Cell Engineering (ICE) (14). La Starr Foundation ha stanziato 50 milioni di dollari a tre istituti di ricerca biomedica di New York – la Rockefeller University, il Weill Medical College della Cornell University e il Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) – per sviluppare nuove risorse ed esperienze nel settore delle cellule staminali. Quindi, nonostante la natura restrittiva dei fondi federali per la ricerca sulle cellule staminali embrionali negli Stati Uniti (l'NIH ha stimato di spendere sulla ricerca sulle cellule staminali embrionali umane 40 milioni di dollari nel 2005) (15), sia i singoli stati che la comunità private di filantropi rappresentano, e continueranno ad esserlo, un contributo fondamentale per

permettere lo sviluppo di questo importante tipo di ricerca.

Nonostante l'importante supporto per la ricerca sulle cellule staminali embrionali umane negli Stati Uniti, esistono problemi in merito alla regolamentazione federale, per la conduzione di questo tipo di ricerche, come anche la mancanza di linee guida etiche nazionali, che hanno condotto a terribili incertezze, specialmente in merito alle collaborazioni che coinvolgono ricercatori che appartengono a stati con diversa legislazione. Le linee guida recentemente pubblicate dallo IOM rappresentano un punto di partenza, dato che gli istituti di ricerca o gli stati possono adottare o adattare queste linee guida ai loro bisogni specifici.

La diversità della regolamentazione etica e legare, e la prospettiva della ricerca sulle cellule staminali è anche un problema che interessa l'Europa. Recentemente (16), un consorzio di ricercatori ha steso una serie di principi per permettere la collaborazione internazionale sulla ricerca sulle cellule staminali embrionali. Tra queste raccomandazioni c'è anche l'importanza di fornire chiarezza nella legislazione e nella regolamentazione, e flessibilità in queste nell'ottica di risposta ai progressi continui nella scienza.

Conclusioni

La JDRF si focalizza sulla ricerca di una cura per il diabete di tipo 1 e le sue complicazioni, questo l'ha condotta ad avere un ruolo principale nel sostegno alla ricerca sulle cellule staminali embrionali umane, sia in termini di finanziamento diretto della ricerca, sia per attività di pressione politica. La JDRF ha stretto dei partenariati con altre organizzazioni con obiettivi simili. La partnership tra organizzazioni per il finanziamento ha permesso di sostenere in modo importate la ricerca sulle cellule staminali, permettendo lo sviluppo delle risorse per la ricerca (come nuove linee cellulari e nuovi siti per la conservazione), lo scambio di informazioni (come la caratterizzazione degli sforzi internazionali) tra scienziati e la promozione delle collaborazioni tra gruppi di ricerca. Una coalizione di gruppi di interesse è importante per assicurare il massimo delle opportunità per la ricerca sulle cellule staminali embrionali umane, un'adeguata informazione del pubblico e un'appropriata distribuzione dei benefici derivati da questo tipo di ricerca.

1. <http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/overview/index.htm>

2. International Diabetes Federation Diabetes Atlas, <http://www.idf.org/home/index.cfm?node=6>

3. <http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/>

<pubs/statistics/index.htm#7>

4. <http://www.europarl.eu.int/activities/expert/>

5. Nierras, C.R., *et al.* (2004). Human embryonic stem cell research and the Juvenile Diabetes Research Foundation International – a work in progress. *Pediatr. Diabetes* 5 Suppl 2: 94-98.

6. Otonkoski, T., *et al.* (2005). Stem cells in the treatment of diabetes. *Ann. Med.*, 37:513-520.

7. Shapiro, A.M. *et al.* (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *NEJM* 343:230-238.

8. Committee on Guidelines for Human Embryonic Stem Cell Research, National Research Council. 2005. Available online:

<http://fermat.nap.edu/books/0309096537/html/>

9. <http://www.camradvocacy.org/default.aspx>

10. <http://camr.ctsg.com/>

11. Davenport, R.J. (2005). Drumming up dollars for stem cell research. *Cell* 123: 1169-1172.

12. <http://stemcell.harvard.edu/index.jsp>

13. <http://mednews.stanford.edu/stem-cell-institute.html>

14. <http://www.hopkinsmedicine.org/press/2001/JANUARY/010130.HTM>

15. <http://www.nih.gov/news/fundingresearchareas.htm>

16. The Hinxton Group Consensus Statement, <http://mbbnet.umn.edu/scmap.html>

17. <http://www.washingtonpost.com/wpdyn/content/custom/2005/08/12/CU2005081200827.html>

Un glossario per la biologia delle cellule staminali

- **Austin Smith**
- EuroStemCell European Consortium for Stem Cell Research
- <http://www.eurostemcell.org>

La biologia delle cellule staminali è in una fase di espansione dinamica, che comporta la formazione di nuove connessioni con un ampio raggio di discipline di base e applicate. Questo settore è, nel contempo, sottoposto allo scrutinio pubblico e politico. Un linguaggio comune per la comunità che si occupa di cellule staminali è uno strumento importante per l'esposizione coerente durante le attività di comunicazione, non ultimo perché certi termini nel vocabolario delle cellule staminali hanno un significato diverso in altri settori.

Cellula staminale. Cellula che si duplica continuamente producendo cellule figlie identiche a se stessa ma in grado di

produrre anche cellule figlie con proprietà diverse, più limitate.

Automantenimento. Cicli di divisione che generano a ripetizione almeno una cellula figlia equivalente alla cellula d'origine, con la capacità latente di poter differenziare. E' la proprietà che definisce le cellule staminali.

Commissionamento. Intrapresa di un programma che conduce al differenziamento. Per una cellula staminale implica l'uscita dal ciclo di automantenimento.

Potenzialità o potenza. Spettro di opzioni per il differenziamento disponibili per una determinata cellula:

Totipotenza. Autosufficienza per formare un organismo intero, caratteristica dello zigote e di una cellula meristemica delle piante, non dimostrata in altri tipi cellulari dei vertebrati.

Pluripotenza. Tutte le linee cellulari di un organismo, incluse le cellule germinale e alcune, se non tutte, le tipologie cellulari extraembrionali; per esempio le cellule staminali embrionali.

Multipotenza. Linee cellulari multiple che costituiscono un intero tessuto o più tessuti, esempio le cellule staminali emopoietiche.

Oligopotenza. Due o più linee cellulari che appartengono ad un determinato tessuto, per esempio le cellule staminali neuronali che formano una sottopopolazione di neuroni nel cervello.

Unipotenza. Una singola linea cellulare; per esempio le cellule staminali che danno origine agli spermatogoni (precursori degli spermatozoi).

Analisi clonale. Studio delle proprietà di una singola cellula. Essenziale per la dimostrazione formale dell'automantenimento e della potenzialità.

Cellule staminali embrionali. Cellule derivate *in vitro* dalle cellule pluripotenti presenti nell'embrione pre-gastrulazione.

Cellule staminali dei tessuti. Derivati da, o residenti in, un tessuto adulto o fetale. Provvedono alla sostituzione e alla riparazione lungo il ciclo vitale in alcuni tessuti.

Fondatore, ancestore o precursore cellulare. Termini generali per le cellule senza capacità di automantenimento che contribuiscono alla formazione del tessuto; si comprendono in alcuni casi anche le cellule staminali che generano un tessuto.

Cellula progenitrice. Termine generale per indicare qualsiasi tipo di cellula in divisione con capacità di differenziamento. Include anche le cellule staminali putative in cui l'automantenimento non è ancora stato dimostrato.

Cellule ad amplificazione transiente. Moltiplicazione della progenie di cellule staminali destinate al differenziamento. Inizialmente potrebbero non essere completamente commissionate, ma potrebbero mantenere la proprietà di automantenimento (3).

Divisione asimmetrica. Diverso destino per le progenie di una stessa cellula: l'orientamento della divisione può essere determinato dal microambiente o essere determinata intrinsecamente in una delle cellule figlie (4). E' stata osservata in alcune ma non in tutte le cellule staminali e può avvenire anche in altre cellule progenitrici.

Filamento immortale. Ipotesi della ritenzione selettiva del DNA parentale durante l'automantenimento asimmetrico. Meccanismo potenziale per proteggere le cellule staminali da mutazioni associate alla duplicazione (5).

Nicchia. Microambiente cellulare che fornisce il supporto e gli stimoli necessari a mantenere l'auto-rinnovamento (6,7).

Omeostasi cellulare. Persistenza di cellule staminali nei tessuti che funzionano da riserva per tutto il corso della vita. Richiede un bilanciamento tra automantenimento simmetrico e divisioni con differenziamento a livello di

popolazione cellulare, o un sostenuto automantenimento asimmetrico.

Recupero a lungo termine. Mantenimento per tutta la vita di un tessuto rinnovato mediante trapianto cellulare. Rappresenta il test definitivo per le cellule staminali emopoietiche, epidermiche e degli spermatogoni, ma il trapianto non può essere applicato a tutti i tessuti.

Cellule che mantengono la marcatura. Cellule dei tessuti adulti candidate per essere identificate come staminali sull'assunzione che si dividono lentamente e mantengono caratteristiche di immortalità (3,7). Interpretare con cautela.

Cellule staminali cancerose. Cellule in grado di automantenersi responsabili del mantenimento del cancro e della produzione di una progenie differenziata che forma la massa del tumore (8,9). Le cellule staminali cancerose sono state identificate nella leucemia e in certi tumori solidi e costituiscono un target terapeutico molto critico.

Cellula cancerosa primordiale. Cellula precancerosa che da origine alle cellule staminali cancerose (8). Può essere mutata in una cellula staminale o in progenitori che hanno acquisito capacità di automantenimento attraverso le mutazioni (9).

Cellule d'inizio del cancro. Termine generale che indica sia la cellula cancerosa primordiale che quella cancerosa staminale.

Medicina rigenerativa. Ricostruzione dei tessuti malati o danneggiati attraverso l'attivazione di cellule endogene oppure mediante trapianto cellulare.

Terapia di sostituzione cellulare. Ricostruzione di un tessuto mediante incorporazione funzionale di cellule staminali trapiantate.

Cellule staminali *in vitro*. Automantenimento *ex vivo* di cellule che non si comportano come cellule staminali *in vivo*. Avviene grazie alla liberazione dai segnali di differenziamento o alla creazione di uno stato sintetico di cellula staminale (10).

Priming della linea. Espressione promiscua nelle cellule staminali di geni associati con programmi specifici di differenziamento.

Riprogrammazione. Aumento della potenzialità. Avviene naturalmente negli organismi che si rigenerano (dedifferenziamento). E' indotto sperimentalmente nelle cellule dei mammiferi mediante trasferimento nucleare, fusione cellulare o manipolazione genetica.

Plasticità. Caratteristica di cellule staminali dei tessuti che hanno un'ampia potenzialità in risposta a stimoli fisiologici o danneggiamenti.

Staminalità. Caratteristica delle diverse cellule staminali di essere regolate da meccanismi e geni comuni.

2. Merkle, F. T., Tramontin, A. D., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 17528-32 (2004).

3. Potten, C. S. & Loeffler, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-20 (1990).

4. Wang, Z. & Lin, H. Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation. *Science* 303, 2016-9 (2004).

5. Cairns, J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 255, 197-200 (1975).

6. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the hemopoietic stem cell. A hypothesis. *Blood Cells* 4, 4-7 (1978).

7. Tumber, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W. E., Rendl, M. & Fuchs, E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303, 359-63 (2004).

8. Warner, J. K., Wang, J. C., Hope, K. J., Jin, L. & Dick, J. E. Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 23, 7164-77 (2004).

9. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-11. (2001).

10. Smith, A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 435-462 (2001).

CREDITS

Sommario ed Introduzione

Andrew Moore

Editing dei testi

Andrew Moore, Patricia Codyre, Austin Smith

Figure e Tavole

Uta Mackensen

Traduzione italiana

Marika De Acetis

Revisione Scientifica traduzione italiana

Giulio Cossu