
Biologia delle cellule staminali

Silvia Garagna, Maurizio Zuccotti,
Carlo Alberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo –
Università di Pavia

Direzione scientifica Fondazione IRCCS San
Matteo – Pavia

E-mail: maurizio.zuccotti@unipv.it



ABSTRACT: Le cellule staminali, embrionali e somatiche o adulte, sono cellule dotate della singolare proprietà di rinnovarsi mantenendo sia caratteristiche di cellule indifferenziate che la capacità di dar luogo a cellule che vanno differenziandosi. Questa proprietà è diversamente graduata, ve ne sono di totipotenti, pluripotenti, multipotenti ed unipotenti, in dipendenza del grado di rinnovo e differenziazione finale a cui le cellule figlie vanno incontro. La biologia delle SC è oggi una delle grandi *hot topics* in biologia e medicina poichè la staminalità gioca un ruolo di primo piano sia nello sviluppo ontogenetico di un individuo sia nel mantenimento della omeostasi dei tessuti dell'individuo adulto. Il campo delle SC è aperto anche ad un mondo di riflessioni che, legittime nella appartenenza a discipline non squisitamente scientifiche, vengono disinvoltamente mescolate a quelle strettamente scientifiche. Deve dunque essere precisata la cornice all'interno della quale collocare i propri ambiti di lavoro e riflessione.

PAROLE CHIAVE: Biologia, embrione, cellule staminali.

Le cellule staminali (SC), embrionali (ES) e somatiche o adulte (SSC), sono cellule dotate della singolare proprietà di rinnovarsi mantenendo sia caratteristiche di cellule indifferenziate che la capacità di dar luogo a cellule che vanno differenziandosi. Questa proprietà è diversamente graduata, ve ne sono di totipotenti, pluripotenti, multipotenti ed unipotenti, in dipendenza del grado di rinnovo e differenziazione finale a cui le cellule figlie vanno incontro. La biologia delle SC è oggi una delle grandi *hot topics* in biologia e medicina poiché la staminalità gioca un ruolo di primo piano sia nello sviluppo ontogenetico di un individuo sia nel mantenimento della omeostasi dei tessuti dell'individuo adulto. Il campo delle SC è aperto anche ad un mondo di riflessioni che, legittime nella appartenenza a discipline non squisitamente scientifiche, vengono disinvoltamente mescolate a quelle strettamente scientifiche. Deve dunque essere precisata la cornice all'interno della quale collocare i propri ambiti di lavoro e riflessione.

Rimandiamo ai contributi elencati in bibliografia per la parte strettamente tecnica mentre qui precisiamo la cornice dei dati e delle riflessioni che definiscono il contorno all'interno del quale collocare la biologia delle SC.

Larga parte degli equivoci che alimentano e sostengono alcune posizioni di intransigenza e di fondamentalismo nascono proprio da preconcetti non vagliati criticamente e da riferimenti troppo generici riguardo alla biologia delle SC, a partire dal lessico impiegato. Fenomeno questo del disinvolto impiego in ambito colloquiale di concetti e lessico relativi alle SC da parte di decisori politici e pensatori vari a cui non sono estranei anche gli scienziati. Anche le nozioni di individuo, persona, vita, embrione, nozioni intimamente legate alla biologia delle SC, sono spesso impiegate in maniera distorta e ciò porta a radicalizzare posizioni ideologiche preconcrete, più che a un sereno confronto su di essi. È dunque necessario definire i dettagli scientifici e tecnici della biologia delle SC: cosa sono le SC innanzitutto, e quali le procedure della loro derivazione. Ed inoltre, è importante chiarire come solo l'adozione del metodo scientifico, un metodo intrinsecamente ed operativamente *laico*, può aiutare a sviluppare considerazioni criticamente aperte al nuovo, all'avanzamento del sapere. Solo questa attitudine mentale permette di non arroccarsi su posizioni fissiste, immutabili nel tempo, e di ricollocare le proprie convinzioni nel tempo mano a mano che gli sviluppi del sapere ci offrono nuovi scenari di riflessione da cui, in una relazione circolare, derivare nuovi epistemi.

La libertà e lo sviluppo della ricerca sulle SC sono oggi condizioni necessarie per il futuro della medicina e della qualità della vita dei cittadini. Solo la laicità delle istituzioni può assicurare, attraverso la trasparenza della discussione pubblica e dei processi decisionali, di trovare un punto di equilibrio tra le varie posizioni, con il rifiuto di ogni fondamentalismo e di ogni arroganza culturale o politica, per sviluppare norme e decisioni capaci di permettere l'acquisizione della piena conoscenza scientifica di tutti gli aspetti della biologia delle SC.

La biologia delle SC mette alla prova molte delle categorie concettuali della cultura contemporanea come libertà, progresso, democrazia, giustizia, intervenendo in ogni campo della vita e della salute degli individui. L'accantonamento del criterio di laicità e una sostanziale sovrapposizione di criteri religiosi ed ideologici per indirizzare la ricerca sulle SC mettono a repentaglio la libertà e la qualità della vita degli individui che in gran parte, oggi, nelle società occidentali, sono assicurate dalla ricerca in biologia (genomica, proteomica, nanotecnologie, etc).

Tutti noi originiamo da una cellula, lo zigote, frutto della unione dello spermatozoo e della cellula uovo, ed attraverso lo sviluppo embrionale e fetale da adulti siamo composti da circa un milione di miliardi di cellule.

Tutte queste cellule originano dallo zigote che per questa sua capacità è per definizione “totipotente”. Lo zigote e le cellule dell’embrione nelle prime fasi dello sviluppo (blastocisti) possiedono tutte le informazioni, a livello nucleare e citoplasmatico, necessarie alla produzione dei diversi tipi cellulari che compongono un nuovo individuo. Il cambiamento nel numero e nella tipologia dei geni che si esprimono in ogni fase dello sviluppo porta dapprima alla determinazione del destino differenziativo delle cellule e in momenti successivi alla loro effettiva differenziazione nei diversi tipi cellulari presenti nell’organismo adulto. In alcuni tessuti dell’adulto permangono cellule che non andranno mai incontro al processo di determinazione e differenziamento, mantenendo la capacità di rinnovarsi. Queste cellule sono dette “staminali”, cellule in grado di sostituire quelle differenzianti nei tessuti caratterizzati da un alto ricambio cellulare (ad esempio, le cellule germinali maschili dell’epitelio seminifero o le cellule del tessuto ematopoietico, le cellule del sangue) o da processi di continua morte cellulare (ad esempio nell’epidermide). Le cellule staminali mantengono capacità proliferativa durante tutta la vita dell’individuo e quando si moltiplicano danno origine ad una cellula che rimane di tipo staminale mentre l’altra inizia il processo differenziativo. Si dice così che le cellule staminali si dividono in modo asimmetrico poichè le due cellule figlie hanno destini differenziativi funzionali diversi.

Con il procedere dello sviluppo embrionale e fetale il numero di cellule staminali si riduce e nell’individuo adulto sono presenti solo in alcuni precisi distretti tissutali. Dalle blastocisti si possono isolare le cellule del nodo embrionale e coltivarle fino ad ottenerne milioni, le cosiddette “ES cells” (Embryonic Stem cells) la cui caratteristica principale è l’elevata capacità proliferativa unita alla capacità di differenziarsi in qualsiasi altro tipo cellulare.

Da questa breve descrizione deriva il concetto di SC: un particolare tipo di cellula, come già detto, che ha la unica capacità di rinnovare se stessa e di dare origine ad uno dei più di 200 tipi diversi di cellule specializzate (osso, muscolo, fegato, nervi, etc etc.) che costituiscono il corpo di un vertebrato (come detto, quello umano è composto di circa un milione di miliardi di cellule: in numeri, 10^{15} !). In altre parole, la gran parte delle cellule che compongono il corpo, ad esempio le cellule del cuore o della pelle, sono specializzate per compiere una funzione specifica mentre le SC non sono specializzate e rimangono indifferenziate sino al momento in cui ricevono degli stimoli che le portano a svilupparsi in cellule specializzate, differenziate. La caratteristica di mantenere la capacità proliferativa associata alla abilità a differenziarsi in una cellula specializzata è unica delle SC.

Molti dei termini che si impiegano per definire le SC derivano dal loro comportamento quando si trovano nel corpo (in vivo), ad esempio ES (dall’embrione) e somatiche o adulte, SSC, (dalle fasi di sviluppo postembrionali); oppure quando si studiano in particolari condizioni di coltura cellulare (in vitro); staminali transdifferenziate. Lo zigote è la SC totipotente poichè ha la capacità di generare tutte le cellule e tutti i tipi cellulari che compongono un nuovo individuo. Le cellule che costituiscono le prime fasi dello sviluppo embrionale (la blastocisti) sono dette pluripotenti poichè capaci di generare le cellule che si differenziano nei tre foglietti embrionali, endoderma, mesoderma ed ectoderma che poi daranno origine a tutti i tipi di cellule dei vari tessuti ed organi. SC multipotenti ed unipotenti sono dette quelle che hanno un minore grado di capacità differenziativa, e che si ritrovano nelle fasi ultime dello sviluppo fetale e nell’adulto. Queste staminali danno origine solo al tipo di cellule del tessuto in cui si trovano: si pensi alle staminali del sangue e dell’epidermide che provvedono al mantenimento dei rispettivi tessuti.

Per comprendere appieno il significato biologico del termine cellula staminale è bene conoscere chiaramente quale è la derivazione del termine staminale. Il termine rende l'inglese staminal, a sua volta un neolatinismo (non è mai esistito in lat. un agg. *staminalis, -e!) creato in ambiente scientifico anglosassone su materiale latino. Alla base della forma vi è, comunque, il lat. STAMEN, -INIS, sost. ntr. formato da due distinti morfemi, - la base lessicale (di origine indeuropea) *sta- "stare saldamente collocato; stare; - il morfema derivazionale (di origine indeuropea) *-men- , usato ampiamente per la formazione di sostantivi indicanti, inizialmente, il prodursi dell'effetto di un'azione e poi, per traslato, l'effetto dell'azione stessa.

Qualche esempio, tratto dal latino: ag-men "l'esercito in marcia"; lu-men "il bagliore della luce" (vs. lux "la luce, vera e propria); ful-men, il bagliore precedente il tuono; cri-men, l'azione del separare / selezionare e poi, per traslato, l'oggetto della selezione; se-men, inizialmente, l'azione del seminare, poi, ciò che si semina.

STAMEN è dunque inizialmente un termine tecnico della tessitura ed indica l'ordito, del tessuto (lett. "ciò che sta fermamente saldo"), sul quale si sovrappone la trama, a formare il tessuto nella sua forma finale. Poi indica più in generale "il filo" e, con valore traslato, "il filo della vita; il destino; la sorte; lo stame della vita".

Ciò che è importante notare, nel valore semantico di lat. stamen, è l'idea (astratta) di qualche cosa che "sta fermo, stabilmente", che vale quale "principio di fondo, basilare".

Da qui cellula staminale, basilare, fondante.

Recenti studi hanno messo in dubbio che le SSC abbiano una capacità differenziativa limitata solo ad alcuni tessuti ed al mantenimento delle popolazioni cellulari differenziate del tessuto di appartenenza. Infatti, a partire dalla seconda metà degli anni '90 è stato dimostrata la presenza di SC in tessuti differenziati nei quali si riteneva che le SC non fossero più presenti, ad esempio nel tessuto nervoso centrale. Il contributo più importante di questi studi è stato quello di rivelare la capacità di differenziamento delle SC non solo nei tipi cellulari propri del tessuto di appartenenza, ma anche in tipi cellulari di tessuti diversi grazie ad un processo detto di transdifferenziazione. Vari studi hanno dimostrato la capacità delle SSC di transdifferenziarsi in tipi cellulari diversi sia in vitro che in vivo. SSC del sangue sono state differenziate in cellule muscolari, cardiache, endoteliali, gliali, epatiche e del dotto biliare. A questo proposito vale la pena di ricordare lo straordinario esperimento effettuato nel 2001, nel topo, da Diane Krause (della Università di Yale), nel quale si dimostra la capacità di una singola SSC del midollo osseo di ripopolare in vivo il midollo osseo stesso di animali irradiati letalmente, ma anche di transdifferenziarsi in cellule epiteliali di tessuti diversi quali fegato, polmone e pelle. SSC sono state ritrovate anche nel muscolo striato scheletrico in grado di originare cellule del midollo osseo; nel tessuto nervoso capaci di differenziarsi in cellule nucleate del sangue, in cellule muscolari scheletriche ed in diversi tessuti embrionali; nel tessuto adiposo (si pensi alla liposuzione quale fonte di SSC) in grado di differenziarsi in cellule adipose, della cartilagine, dell'osso e del muscolo; della regione del limbus della cornea in cellule della cornea; cellule endoteliali in cellule cardiache; SSC sono state recentemente descritte anche nel cuore in seguito ad infarto, organo nel quale si riteneva non fossero presenti. L'elenco dei tessuti e degli organi dai quali è possibile ottenere SSC in grado di transdifferenziarsi in vitro o in vivo si allunga di giorno in giorno (di recente sono state trovate anche nella polpa dei denti decidui). È importante ricordare che le SSC sono localizzate in specifiche "nicchie" definite da un contesto biochimico, più che anatomico, caratterizzate da un microambiente complesso che permette alle SSC di mantenere le proprie caratteristiche. Le conoscenze relative alla biologia delle SC sono ancora molto limitate e l'opportunità di riconoscerle e svelarne le caratteristiche

biologiche per giungere ad applicazioni terapeutiche su vasta scala dipenderà essenzialmente dai finanziamenti erogati a queste ricerche.

Una cronologia degli sviluppi e delle ricerche sulle SC può aiutare a meglio inquadrare tutte le problematiche, scientifiche, etiche e legali, legate alla loro derivazione ed al loro impiego.

Si deve al lavoro di ricercatori canadesi della McGill University (Montreal, Quebec, Canada), nel corso degli anni '50 dell'ultimo secolo, la prova dell'esistenza di SC. Sino agli inizi degli anni '50 si era teorizzata la loro esistenza in base al concetto di "stato dinamico dei costituenti del corpo", concetto già presente in Eraclito (V secolo avanti Cristo). Negli anni '30 e '40 viene sviluppata la tecnica di autoradiografia grazie alla quale è possibile introdurre nello studio delle cellule e dei tessuti, sino ad allora studiati nelle loro relazioni architettoniche nelle tre direzioni spaziali, la dimensione tempo. Charles Leblond ed i suoi collaboratori (H. Cheng, W. Chang, J. Marques Pereira, B. Messier, J. Nadler) rivelano così la dinamica della assunzione e lo spostamento tra diversi tipi cellulari di sostanze (normalmente presenti nelle cellule) marcate con elementi chimici capaci di emettere elettroni (ad esempio isotopi radioattivi di idrogeno, zolfo, carbonio). Dimostrano in tal modo che le cellule alla base dei villi intestinali sono capaci di dividersi in maniera asimmetrica, come si era ipotizzato, e sono staminali. Leblond ne dimostra l'esistenza anche nel testicolo, individuando un tipo particolare di spermatogonio (detto A) capace di assicurare il rinnovo costante delle cellule dell'epitelio seminifero (la cui esistenza era intuitivamente già stata ipotizzata: in caso contrario, dopo una singola eiaculazione, un maschio di mammifero sarebbe privo di spermatozoi). Ai lavori della scuola canadese segue una serie di contributi della comunità scientifica che dimostrano l'esistenza di SC in tutti i diversi comparti anatomici ed a partire da questi anni è un lento susseguirsi di tanti piccoli avanzamenti delle conoscenze che, come è tipico nella impresa scientifica, in breve tempo permettono applicazioni terapeutiche già oggi ben consolidate grazie all'impiego di SSC (trapianti di midollo osseo, pelle artificiale, cornea), altre, sia con SSC sia con ES, in via di definizione (Parkinson, infarto, diabete) o del tutto sperimentali (stroke spinali, Alzheimer, sclerosi amiotrofiche).

Negli anni '60, R. Cole, R.G. Edwards e J. Paul (1964 e 1966) alla Glasgow University (UK) isolano la prima colonia di ES (immortali) da blastocisti di coniglio e R.L. Gardner (1968) dimostra la capacità differenziativa di una singola ES nel topo. Nella decade successiva, M.J. Evans (1972) isola e caratterizza ES di topo mentre R.A. Fleischman e B. Mintz (1979) iniettano nelle placente di topi immunosoppressi staminali ematopoietiche embrionali e curano una anemia geneticamente determinata. Negli anni '80 M. J. Evans e M. H. Kaufman (1981) isolano e stabiliscono la prima linea cellulare di ES nel topo e S. Fishel (1984) ottiene le prime ES umane. Gli anni '90 vedono molti avanzamenti, A.M. Wobus (1991 e 1995) ottiene cellule del cuore da ES di topo e E.Y. Snyder (1992) dimostra che staminali neuronali embrionali sono trapiantabili ed attecchiscono nel cervelletto di topo. Ancora, S. Weiss (1992) isola SSC neuronali dal cervello di topi adulti mentre S. Okabe (1996) differenzia diversi tipi di cellule nervose da ES di topo. Le prime linee cellulari di ES umane (3 maschili e 2 femminili) e di scimmie macache vengono allestite da J. A. Thompson (1998) mentre M.J. Shambloott (1998) ottiene le prime linee di cellule staminali germinali (EG) umane. La possibilità di coltivare cellule ES umane ottenute da blastocisti al quattordicesimo giorno di sviluppo è ovunque limitata alle blastocisti che provengono dalle cliniche di fecondazione in vitro e sono dunque embrioni in eccesso che non sono stati trasferiti nell'utero della madre, ma con il consenso dei genitori utilizzate per la ricerca. Unica eccezione è il sud Corea ove gli oociti possono essere ricavati da giovani donne che volontariamente donano queste cellule, e quindi possono

essere impiegati per la creazione di zigoti ricostituiti se l'autorità di controllo accorda il permesso. In modo simile, ciò accade in Spagna ed in alcuni altri paesi. Il quadro legislativo di riferimento per questi paesi è il Regno Unito dove da diverse decadi le problematiche scientifiche, etiche e sociali legate ai temi della biologia della riproduzione (in senso lato) sono sviluppate in modo rigoroso. Agli inizi del nuovo secolo (2000) S.H. Lee produce neuroni dopaminergici da ES di topo mentre A. Vescovi e G. Cossu transdifferenziano SSC neuronali in cellule del sangue e del muscolo. Nell'anno 2001, N. Lumelsky ottiene cellule secernenti insulina da ES di topo e diversi gruppi scandinavi confermano che il trapianto di SSC neuronali, derivate da feti abortiti, sono efficaci nel trattamento del Parkinson (487 ad oggi); D. Orlic impiega SSC del midollo osseo per rigenerare cuori umani infartuati. Y. Jiang (2002) dimostra che SSC del midollo osseo possono formare diversi tipi di tessuto confermando il dato di D. Krause che, nei topi, con una singola SSC del midollo osseo è possibile ripopolare tutti i distretti anatomici. K. Hubner, H. Scholer e M. Boiani (2003) producono cellule germinali (oociti) da ES di topo. Nell'anno 2004 T. Barberi, del Memorial Sloan Kettering di New York, ottiene milioni di neuroni dopaminergici da una singola ES umana. Nel 2006 Giulio Cossu ed i suoi collaboratori dimostrano che mesangioblasti, eterologhi o autologhi ingegnerizzati, sono in grado di recuperare, nel modello canino, la distrofia di Duchenne. I contributi si susseguono ormai ad un ritmo incalzante. Sotto il profilo delle tecniche di derivazione va ricordata la scuola della Advanced Cell Technology di Robert Lanza con la dimostrazione che è possibile derivare linee di ES umane da un singolo blastomero estratto da morule allo stadio di 6 – 10 blastomeri.

Le ricerche sulle potenzialità che le SC hanno di differenziarsi in qualsiasi altro tipo cellulare sono condotte da almeno vent'anni, anche se non sono mai state sotto i riflettori dei media se non negli ultimi anni, in particolare a partire dal 1998. Ora, grazie ad importanti risultati alcuni dei quali sopra ricordati, promettono la produzione di nuove cellule e tessuti, forse anche organi, per lo sviluppo di nuove terapie per il morbo di Parkinson, l'Alzheimer, l'infarto, i tumori, il diabete, la osteoporosi, e molte altre patologie, generando grandi speranze ed aspettative sul loro impiego in ambito biomedico. Negli ultimi anni sono state migliorate le metodiche per il loro isolamento e la loro coltura ed è stata dimostrata la possibilità di produrre ES a partire da un nucleo di una cellula somatica terminalmente differenziata, prelevata ad esempio da una biopsia, ridando ad esso le caratteristiche di totipotenzialità che possedeva nello zigote. Ciò si può realizzare grazie ad una tecnica detta "trasferimento di nuclei di cellule somatiche" in cellule uovo private del loro nucleo i.e. oociti enucleati). Una svolta importantissima nella ricerca sulle SC è giunta infatti con la clonazione della pecora Dolly e del topo Cumulina. Già Hans Spemann (embriologo sperimentale, premio Nobel per i suoi studi sul differenziamento cellulare), attorno agli anni 1920 – 1930, si chiedeva se terminata la differenziazione una cellula era ancora in grado di de-differenziarsi e riassumere lo stato di totipotenza caratteristico dello zigote. Gli esperimenti di Willmut e Campbell (*Nature* **385** (1997) 810), impiegando come modello animale la pecora e successivamente di Yanagimachi e collaboratori (*Nature* **394** (1998) 369), con il topo, hanno dato una chiara risposta stabilendo che il nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate, trasferito nel citoplasma di una cellula uovo enucleata, è in grado di acquisire un nuovo programma genetico e di iniziare e terminare lo sviluppo embrionale con la nascita di un nuovo individuo. Dal punto di vista genetico il nuovo individuo è una "copia genomica" del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare: è un clone genetico prodotto per

clonazione riproduttiva. Se il processo di clonazione riproduttiva viene interrotto alle fasi iniziali dello sviluppo (a livello di blastocisti) questa stessa tecnica permette di produrre ES. Si attua così una clonazione terapeutica.

Varie sono quindi le sorgenti di SC tra le quali sono da ricordare anche il cordone ombelicale (già esistono banche del cordone ombelicale, New York, Milano, ed una legge in Italia ne prevede la donazione e conservazione) ed il materiale derivante dagli aborti, spontanei o procurati. Da questi ultimi è possibile ricavare anche cellule EG, le cellule che parteciperanno alla formazione delle gonadi. Le EG sono cellule pluripotenti che fanno la loro comparsa alla 3^a settimana di sviluppo, nell'uomo, e sono in grado di moltiplicarsi e differenziarsi, come le ES, in quasi tutti i tipi cellulari presenti nell'individuo adulto. La loro difficile reperibilità ne ostacola però fortemente il possibile impiego quale sorgente di SC.

L'impiego delle SSC soffre di due grandi limitazioni, l'una numerica (sono poche e di difficile reperibilità) e l'altra fisiologica (dopo alcune divisioni cellulari in coltura tendono a perdere le caratteristiche di multipotenzialità). Diversamente, le cellule ES possono essere mantenute in coltura per moltissimi cicli di divisione, addirittura per più di dieci anni, senza perdere la pluripotenzialità ma la loro produzione incontra forti resistenze e limitazioni di natura etica.

Le caratteristiche delle SC ne permettono un impiego in medicina rigenerativa per terapie cellulari mirate a sostituire le cellule perse nel corso della senescenza o a causa di traumi o patologie. Basti pensare al trapianto di SSC ematopoietiche che, negli ultimi 20 anni, ha rappresentato una valida terapia per la cura di alcuni tumori del sangue e per gravi malattie ematologiche anche non neoplastiche. Nella possibilità di transdifferenziazione delle SC si intravedono grandi potenzialità terapeutiche per patologie ora ritenute incurabili.

Oltre alle applicazioni più tradizionali, quali il trattamento dei grandi ustionati (pelle artificiale) e di alcuni tipi di leucemie (trapianto di midollo osseo), le prime applicazioni terapeutiche più innovative delle SC sono già iniziate per la cura del morbo di Parkinson, di alcune patologie oculari (cornea), dell'infarto del miocardio e del diabete.

Il panorama appare quanto mai promettente e di particolare interesse può risultare la situazione legata alla terapia per il Parkinson dalla quale emergono i conflitti di natura etica ed economici sottesi a queste terapie. In ambito europeo è stato dimostrato da ricercatori svedesi l'opportunità di recuperare la sintomatologia dei parkinsoniani per un periodo dai tre ai cinque anni con trapianti di SSC neuronali provenienti da materiale abortivo. Alcuni ricercatori statunitensi avevano criticato questo lavoro sostenendo di aver ottenuto risultati negativi nella ripetizione della terapia e la stampa aveva dato un grande risalto al fatto sostenendo che spesso i ricercatori millantano successi. La realtà è risultata però più complessa e si è dimostrato che i risultati negativi ottenuti dai ricercatori statunitensi erano legati alla loro procedura sperimentale che comprendeva una diversa tecnica chirurgica per il trapianto delle cellule e per una diversa metodica di coltura delle stesse. Ciò ha comportato una selezione negativa di quelle SSC che sono utili al recupero della malattia ed ottenibili solo da cellule direttamente isolate dal tessuto abortivo.

Per quanto riguarda il recupero della zona necrotica nella regione dell'infarto miocardico, l'esito del trapianto cellulare è risultato positivo in diversi centri, tra cui Duesseldorf e Padova, con il recupero funzionale dell'attività cardiaca. L'opportunità di trattare il diabete in particolare quello giovanile, risulta chiarissima dalla sperimentazione su modelli animali (le SC trasfuse organizzano isole di Langherans e producono insulina nel fegato) e pertanto il passaggio alla fase di sperimentazione sull'uomo sembra imminente.

In Italia, è da ricordare la terapia condotta utilizzando cellule staminali del limbus della cornea. Queste cellule vengono isolate dall'occhio sano di pazienti e coltivate in vitro fino al raggiungimento delle dimensioni di un'intera cornea. Successivamente, dopo aver rimosso dai pazienti il tessuto che impedisce la visione all'occhio malato, viene eseguito il trapianto con le nuove cellule. L'85%-90% dei pazienti conclude questo intervento con successo (in questo campo l'Italia vanta un primato mondiale con la banca degli occhi del veneto curata dal dott. De Luca). Un altro successo italiano è quello già ricordato del novembre 2006: il gruppo di ricerca di Giulio Cossu ha dimostrato che SSC (mesangioblasti) autologhe ed eterologhe sono in grado, nel modello canino della distrofia di Duchenne, di rimpiazzare e far crescere il muscolo ormai infiltrato ed in via di degenerazione.

Cellule ES di topo sono state differenziate in vitro in cellule epiteliali, muscolari, nervose o pancreatiche. Di recente, un gruppo di ricercatori dell'Università di Bonn e del National Institute of Neurological Disorders and Stroke negli Stati Uniti è riuscito a differenziare delle ES in cellule della glia, un tipo di cellula nervosa che produce lo strato di mielina che ricopre le fibre nervose. Queste cellule, quando trasferite nel cervello di topi deficienti per la produzione di mielina, sono state capaci di esprimere una normale attività sintetica di questa proteina. Un altro gruppo di ricercatori della Washington University School of Medicine ha prodotto, sempre a partire da ES, delle cellule nervose immature che se trasferite nella spina dorsale danneggiata di ratti, ne ristabiliscono le normali funzioni. Analoghi tentativi sulle scimmie e su alcuni pazienti (compiuti ad Harvard dal neurobiologo Evans Snyder) fanno ritenere non lontano nel tempo la possibilità di riparare motoneuroni con la riacquisizione delle funzioni deambulatorie (si pensi alle applicazioni per patologie quali i traumi spinali). La storia dei successi nei trapianti di SSC ematopoietiche è alla base delle strategie oggi sviluppate per le terapie basate sui trapianti di ES. Va precisato che ad oggi non esistono pratiche terapeutiche di routine basate sull'impiego di ES; il loro impiego è ancora del tutto legato alla ricerca anche se la analisi della letteratura scientifica permette di vedere più vicine nel tempo alcune applicazioni delle terapie basate su trapianti di ES rispetto ad altre. Indubbiamente le ES possiedono caratteristiche, quali la pluripotenza e la capacità proliferativa illimitata, che le rendono estremamente attraenti per future terapie cellulari.

Nel prossimo futuro le linee più promettenti di ricerca riguardano la riprogrammazione genetica dei nuclei somatici di cellule terminalmente differenziate grazie al loro trasferimento all'interno di oociti enucleati ottenibili in grande quantità da animali di interesse economico (mucca, pecora) oppure grazie all'impiego di sostanze simili in composizione chimica alle sostanze presenti nel citoplasma della cellula uovo (citoplasto artificiale). L'obiettivo è quello di poter ottenere SC in grandi quantità a partire da cellule somatiche terminalmente differenziate senza incontrare limitazioni ed ostacoli di natura etica. A livello internazionale si delineano tre strategie di ricerca: 1) per le staminali somatiche: non vi è contesa; 2) per quelle embrionali: produzione ex novo da embrioni creati appositamente (come è lecito fare in Gran Bretagna, Belgio, Svezia, Israele, Singapore, Sud Corea e tra breve in Brasile e Cina) o da embrioni criopreservati destinati alla distruzione (il prelievo di staminali da questi ultimi è di fatto un prelievo da cadavere); 3) alcuni laboratori stanno sviluppando un "citoplasto artificiale" per riprogrammare geneticamente le cellule somatiche impiegando particolari miscele (fattori di trascrizione, ioni bivalenti, piccole molecole di RNA) al fine di ottenere ES senza limitazioni etiche. Sebbene più lontano nel tempo, l'esito di queste ultime ricerche permetterebbe alla medicina rigenerativa di non incontrare ostacoli tecnici o barriere etiche e ciò aprirebbe vastissimi scenari applicativi in

ambito biomedico e farmacologico. Si pensi alla possibilità di ottenere in vitro, impiegando una miscela di sostanze che mimano la azione del citoplasma dell'oozite, la riprogrammazione genetica delle cellule somatiche ottenute da una biopsia, e ciò senza impiegare le cellule uovo. L'ottenimento degli oociti è il primo problema della clonazione, terapeutica o riproduttiva: se questa fosse lecita, le donne delle fasce socialmente meno protette dei paesi del terzo e quarto mondo si vedrebbero offrire danari per vendere oociti, con gravissimo danno per la loro salute. Questa via alternativa per la produzione di ES in assenza del gamete femminile, impiegando citoplasti naturali o artificiali, era già stata segnalata nell'anno 2002 nel rapporto della commissione presieduta dal Nobel Renato Dulbecco (commissione di studio sull'utilizzo delle cellule staminali per finalità terapeutiche), a suo tempo istituita dal Ministro della Sanità Prof. Umberto Veronesi. Nel rapporto Dulbecco, la commissione, dopo aver valutato le proposte del rapporto Donaldson per la ricerca sulle SC (www.dh.gov.uk), auspicava fortemente il sostegno a queste ricerche poiché da esse possono derivare applicazioni terapeutiche ad oggi di difficile praticabilità per l'impossibilità di disporre di un numero sufficiente di cellule da trapiantare. Un solo esempio rende ragione della situazione: il materiale embrionale/fetale di 5 – 6 aborti permette la raccolta di un numero di staminali neuronali utili per il trattamento ed il recupero funzionale (dai 2 ai 5 – 6 anni) di un solo paziente parkinsoniano. Questi numeri dicono chiaramente che questa strategia di intervento terapeutico non è perseguibile, altre fonti di SC sono necessarie. Per capire la dimensione delle necessità ed urgenze di intervento terapeutico, basti pensare che solo negli USA circa 60 milioni di persone presentano patologie del sistema cardiovascolare, più di 15 sono affette da diabete, 10 dalla osteoporosi, più di 4 dall'Alzheimer e più di 2 dal Parkinson. Una Europa sempre più longeva e con un tasso demografico inferiore a quello di sostituzione è una Europa destinata ad essere costituita in grande maggioranza da senescenti bisognosi delle terapie basate sull'impiego delle SC. L'ottenere un organo è da considerarsi ancora lontano: le cellule in differenziamento giungono a formare un organo anche grazie a messaggi di tipo posizionale, moltiplicandosi e crescendo su supporti specifici, supporti che oggi non riusciamo a riprodurre in vitro nonostante i progressi della bioingegneria dei materiali biologici. Non solo il mondo accademico è attivo a questo riguardo, ma anche diverse imprese mercantili. È chiaro l'intento di giungere alla produzione di significative quantità di SC sfruttando in particolare la possibilità di transdifferenziare (grazie all'impiego di particolari miscele di sostanze quali l'acido retinoico, l'insulina, triiodotironina, eritropoietina ed altre; è questo un campo di attivissima ricerca) le SC comunque ottenute, poiché la transdifferenziazione amplia di diversi ordini di grandezza la potenzialità produttiva dei diversi tipi di tessuti. Ciascuna di queste imprese adotta specifiche strategie di produzione (SC da embrione, da feto o da adulto) e di settore applicativo (cellule del sistema nervoso, del mesenchima, del sangue). Il settore più "tradizionale" è quello delle SC del sangue, ma con il progredire delle tecniche di prelievo, transdifferenziazione ed espansione in coltura i settori saranno sempre più numerosi. La Osiris Therapeutics, occupandosi di SC del mesenchima, mira alla produzione di diversi tipi cellulari - osteoblasti, condrociti, mioblasti, preadipociti ed altri ancora - che si differenziano dal mesenchima. Le potenziali applicazioni cliniche sono quelle legate alla terapia cellulare per la rigenerazione ed il recupero funzionale dell'osso, della cartilagine e del muscolo. È chiaro che patologie (ereditarie o traumatiche) quali la osteoporosi, la osteoartrite, l'infarto, l'obesità, traumi di ossa e tendini trovano un ulteriore scenario di trattamento. Attività principale della Neurotech è la identificazione ed il prelievo di SC neuronali dal cervello di adulti umani per la loro espansione in coltura (ottenibile con l'aggiunta di Epidermal Growth Factor, basic

Fibroblast Growth Factor e Leukaemia Inhibitory Factor al terreno di coltura). Emerge chiaro da questi due esempi l'apporto delle imprese BioTec alla ricerca di base. Di necessità, per una efficace competizione commerciale con le altre imprese, ciascuna di esse è tesa all'avanzamento delle conoscenze di base sul differenziamento (e, seppure oggi ancora limitatamente, alla creazione di nuovi posti di lavoro) poiché l'identificazione dei fattori che più efficacemente stimolano la riprogrammazione è in grado di determinare il successo commerciale della impresa. È ragionevole attendersi un avanzamento rapido delle conoscenze dei fattori che specificano funzionalmente le SC e che compaiono nel corso della riprogrammazione del nucleo somatico, ad oggi scarsamente conosciuti; tra i pochi noti, l'espressione della fosfatasi alcalina, del fattore di crescita GDF-3, di trascrizione OCT-4, di repressione Genesis, la comparsa delle proteine del gruppo Polycomb e di quelle capaci di legare le isole CpG metilate.

L'attenzione del grande pubblico è certamente rivolta alle possibili applicazioni terapeutiche delle SC. Ma per la comunità scientifica queste applicazioni sono solo una delle tante opportunità offerte da queste cellule che in realtà costituiscono un reagente biologico di straordinaria importanza per la ricerca biomedica. Varie sono le aree della ricerca ove le SC, in particolare le ES, possono essere impiegate. Tra le più promettenti, quelle legate allo studio di:

- proprietà farmacologiche di nuove molecole e tossicità di nuovi farmaci
- effetti di anomalie cromosomiche sullo sviluppo embrionale e fetale
- organi artificiali (rene, fegato, cuore, denti, vasi)
- nuovi vettori utili per terapie geniche; ad esempio le SC possono essere impiegate per il trasferimento di geni nelle terapie antitumorali o come "proiettili" contro particolari tipi di cellule cancerose
- fattori microambientali che consentono il mantenimento delle capacità staminali
- molecole legate alla espressione dei geni nel corso del differenziamento cellulare (o anche nel dedifferenziamento delle cellule tumorali)
- riprogrammazione genetica delle cellule differenziate in SC (sviluppo di citoplasti artificiali e naturali)
- fattori responsabili per la attrazione delle SC nel sito tissutale danneggiato
- ingegnerizzazione genetica al fine di evitare la reazione immunitaria

Non tutti i paesi sono dotati di una legislazione tale da permettere studi su ES umane. Sotto questo profilo il pianeta è praticamente diviso in due.

Questo campo di ricerca di estrema avanguardia, ed i cui risultati permetterebbero certamente di abbreviare enormemente i tempi di passaggio dalla ricerca di base alla terapia, è di fatto in mano alle capacità di Regno Unito, Singapore, Israele e Sud Corea. Ora un referendum popolare ha aperto le porte a queste ricerche anche in Svizzera e California e la recente legislazione introdotta in Brasile farà di questo paese uno dei leader in questo campo di ricerca.

Se è chiaro che la medicina del nuovo secolo sarà una medicina rigenerativa che farà ampio uso di SC, meno chiaro è il reale quadro delle sorgenti di SC e quali ricerche si stanno mettendo in campo non per il domani, ma per un tempo più in là a venire. La ricerca ci propone quasi quotidianamente risultati che i media propongono in termini trionfalistici ed insieme forieri di gravissimi pericoli. Raramente si tenta di spiegare ai

cittadini la reale situazione, senza creare false aspettative o creare timori che spingono i decisori politici a chiusure del quadro giuridico di ciò che è lecito ricercare. Il dibattito che si sta svolgendo a livello internazionale sulle SC è un dibattito “falsato”: chiara è la evidenza delle possibilità di terapie che però sono ritenute lecite o illecite in base a convinzioni ideologiche e religiose sulla natura dell’embrione. Ne deriva per molti paesi una giurisprudenza che limita la capacità del capitale umano impegnato in ricerche di avanguardia che possono portare ad abbreviare i tempi delle applicazioni. E così il dibattito si arena su un tema che non può avere soluzioni. Il metodo scientifico potrebbe aiutare la dove dice che è necessario decidere in base al “che fare” degli embrioni che già esistono. L’adozione di una etica della responsabilità, della decisione, nei confronti di questi embrioni che già esistono porta alla inevitabile conclusione che è una maggiore forma di rispetto il loro impiego e non la loro distruzione. Come è stato deciso nel Regno Unito: i media hanno però presentato il via libera alla clonazione terapeutica in questo paese senza ricordare che le cellule uovo da cui sono stati derivati gli embrioni per preparare linee staminali erano oociti destinati alla distruzione. Il legislatore britannico ha ritenuto una forma di maggiore rispetto il loro impiego, e non la loro distruzione.

È necessario che la società civile sia in grado di espandere la propria capacità di comprensione delle opportunità e dei limiti intrinseci alla biologia delle SC. Solo così si potrà raggiungere una più diffusa conoscenza del mondo della ricerca delle SC ed una corretta percezione delle problematiche in campo, senza confondere i fatti scientifici con le fantasie, le paure, gli apriori ideologici e le irrazionalità. Ciò aiuterà i decisori politici a capire ed a sviluppare norme e regole rispettose delle attese dei cittadini: in primo luogo la attesa di vedere ben finanziata la ricerca in questo campo.

Va infatti sottolineato che la biologia delle SC è ancora un grande buco nero del quale incominciamo ad intravedere solo alcune realtà. In un simile contesto è dunque necessaria tanta, e ben finanziata, ricerca per sviluppare strategie tese all’ottenimento di grandi quantità di diversi tipi di SC. L’esempio, già ricordato, della ricerca preclinica sul Parkinson è esemplificativo: ad oggi ben 487 pazienti parkinsoniani sono stati trattati con SC nervose derivate da materiale abortivo fetale, e quindi con SSC. Solo 3 pazienti non hanno mostrato regressione dei sintomi, 484 hanno visto scomparire discinesia ed ancora oggi dopo 3 – 5 anni le SSC trapiantate sono capaci di produrre dopamina (la sostanza mancante nel cervello dei pazienti Parkinson). Purtroppo questo approccio terapeutico è del tutto impraticabile su larga scala poiché è necessario il materiale derivante da 5 – 6 aborti per ottenere la quantità di SC necessaria al trattamento di un solo paziente Parkinson. Da qui la necessità di trovare nuove sorgenti del reagente biologico utile al trattamento: Tiziano Barberi, nell’agosto 2004, ha ottenuto un milione di neuroni dopaminergici da una singola ES umana. È chiaro che solo un atteggiamento criticamente aperto permetterebbe di svolgere queste ricerche in modo sistematico per stabilire così se questa opportunità terapeutica è praticabile su larga scala e non solo in studi mirati per pochi pazienti.

L’atteggiamento intellettuale del ricercatore è intrinsecamente un atteggiamento a-confessionale e anti-fondamentalista, in una parola è un atteggiamento genericamente (e necessariamente se vuole dirsi seguace del metodo scientifico galileano) di laicità. Laicità intesa come atteggiamento intellettualmente aperto, aperto ai cambiamenti concettuali che i dati di nuove sperimentazioni lo portano a compiere. Anche a cambiare radicalmente idea rispetto a posizioni iniziali sulle quali si è basato per concepire un esperimento che ha prodotto dati non congrui con la propria posizione iniziale. Il ricercatore sottopone a costante revisione le proprie conoscenze e, se vuole essere un buon ricercatore, con mente aperta accetta anche i dati che gli

dimostrano come si fosse sbagliato a dedurre una certa idea, a sviluppare un concetto. Per poter svolgere degnamente questo lavoro il ricercatore deve essere libero: idealmente deve essere libero da vincoli economici e libero da norme giuridiche che ne indirizzino il lavoro. Purtroppo questa condizione ideale non si realizza nella ricerca sulle SC, certamente non si realizza nel nostro paese. Vero è che anche in altri paesi (ad esempio USA e Germania) esistono vincoli alla ricerca sulle ES. È altrettanto vero però che in questi paesi le dinamiche sociali li esistenti mettono in campo correttivi tali da ripristinare una situazione di sostanziale sostegno alla ricerca sulle ES, basti pensare al referendum popolare con cui la California, ma anche la Svizzera, ha stabilito di dare il via libera alla ricerca sulle ES con un investimento altissimo (seguita ormai da molti altri stati della federazione).

A livello internazionale (e senza voler fare una difesa della categoria) la comunità scientifica dei biologi dello sviluppo che hanno partecipato attivamente alle ricerche ed al dibattito (a partire dalle prospettive conoscitive e applicative conseguenti al successo della tecnica del trasferimento nucleare nei mammiferi) sulla derivazione e coltivazione delle ES, ha mantenuto un atteggiamento di laicità. Anche i biologi impegnati nelle ricerche con SC adulte hanno sempre sottolineato l'importanza di finanziare le ricerche sulle ES. Qualche eccezione vi è stata, ma certamente si tratta di piccoli peccati veniali dettati dall'esigenza di reperire fondi, ma il quadro delineato non cambia sostanzialmente.

Il campo della biologia delle SC avrebbe molto da guadagnare se si lasciasse pari opportunità di ricerca alle due strategie, se si desse loro la stessa libertà di conoscenza, cioè dare loro la possibilità di creare *nuova* conoscenza per stabilire, ad esempio, se una data patologia sarà meglio trattabile con un tipo o con l'altro di staminale. Al contrario, molto spesso, credenze private di alcuni decisori politici vengono contrabbandate per conoscenze scientifiche. Va inoltre sottolineato che in Italia anche la ricerca sulle SSC è finanziata in modo vergognoso: con l'equivalente del biglietto della lotteria di capodanno (5 milioni di Euro) ! Mentre la "laica" Spagna investe 100 milioni di Euro per la ricerca sulle SSC per un solo istituto, il Carlos III di Madrid ed apre ben due parchi biotecnologici (Barcellona e Valencia) al lavoro sulle ES.

Un esempio di corretta procedura, un esempio chiaro di laicità e di democrazia, è quello messo in campo dal governo del Regno Unito dove il primo ministro Tony Blair ha investito milioni di sterline per divulgare e spiegare a tutti i cittadini "il libro bianco della genetica nel sistema sanitario nazionale" (*Our Inheritance, Our Future: Realising the potential of genetics in the NHS.*). Le mamme negli asili, i lavoratori nelle pause pranzo, le varie comunità etniche, tutti i cittadini hanno incontrato specialisti che illustravano loro i contenuti del libro, cosa significa concretamente la "clonazione terapeutica e riproduttiva", la costruzione di una "biobanca di dati genetici", la "selezione del sesso" e così via tutte le opportunità offerte oggi dalla "rivoluzione biologica" che stiamo vivendo dopo i sequenziamenti dei genomi, quello umano in primis. Solo così è possibile realizzare un controllo democratico nell'elaborazione di principi e norme giuridiche che regolamentino la ricerca, e le trasposizioni tecniche degli avanzamenti del sapere, in modo rispettoso della pluralità di valori. Sarà il sostegno dei cittadini informati e capaci di elaborare in piena autonomia le proprie scelte bioesistenziali (inizio e fine vita, ad esempio) quello che assicurerà di realizzare quella che Pietro Greco chiama "democrazia cognitiva" e che può ben essere vista come la necessaria base per costruire una società davvero laica.

I temi ed i problemi legati alla diffusione delle biotecnologie biomediche nel dibattito in ambito sociologico sulla percezione pubblica delle biotecnologie e sui fattori che influenzano la percezione dei rischi e i giudizi morali nei riguardi delle diverse applicazioni delle biotecnologie richiedono una riflessione sia in chiave

storica sia a livello di dinamiche culturali e socio-economiche. Il ruolo della comunicazione scientifica e degli scienziati nel modulare tali atteggiamenti ed in particolare le aspettative individuali e sociali riguardo alle applicazioni delle SC risulta imprescindibile.

La storia della scienza insegna che non esistono scorciatoie; non è fruttuoso pensare di investire in ricerca applicata se in precedenza non si finanzia quella di base, non è fruttuoso l'atteggiamento anti-laico nei confronti della conoscenza. Il che significa finanziare (libertà) tutte le opzioni della ricerca (conoscenza). La non-laicità può solo portare al declino, culturale ed economico poiché dalla conoscenza (che avanza solo con un atteggiamento laico da parte delle istituzioni) oggi dipende il motore economico delle società.

Bibliografia

- [1] M. Boiani e H.R. Scholer, *Regulatory networks in embryo derived pluripotent stem cells*, Nature Reviews Molecular Cell Biology | AOP, 14 October 2005.
- [2] N. Ivanova, *Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference*, Nature **442** (2006) 3.
- [3] I. Klimanskaya et al., *Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres*, Nature **444** (2006) 23.
- [4] R.E. MacLaren et al., *Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors*, Nature **444** (2006) 9.
- [5] M. Sampaolesi et al., *Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs*, Nature **444** (2006) 16.
- [6] K. Takahashi e S. Yamanaka, *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*, Cell **126** (2006) 663.