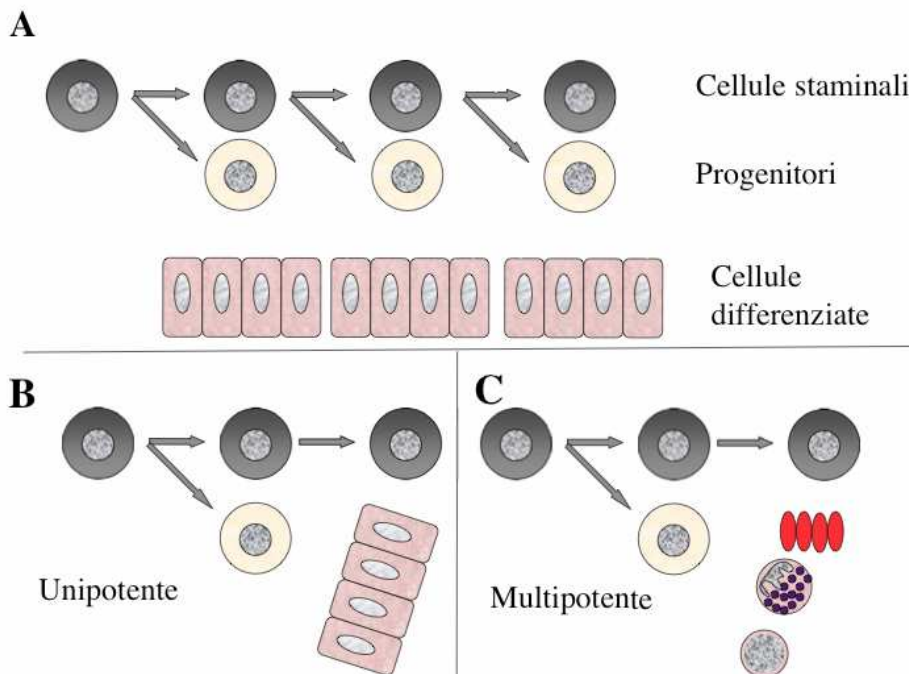


Le cellule staminali, caratteristiche biologiche, prospettive terapeutiche e conseguenti problemi etici

Definizione e caratteristiche delle cellule staminali.

A tutt'oggi non esiste ancora una definizione omnicomprensiva e puntuale delle cellule staminali. Con una buona dose di approssimazione si può definire una staminale come **“una cellula che si divide (di solito raramente) dando origine a due cellule diverse tra loro: una cellula figlia è uguale alla cellula madre (staminale) mentre l'altra cellula figlia è diversa (progenitore) e, anche se può dividersi numerose volte, non può più farlo indefinitamente (perdita della staminalità) e prima o poi tutta la sua progenie differenzierà in un solo tipo (cellula staminale unipotente) o in diversi tipi (cellula staminale multipotente) di cellule differenziate”** (Figura 1).



Questa definizione è teorica poiché non disponiamo di marcatori molecolari che ci permettano di distinguere tra loro le due cellule figlie di una cellula staminale. Possiamo soltanto derivare questa definizione da saggi funzionali retrospettivi. È oggi possibile ricostituire l'intero sistema ematopoietico di un topo irradiato letalmente con una singola cellula staminale. Questa procedura è facilitata dall'impiego di un topo transgenico che esprime in tutte le sue cellule una proteina fluorescente (GFP o green fluorescent protein), così che la cellula donatrice e tutta la sua progenie saranno facilmente identificabili perché fluorescenti. Pertanto, se una singola cellula staminale fluorescente (più un certo quantitativo di progenitori non fluorescenti necessari per mantenere l'emopoiesi durante il periodo di espansione e colonizzazione midollare da parte della cellula staminale fluorescente) viene trapiantata in un topo letalmente irradiato, il topo ricevente sopravvivrà e tutte (o quasi) le sue cellule del sangue saranno fluorescenti per il resto della sua vita. Inoltre, è possibile trapiantare con il midollo fluorescente del topo trapiantato un secondo topo irradiato e ripetere

la procedura alcune volte. Questo dimostra che una singola cellula staminale emopoietica ha la capacità di generare tutti gli elementi figurati del sangue per tutta la vita di uno o più organismi (almeno nei roditori). Al contrario, se viene trapiantato un progenitore, questo sarà in grado di dare origine agli elementi figurati del sangue del topo ricevente per un periodo limitato di tempo (settimane o pochi mesi), trascorso il quale, tutte la progenie differenzierà in cellule mature del sangue e poi il midollo andrà in aplasia.

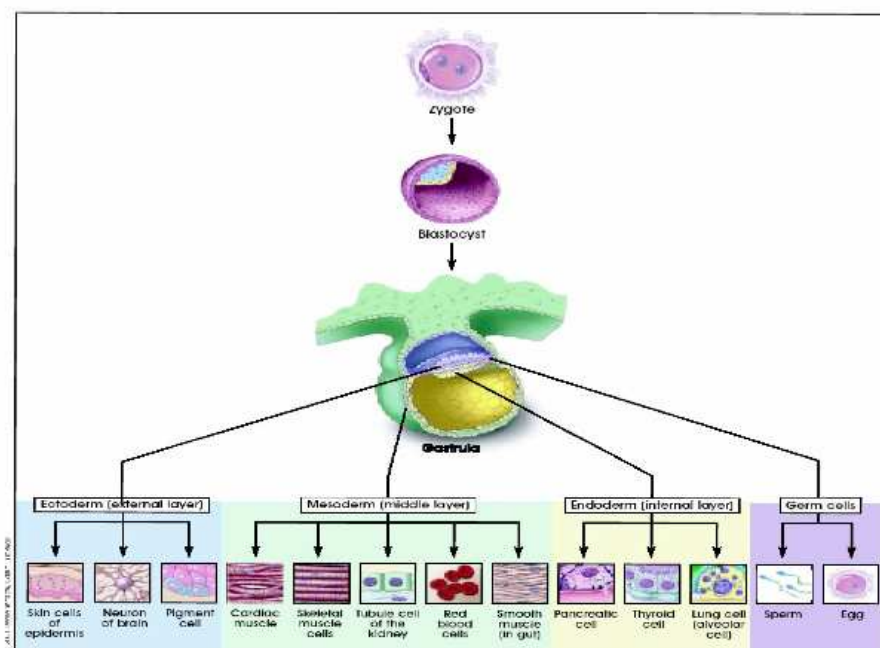
Origine e classificazione delle cellule staminali.

In base alle conoscenze attuali le cellule staminali vengono divise in due gruppi: cellule staminali embrionali e cellule staminali adulte. Questa definizione è imprecisa perché tra le cellule staminali adulte sono comprese quelle fetali, presenti negli abbozzi degli organi, quelle neonatali, isolabili dal cordone ombelicale e quelle propriamente adulte, presenti in molti (o forse tutti) gli organi del nostro organismo.

Le cellule staminali embrionali.

Le cellule staminali embrionali sono presenti nella massa cellulare interna (o embrioblasto) della blastocisti, poco prima dell'impianto nella mucosa uterina (Figura 2). Queste cellule possono essere coltivate in opportune condizioni per lunghi periodi e sono quindi in grado di generare un numero elevatissimo di cellule figlie le quali mantengono la capacità di differenziare in tutti i tessuti dell'organismo e per tale motivo sono definite "totipotenti".

Le cellule staminali embrionali derivano dalla blastocisti
 Le cellule staminali adulte originano dopo la gastrulazione



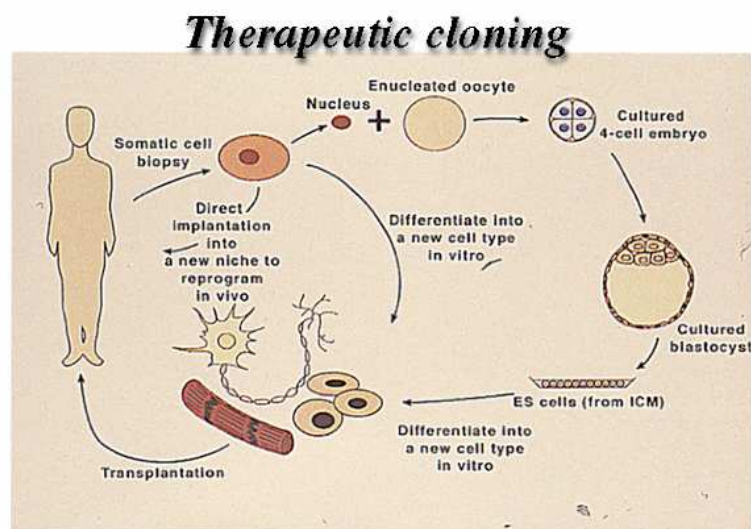
Le cellule staminali embrionali o ES (dall'inglese: "embryonic stem" cells) possono essere geneticamente modificate in vitro mediante sostituzione di un gene sano con uno mutato o viceversa (ricombinazione omologa). Quando iniettate nella cavità (blastocela) di una blastocisti ospite, le ES colonizzano tutti i tessuti dell'embrione chimerico (così definito perché composto dalla mescolanza di due genotipi diversi) compresa la linea germinale. Possono pertanto trasmettere un gene d'interesse alla progenie della chimera permettendo così di creare modelli di malattie umane o di terapie in utero.

Nel 1998 è stato possibile per la prima volta isolare e coltivare cellule staminali embrionali umane, il che ha aperto nuove prospettive terapeutiche e altresì generato una serie di roventi polemiche, soprattutto nei paesi cattolici. Cellule staminali embrionali umane possono dare origine a tutti i tessuti differenziati del nostro corpo e quindi generare nuovi neuroni o cardiomiociti o epatociti per riparare tessuti vitali danneggiati da malattie degenerative. Tuttavia le cellule staminali ottenute da embrioni non impiantati, quali quelli ottenuti in eccesso durante procedure di fecondazione in vitro, sono immunologicamente diverse dal paziente in cui sarebbero trapiantate e ciò richiederebbe procedure di immunosoppressione simili a quelle utilizzate per i trapianti di organo.

La clonazione terapeutica o trasferimento nucleare e la clonazione riproduttiva.

Esiste tuttavia una strategia alternativa (Figura 3). In linea di principio è possibile isolare cellule staminali embrionali autologhe (cioè derivate dallo stesso paziente e quindi immunologicamente identiche). A tal fine occorre attuare un complesso procedimento che ha funzionato in numerosi mammiferi ma finora non nei primati. **Cellule uovo mature ma non fecondate (ottenibili quindi da donatrici) sono soggette a trasferimento nucleare.**

Schema che illustra la clonazione terapeutica tramite trasferimento nucleare

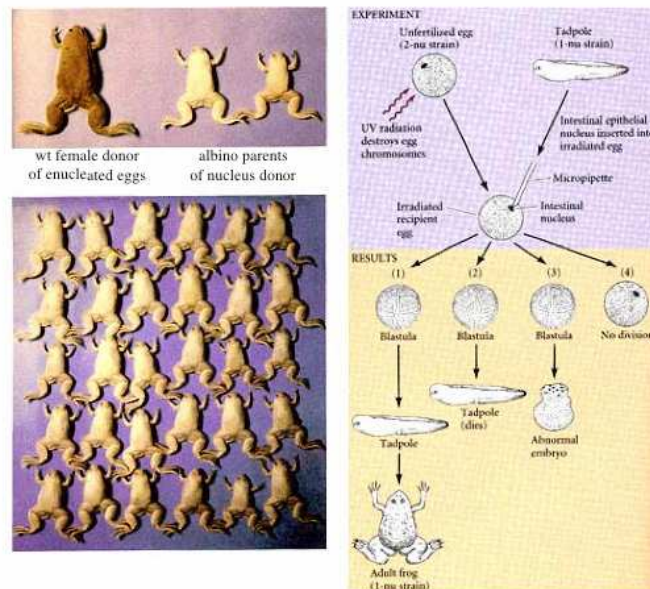


Con un sottilissimo capillare si deposita nel citoplasma dell'uovo il nucleo, in precedenza isolato da cellule somatiche del paziente, e si rimuove il pronucleo femminile. L'uovo inizierà, in una certa percentuale di casi, un processo di segmentazione che arriverà

allo stadio di blastocisti. A questo punto le cellule della massa cellulare interna saranno isolate e coltivate per ottenere il tipo cellulare necessario per ricostituire il tessuto danneggiato del paziente. Queste cellule avranno lo stesso genoma del paziente (con l'eccezione dei geni mitocondriali che invece derivano dalla cellula uovo) e quindi sarebbero immunologicamente riconosciute come "self". Rimangono da risolvere, a parte i problemi etici, numerosi problemi tecnici, che valgono anche per le cellule staminali adulte e saranno quindi discussi alla fine di questo paragrafo.

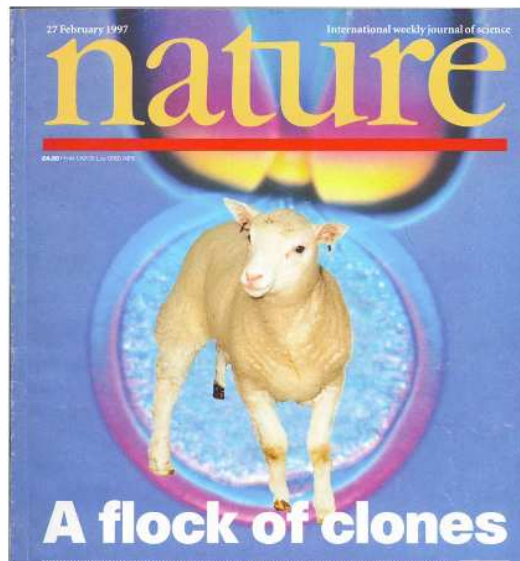
Per completezza di informazione viene brevemente descritta di seguito la "clonazione riproduttiva" che si ottiene quando invece l'embrione prodotto per trasferimento nucleare viene lasciato sviluppare fino a generare un nuovo individuo. Questo processo, descritto oltre quaranta anni fa da John Gurdon per gli anfibii (Figura 4) non si riteneva possibile per i mammiferi.

Nel 1962 John Gurdon dimostrò che era possibile generare delle rane a partire dal nucleo di una cellula somatica dell'intestino di un girino



Tuttavia, nel 1997 Ian Wilmut riportò la nascita della famosa pecora "Dolly" (Figura 5) ottenuta per trasferimento nucleare e successivo impianto nell'utero di una madre ospite. Finora sono stati clonati vari mammiferi (roditori, ovini, bovini) ma non primati. Tutti gli animali clonati presentano difetti più o meno gravi a carico di molti organi che di solito li portano a morte prematura.

Nel 1997 Ian Wilmut e colleghi dimostrarono lo stesso fenomeno in un mammifero



Le cellule staminali adulte.

Le cellule staminali adulte sono presenti in molti e forse in tutti gli organi dei mammiferi, anche se il loro numero si riduce probabilmente con l'età. In passato si riteneva che soltanto i tessuti soggetti a continuo ricambio (sangue ed epiteli) possedessero cellule staminali, necessarie per sostituire con nuove cellule differenziate le cellule perse quotidianamente durante tutta la vita dell'individuo. Ciò spiegava come questi tessuti fossero soggetti principalmente a patologie di tipo proliferativo (tumori). Al contrario, i tessuti le cui cellule non si rinnovano (o si rinnovano con estrema lentezza) nella vita adulta (muscolo scheletrico e cardiaco, tessuto nervoso) erano ritenuti privi di cellule staminali e quindi prevalentemente soggetti a patologie di tipo degenerativo. Le cose sono cambiate con la dimostrazione, oggi incontrovertibile, che il sistema nervoso centrale e quello periferico contengono cellule staminali neurali, capaci di proliferare indefinitamente o quasi nelle opportune condizioni sperimentali e di generare i principali tipi cellulari del sistema nervoso quali neuroni e glia. Inoltre, anche il cuore, finora ritenuto incapace di rigenerazione, probabilmente contiene cellule staminali, capaci di generare nuovi cardiociti e forse anche cellule muscolari lisce ed endoteliali.

La plasticità e le prospettive terapeutiche delle cellule staminali.

Fino al 1998 si ritenevano totipotenti (cioè capaci di dare origine a tutte le cellule dell'organismo) le cellule staminali embrionali e unipotenti o multipotenti le cellule staminali adulte, a seconda che dessero origine ad un solo o a più tipi cellulari, comunque propri del tessuto in cui esse risiedono. In quell'anno fu pubblicato il primo di una serie di articoli che nel giro di due anni hanno modificato profondamente il concetto di potenzialità delle cellule staminali adulte ed introdotto il concetto di plasticità. Cellule staminali del midollo osseo, che normalmente danno origine alle cellule mature del sangue, possono, in opportune condizioni e con bassa frequenza, dare origine a cellule muscolari scheletriche, cardiache o lisce, neuroni, epatociti e cellule epiteliali. Per di più cellule staminali neurali possono dare origine a cellule del sangue, cellule muscolari scheletriche e a molti altri tipi cellulari quanto

trapiantate in un embrione di pollo. Questo fenomeno, definito plasticità ed esteso anche ad altri tipi di cellule staminali (mesenchimali, o isolate dal derma o dalla sinovia) ha importanti implicazioni applicative ma anche politiche ed etiche. In molte malattie genetiche o acquisite in età matura, le cellule staminali residenti nel tessuto colpito potrebbero essere state distrutte dal processo patologico o aver esaurito la loro capacità proliferativa e non essere quindi più disponibili per contribuire alla rigenerazione tissutale. In questi casi sarebbe utile poter isolare le cellule staminali da un altro tessuto, non colpito dalla malattia e utilizzarle per riparare il tessuto lesa, dopo averle indotte a differenziare nel tipo cellulare necessario. Perché un simile procedimento possa divenire terapeuticamente efficace, sarà però necessario soddisfare tutte le seguenti necessità:

1. le cellule staminali devono essere isolate dal tessuto affetto (se possibile) o da un tessuto sano ma comunque clinicamente accessibile.
2. le cellule staminali devono essere isolate in numero sufficiente oppure espanse in coltura senza perdita di staminalità (capacità di auto-rinnovamento) e/o potenzialità differenziativa. Se necessario esse devono essere modificate geneticamente in vitro mediante introduzione di una copia sana del gene affetto dalla malattia (terapia genica ex vivo).
3. le cellule staminali devono essere veicolate al tessuto danneggiato in modo selettivo ed efficiente. A differenza del midollo (“homing” spontaneo dopo iniezione endovenosa) e dell’epidermide (applicazione topica di lembi di tessuto) tutti gli altri organi devono essere raggiunti o per iniezione intra-tissutale o per via ematica. La prima procedura è complessa e inefficiente poiché le cellule iniettate migrano poco e quindi numerosissime iniezioni sarebbero necessarie. La seconda, logicamente preferibile, richiede però che le cellule iniettate siano capaci di arrestarsi nell’organo bersaglio, di aderire e attraversare l’endotelio, una proprietà non ancora dimostrata per la maggior parte delle cellule staminali.
4. le cellule staminali devono sopravvivere nel tessuto danneggiato e differenziare con alta efficienza nel tipo cellulare richiesto, così da ripristinare le funzioni precedentemente danneggiate dalla malattia.

Ad oggi, queste necessità non sono ancora soddisfatte, né per le cellule staminali adulte (sia del tessuto danneggiato che di un diverso tessuto) né per le cellule staminali embrionali. Tuttavia elementi di natura etica e politica hanno infiltrato il dibattito scientifico sulla eventuale scelta tra cellule staminali embrionali ed adulte. Un’inopportuna e prematura enfaticizzazione delle capacità differenziative, dimostrate o presunte, delle cellule staminali adulte aveva come fine dimostrare che lo studio delle cellule staminali embrionali non era più di primaria importanza e quindi da abbandonare, anche per evitare i problemi etici che esso comporta. Dall’altro lato, una serie di studi volti a smentire quelli sulla plasticità delle cellule adulte aveva come scopo principale mantenere la supremazia delle cellule staminali embrionali, giustificando quindi normative a finanziamenti a loro favore. Di fatto sarà saggio continuare a lavorare su tutti i tipi di cellule staminali in attesa che ulteriori dati sperimentali ci indichino il tipo di cellula staminale da preferire per una data patologia.

Problemi etici connessi all’utilizzo di cellule staminali umane.

Occorre premettere che problemi legali, etici e politici concernono esclusivamente le cellule staminali embrionali umane. In tutti gli altri casi l’utilizzo di cellule staminali adulte o non umane non pone problemi di sorta. Nel febbraio del 2004 è stata promulgata la legge 40 sulla fecondazione medicalmente assistita che vieta la produzione di cellule staminali embrionali, anche a partire da embrioni congelati.

Negli altri paesi europei vigono leggi molto diverse tra loro: nel Regno Unito è lecita ed è finanziata con fondi pubblici la ricerca su ES umane, mentre altri paesi come la Germania e l’Austria la vietano. La Comunità Europea sta cercando di risolvere il non facile problema

stabilendo delle linee guida, che però lasciano ai singoli governi nazionali la decisione finale sull'argomento. In USA invece la situazione è complessa: mentre il governo federale non concede finanziamenti, questa ricerca può essere finanziata da privati e di recente alcuni stati, quali la California, hanno operato massicci investimenti sulle staminali embrionali.

Il motivo reale della situazione italiana è legato al concetto cattolico di “sacralità della vita umana”, che viene esteso anche ad embrioni congelati allo stadio di poche cellule o di blastocisti. Occorre sottolineare che nel caso della ricerca scientifica quello che conta è il risultato, ovunque questo sia ottenuto. E' chiaro quindi che le difficoltà dovute ai problemi su menzionati non avranno alcun effetto sul rapido evolversi della ricerca sulle ES umane che si svolge in USA e in altri paesi e che quindi presto saranno disponibili i risultati di questo lavoro e si potrà valutare la loro applicabilità in protocolli terapeutici.

Nel frattempo, nel tentativo di sbloccare questa situazione in Italia, l'Associazione Luca Coscioni si è fatta promotrice di un referendum per abrogare la legge 40 o almeno alcuni suoi articoli tra cui quello sulle cellule staminali embrionali.

Esistono, come su ricordato, decine di migliaia di embrioni congelati. Molti di questi embrioni, benché ancora vivi, non sono più in grado di dare origine ad una blastocisti normale e pertanto non vengono impiantati. Contengono però al loro interno cellule che possono essere espianate in coltura e dare origine a nuove linee di cellule staminali. Concettualmente quindi, il prelievo di queste cellule equivale al prelievo di un organo da un soggetto ancora vivo ma in stato di morte cerebrale. Occorre poi ricordare che anche gli embrioni che riprendessero uno sviluppo normale non avrebbero comunque alcuna probabilità di vita senza un utero che li accolga e finora non risultano domande di adozione per alcuno dei circa 30.000 embrioni congelati in Italia.

Con una piccolissima parte di questi embrioni si possono derivare molte linee di cellule staminali embrionali con cui studiare a fondo nei prossimi anni la possibilità di impiegarle con successo per la terapia di molte malattie genetiche o acquisite. Se per una data malattia si scoprisse che le cellule staminali “adulte” (quelle derivate o magari mobilitate dai tessuti del paziente stesso) mostrassero una migliore efficacia terapeutica rispetto alle staminali embrionali, il discorso sarebbe chiuso. Il contrario potrebbe essere vero per un'altra malattia cui solo le cellule staminali embrionali potessero fornire una cura efficace (a titolo di esempio confrontare i lavori pubblicati di recente sulla produzione di neuroni dopaminergici, necessari per curare il morbo di Parkinson, ottenuti sia da cellule staminali embrionali che adulte: figura 6). In tal caso si porrebbe il dilemma, al ricercatore prima e al medico poi, se sia lecito sacrificare una vita creata ad hoc per salvarne un'altra, quella di un paziente affetto da una malattia incurabile. Si tratterebbe a questo punto di generare per trasferimento nucleare (“clonazione terapeutica”) una struttura umana vivente (attenzione non un embrione). Questo struttura vivente sarebbe sacrificata prima che si impianti nell'utero della madre, per derivare cellule staminali embrionali le quali, avendo lo stesso DNA del paziente, potrebbero formare cellule del cervello, del cuore o del fegato, assolutamente identiche e quindi naturalmente tollerate, senza bisogno di immunosoppressione con tutti i gravi problemi che questa comporta. Alcuni obietteranno a questo punto che per salvare la vita di un paziente se ne sacrifica un'altra. C'è però un'altra considerazione da fare ed è sulle probabilità di vita. Se un embrione naturale ha circa il 30% di probabilità di nascere e quello ottenuto in vitro il 20%, un embrione clonato ha meno di una probabilità su cento di nascere. Questo per i topi, per altri mammiferi ancora meno e si potrebbe arrivare a 0% nei primati visto che finora nessuna scimmia è stata clonata con successo. Se ciò fosse vero, e lo sapremo nei prossimi anni, ne conseguirebbe che la struttura vivente clonata non è un embrione e non solo perché non deriva dalla fusione di uovo e spermatozoo (infatti non sarebbe uno zigote ma, secondo Rudy Jaenisch, un clonote) ma soprattutto perché non ha probabilità alcuna di dare origine ad un

nuovo bambino. Se così fosse, dovremmo considerare questa struttura clonata alla stregua di un tessuto, o meglio di molti tessuti in potenza, ma non un individuo e pertanto utilizzarlo come un tessuto nuovo e capace di curare un malato. Questa è ovviamente una posizione parziale, sebbene basata su dati oggettivi e certamente c'è da riflettere su questo punto, ricordando però che il medico ha comunque l'imperativo morale di fornire al paziente consenziente la migliore terapia possibile.

Neuroni dopaminergici (Parkinson) sono ottenuti sia da cellule staminali embrionali che da cellule staminali neurali adulte

<p>© 2000 Nature America Inc. • http://biotech.nature.com</p> <p>RESEARCH</p> <p>Induction of Midbrain Dopaminergic Neurons from ES Cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity</p> <p>Hiroshi Kawasaki,[*] Kenji Mizuseki,[*] Satomi Nishikawa,[†] Satoshi Kaneko,[‡] Yoshihisa Kuwana,[§] Shigetada Nakanishi,[‡] Shin-Ichi Nishikawa,[†] and Yoshiki Sasai^{*k#}</p>	<p>© 2000 Nature America Inc. • http://biotech.nature.com</p> <p>RESEARCH</p> <p>Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells</p> <p>Sang-Hun Lee¹, Nadya Lumelsky¹, Lorenz Studer^{1,2}, Jonathan M. Auerbach¹, and Ron D. McKay^{1*}</p>
<p>© 1999 Nature America Inc. • http://biotech.nature.com</p> <p>RESEARCH</p> <p>Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in <i>Nurr1</i>-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes</p> <p>Joseph Wagner¹, Peter Åkerud¹, Diogo S. Castro¹, Pontus C. Holm¹, Josep M. Canals^{1,4}, Evan Y. Snyder¹, Thomas Perlmann¹, and Ernest Arenas¹</p>	<p>PNAS December 19, 2000 vol. 97 no. 26 14686-14691</p> <p>Neurobiology</p> <p><i>In vivo</i> induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain</p> <p>James Fallon^{*,} Steve Reid^{*,} Richard Kinyamu^{*,} Isaac Opole^{*,} Rebecca Opole^{*,} Janie Baratta^{*,} Murray Korc^{*,} Endo^{*,} Alexander Duong^{*,} Gemi Nguyen^{*,} Masoud Karkehabadi^{*,} Daniel Twardzik[§], and Sandra Loughlin[¶]</p>

Probabilmente, molti anni e molti “se” ci separano da questa possibile e difficile decisione; durante questi anni nuove metodiche e nuove scoperte potrebbero permetterci di superare il problema come accadrebbe se qualcuno riuscisse a derivare cellule staminali embrionali da altre fonti. Potremmo utilizzare questi anni e soprattutto i pochi mesi che ci separano dal referendum per riflettere e discutere su questi temi nella speranza di aiutare chi andrà a votare a farlo con maggiore consapevolezza dei problemi sul tappeto.