

LA RICERCA SULLE STAMINALI: RISULTATI, PROSPETTIVE, PREREQUISITI - PARTE II

Indice

	4.1	Il punto della situazione	13
	4.2	Prospettive	14
	4.3	Riflessioni	15
	4.4	Conclusioni	15
1		Riparare il cuore	3
		<i>(di Michael Brehm, Bodo E. Strauer, Heinrich-Heine University, Dusseldorf, Germany)</i>	
	1.1	Il punto della situazione	3
	1.2	Prospettive	4
	1.3	Riflessioni	5
	1.4	Conclusioni	6
2		Vasi sanguigni	6
		<i>(di Stefanie Dimmeler, Department of Internal Medicine III, University of Frankfurt, Germany)</i>	
	2.1	Il punto della situazione	6
	2.2	Prospettive	7
	2.3	Riflessioni	8
	2.4	Conclusioni	8
3		Pelle e occhi	9
		<i>(di Michele De Luca, Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Modena e Reggio Emilia, Modena e Banca degli Occhi del Veneto, Centro di Ricerca sulle Cellule Staminali, Venezia)</i>	
	3.1	Il punto della situazione	10
	3.2	Prospettive	11
	3.3	Riflessioni	12
	3.4	Conclusioni	13
4		Sistema nervoso	13
		<i>(di Jonas FrisÅ©n, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden)</i>	
5		Pancreas	16
		<i>(di Helena Edlund, Center for Molecular Medicine, Umea University, Sweden)</i>	
	5.1	Il punto della situazione	16
	5.2	Prospettive	18
	5.3	Conclusioni	18
6		Muscolo	19
		<i>(di Giulio Cossu, Fondazione San Raffaele del Monte Tabor, Stem Cells Research Institute (SCRI), Milano, Italia)</i>	
	6.1	Il punto della situazione	20
	6.2	Prospettive	21
	6.3	Riflessioni	22
	6.4	Conclusioni	23
7		Potenzialità terapeutiche: valutazione	23
		<i>(di Frank Barry, Regenerative Medicine Institute (REMEDI), National University of Ireland, Galway, Ireland)</i>	
	7.1	Il punto della situazione	24
	7.2	Prospettive e riflessioni	25
	7.3	Conclusioni	26
8		Aspetti commerciali	26
		<i>(di Thomas Okarma, Geron Corporation, California, USA)</i>	

8.1	Il punto della situazione	27
8.2	Riflessioni	29
8.3	Conclusioni	30
9	La prospettiva dei pazienti (di Robert Goldstein, <i>Juvenile Diabetes Research Foundation International (JDRF)</i> , New York, United States of America)	30
9.1	Il punto della situazione	31
9.2	Conclusioni	33

10 Glossario

(di Austin Smith, <i>EuroStemCell European Consortium for Stem Cell Research</i>)	34
--	-----------

Introduzione

Qual è il punto della ricerca sulle cellule staminali? Chi ci sta lavorando in Europa? Quali sono le possibili prospettive? Le risposte in questo documento, prodotto dall'EMBO nell'ambito di un progetto Europeo, che qui presentiamo in esclusiva tradotto in italiano e in versione integrale.



In questo dossier è raccolta la seconda parte dei documenti originali collezionati dall'EMBO, tradotti in italiano, che descrivono lo stato della ricerca in Europa nel settore delle cellule staminali. La prima parte dei documenti è disponibile nel dossier: *“La ricerca sulle staminali: risultati, prospettive, prerequisiti - Parte I”*. E' possibile scaricare l'intero documento in formato PDF *qui*. Per chi fosse interessato, il documento originale in lingua inglese è disponibile *qui*.

1 Riparare il cuore

(di Michael Brehm, Bodo E. Strauer, Heinrich-Heine University, Dusseldorf, Germany)

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 dovuto 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 trans-differenziamento 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.

Capitolo a cura di: Michael Brehm, Bodo E. Strauer, Heinrich-Heine University, Dusseldorf, Germany

1.1 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 prevenendo 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, immunoistologia (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 mi-

dollo 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. - le cellule staminali autologhe del midollo osseo, prese dallo stesso paziente, possono riparare il cuore, migliorando la funzionalità cardiaca, la perfusione e il metabolismo in diversi stati patologici del cuore.

1.2 Prospettive

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 dal midollo osseo per la riparazione del miocardio non comprende solo la sostituzione del tessuto cardiaco danneggiato (per esempio, cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce), 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 mesenchimatiche 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.

1.3 Riflessioni

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 riser-

va 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.

1.4 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.

Un dossier di Traduzione a cura di Marika De Acetis, aggiornato al 15.03.2007

2 Vasi sanguigni

(di Stefanie Dimmeler, Department of Internal Medicine III, University of Frankfurt, Germany)

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 monostato 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. **Capitolo a cura di: Stefanie Dimmeler, Department of Internal Medicine III, University of Frankfurt, Germany**

2.1 Il punto della situazione

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 proces-

so 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.

2.2 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.

L'utilizzo delle 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 evi-

denze 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).

2.3 Riflessioni

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 valu-

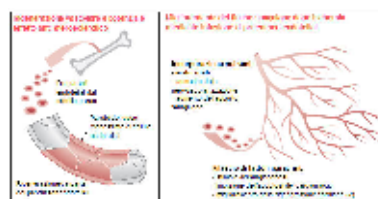
tazione accurata dei possibili effetti collaterali deve essere considerata negli studi successivi.

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 monostrato 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).

2.4 Conclusioni



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. È interessante notare che gli studi nei topi in cui le cellule staminali ed emopoietiche non possono essere mobilizzate, 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 mobilizzazione 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.

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.

3 Pelle e occhi

(di Michele De Luca, Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Modena e Reggio Emilia, Modena e Banca degli Occhi del Veneto, Centro di Ricerca sulle Cellule Staminali, Venezia)

La medicina rigenerativa, il cui obiettivo è portare al recupero permanente dei tessuti e degli organi danneggiati, è strettamente correlata 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 epitelii, 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. **Capitolo a cura di: Michele De Luca, Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Modena e Reggio Emilia, Modena e Banca degli Occhi del Veneto, Centro di Ricerca sulle Cellule Staminali, Venezia**

3.1 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 allogeni (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'inter-

no 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).

3.2 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.

3.3 Riflessioni

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 compren-

sibile, 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 riferimento (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 incorrerne 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.

3.4 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.

4 Sistema nervoso

(di Jonas Frisén, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden)

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). **Capitolo a cura di: Jonas Frisén, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden**

4.1 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 le 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 dog-

ma 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.

4.2 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 dopaminergici, 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 fun-

zionare 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). E' 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.

4.3 Riflessioni

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.

4.4 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 disorders how 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.

5 Pancreas

(di Helena Edlund, Center for Molecular Medicine, Umea University, 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

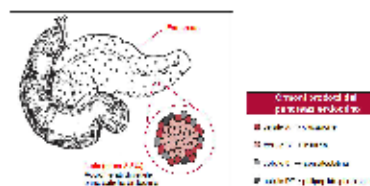
Un dossier di Traduzione a cura di Marika De Acetis, aggiornato al 15.03.2007

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. **Capitolo a cura di: Helena Edlund, Center for Molecular Medicine, Umea University, Sweden**

5.1 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 pancreatica, 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 produttrici 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 sug-

gerito 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 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.

5.2 Prospettive

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 ter-

apia 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.

5.3 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 se-

quenziale ... 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.

6 Muscolo

(di Giulio Cossu, *Fondazione San Raffaele del Monte Tabor, Stem Cells Research Institute (SCRI), Milano, Italia*)

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 composta 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 generazioni successive di pazienti affetti da DMD. **Capitolo a cura di: Giulio Cossu, Fondazione San Raffaele del Monte Tabor, Stem Cells Research Institute (SCRI), Milano, Italia**

6.1 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.

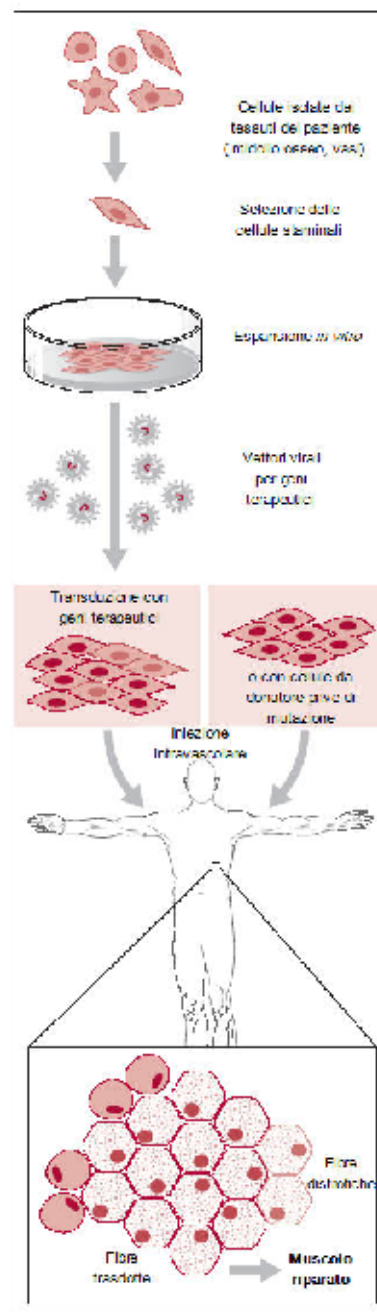
Fino a quando non saranno chiariti i meccanismi molecolari e la biologia di queste cellule, la plasticità sarà irrilevante dal punto di vista terapeutico. Nonostante ciò, negli ultimi anni sono state accumulate diverse evidenze sul fatto che diversi precursori cellulari non correlati al muscolo, come 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 cel-

lule 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 un 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.

6.2 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 sostitu-

ito 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 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.

6.3 Riflessioni

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.

6.4 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 ter-

apia 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

7 Potenzialità terapeutiche: valutazione

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

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 al-

tro) 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. **Capitolo a cura di: Frank Barry, Regenerative Medicine Institute (REMEDI), National University of Ireland, Galway, Ireland**

7.1 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 ricerche 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 mobilitate 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 cor-

retta, 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.

7.2 Prospettive e riflessioni

Assumendo che i dati iniziali 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 in-

izialmente 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.

7.3 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 es-

sere 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.

8 Aspetti commerciali

(di Thomas Okarma, Geron Corporation, California, USA)

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 espansive 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. **Capitolo a cura di: Thomas Okarma, Geron Corporation, California, USA**

8.1 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 le-

sione, 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 rimielinizzazione 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 dalle 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.

8.2 Riflessioni

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.

8.3 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

9 La prospettiva dei pazienti (di Robert Goldstein, *Juvenile Diabetes Research Foundation International (JDRF)*, New York, United States of America)

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 af-

fetti 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. **Capitolo a cura di: Robert Goldstein, Juvenile Diabetes Research Foundation International (JDRF), New York, United States of America**

9.1 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 Edmonton, 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 JDRF 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. 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 per-

messo 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 legale, 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.

9.2 Conclusioni

La JDRF si focalizza sulla ricerca di una cura per il diabete di tipo 1 e le sue compli-

cazioni, 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 importante 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>
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>

10 Glossario

(di Austin Smith, EuroStemCell European Consortium for Stem Cell Research)

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 meristem-

atica 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 spermatozoni (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'autorinnovamento (6,7).

Omeostasi cellulare. Persistenza di cellule staminali nei tessuti che funzionano da riserva per tutto il corso delle 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 cellu-

la 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). . Wang, Z. & Lin, H. Nanos maintains germline stem cell self-renewal by prevent-

ing 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).

A cura di: Austin Smith, EuroStemCell European Consortium for Stem Cell Research