

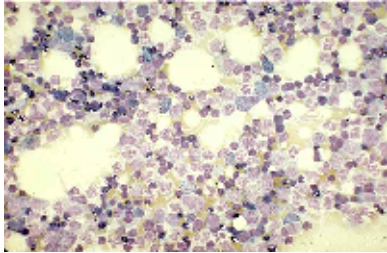
# LA RICERCA SULLE STAMINALI: RISULTATI, PROSPETTIVE, PREREQUISITI - PARTE I

## Indice

	<i>ical Research Institute, University of Edimburgh, United Kingdom.)</i>	<b>17</b>
<b>1 Panoramica</b>	5.1 Il punto della situazione . . . . .	17
<i>(di Andrew Moore, EMBO)</i>	5.2 Prospettive . . . . .	18
1.1 Il punto della situazione . . . . .	5.3 Riflessioni . . . . .	19
1.2 Prospettive . . . . .	5.4 Conclusioni . . . . .	20
1.3 Riflessioni . . . . .	<b>6 Cellule del sangue</b>	
1.4 Raccomandazioni . . . . .	<i>(di Elaine Dzierzak, Erasmus University Medical Center, Department of Cell Biology, Rotterdam, The Netherlands)</i>	<b>20</b>
<b>2 Introduzione</b>	6.1 Il punto della situazione . . . . .	21
<i>(di Andrew Moore, EMBO)</i>	6.2 Prospettive . . . . .	22
2.1 Fonti di cellule staminali . . . . .	6.3 Prospettive applicative . . . . .	23
<b>3 Le cellule staminali</b>	6.4 Riflessioni . . . . .	23
<i>(di Martin Evans, Cardiff School of Biosciences, Cardiff, United Kingdom)</i>	6.5 Conclusioni . . . . .	24
3.1 Il punto della situazione . . . . .	<b>7 Tessuto osseo</b>	
3.2 Prospettive . . . . .	<i>(di Paolo Bianco, Università La Sapienza, Roma, Italia)</i>	<b>24</b>
3.3 Riflessioni . . . . .	7.1 Il punto della situazione . . . . .	24
<b>4 Potere e potenzialità</b>	7.2 Prospettive . . . . .	27
<i>(di Austin Smith, Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research Institute for Stem Cell Biology, University of Cambridge, United Kingdom)</i>	7.3 Riflessioni . . . . .	28
4.1 Il punto della situazione . . . . .	7.4 Conclusioni . . . . .	29
4.2 Prospettive . . . . .	<b>8 Cellule staminali e tumori</b>	
4.3 Riflessioni . . . . .	<i>(di Riccardo Fodde, Department of Pathology, Josephine Nefkens Institute, Erasmus MC)</i>	<b>29</b>
4.4 Conclusioni . . . . .	8.1 Il punto della situazione . . . . .	30
<b>5 Trasferimento somatico nucleare</b>	8.2 Prospettive . . . . .	31
<i>(di Ian Wilmut, Centre for Regenerative Medicine, The Queen's Med-</i>	8.3 Conclusioni . . . . .	32

## 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.*



Questo dossier raccoglie articoli scritti direttamente dai ricercatori che in Europa lavorano con le cellule staminali, nell'ambito di un Progetto Europeo guidato dall'EMBO per la valutazione dello stato della ricerca in questo settore. Dopo una sezione introduttiva ai concetti di base per i non esperti, sono raccolti documenti monotematici su specifici sottosectori: cellule staminali da adulti e cellule staminali embrionali, clonazione, cellule staminali del sangue, relazione tra cellule staminali normali e cellule staminali tumorali, cellule staminali per la rigenerazione dei diversi tessuti del corpo (pancreas, fegato, muscolo, cuore ed altri tessuti). Oltre ad articoli scientifici, il dossier raccoglie anche l'analisi legislativa e le riflessioni sull'applicazione su larga scala di eventuali nuove terapie derivate dalle cellule staminali, nonché alcune riflessioni di natura economica. Pubblichiamo in questo dossier la versione italiana della prima parte dei documenti prodotti. Gli altri documenti sono raccolti nel dossier "La ricerca sulle staminali: risultati, prospettive, prerequisiti - Parte II".

E' possibile scaricare l'intero documento in italiano in formato PDF *qui*. Il documento originale, in lingua inglese, si può scaricare *qui*.

# 1 Panoramica

(di Andrew Moore, EMBO)

Questo documento nasce dal contributo di specialisti in diverse aree della ricerca e delle applicazioni in medicina delle *cellule staminali* e di un gruppo di pazienti che ... oltre ad aver scritto gli articoli che compongono questo testo ... hanno partecipato ad un incontro di consultazione organizzato dall'*EMBO* nell'aprile del 2006. Questo documento riassuntivo contiene un'Introduzione sulle cellule staminali e alla sua terminologia per non esperti e le contestualizza nell'attuale ricerca scientifica per la produzione di conoscenza, con un occhio di riguardo alla rilevanza per le più importanti malattie non infettive e al valore economico. Inoltre, contiene alcuni suggerimenti per stabilire linee guida in grado di permettere alla ricerca europea di esprimere il proprio potenziale.

Gli aspetti trattati sono:

**1) i concetti di base e le tecniche:** - la natura delle cellule staminali e la loro differenziazione in specifici tipi cellulari; - le cellule staminali embrionali: potenza e potenzialità; - il trasferimento nucleare di cellule somatiche per la produzione di cellule staminali embrionali.

**2) la ricerca suddivisa per specifiche tipologie di cellule e tessuti:** - il sangue; - il tessuto osseo; - il cancro (modello delle cellule staminali); - il muscolo cardiaco; - gli endoteli che rivestono i vasi sanguigni; - il cervello e il sistema nervoso; - il pancreas; - il muscolo scheletrico.

**3) dalla teoria alla terapia:** - valutare le potenzialità terapeutiche delle cellule staminali; - sviluppi economici delle cellule staminali embrionali: un report dalle compagnie che operano negli Stati Uniti; - Prospettive per un'organizzazione internazionale di pazienti. **Capitolo a cura di: Andrew Moore, EMBO**

## 1.1 Il punto della situazione

Sono note diverse applicazioni delle cellule staminali per la terapia nell'uomo, sperimentate

e validate: dai trapianti di midollo osseo ad applicazioni più recenti per la rigenerazione della pelle e della cornea.

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

Accanto a questi tipi di studi, la ricerca sulle cellule staminali ottenute dai primi stadi dello sviluppo embrionale ha identificato delle cellule primordiali progenitrici in grado di produrre tutti i tessuti presenti in un individuo adulto (cellule pluripotenti). Le cellule staminali embrionali (cellule ES, *embryonic stem*) sono estremamente potenti ma anche difficili da controllare allo stato attuale delle conoscenze. Dal momento che le cellule staminali derivate dai tessuti di individui adulti possono dare luogo ad un numero ristretto di tipologie cellulari, c'è un grande interesse nella possibilità di trasformare le cellule adulte in cellule staminali pluripotenti. Questo può essere ottenuto sia attraverso la tecnica del trasferimento nucleare di cellule somatiche ... utilizzato, per esempio, per generare la pecora Dolly ... sia con altri metodi. Questo tipo di studi è ancora all'inizio, ma può offrire grandi possibilità per la medicina rigenerativa del futuro.

La ricerca sulle cellule staminali embrionali e da adulti sta sensibilmente contribuendo all'accrescimento della conoscenza su entrambi i tipi di cellule staminali. Inoltre, apre le porte a possibilità di sviluppo di terapie per malattie che colpiscono diversi tipi di tessuti, come importanti patologie quali il diabete di tipo I e il Parkinson. Infine, questo tipo di ricerca sta anche aumentando la nostra conoscenza sulla biologia del cancro, il quale può insorgere in seguito a mutazioni nelle cellule staminali. Attualmente, ci sono pochissimi sviluppi commerciali e l'interesse dell'industria in Europa è estremamente basso per il settore della ricerca delle cellule staminali. Un importante fattore responsabile di questo limitato interesse è l'interpre-

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

## 1.2 Prospettive

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

Alcune delle terapie basate sulle cellule staminali attualmente disponibili sono già in fase di studio preclinico negli animali. Per quanto riguarda la pelle e il sangue, la ricerca sulle cellule staminali sta già facendo un ulteriore passo avanti, applicando alla terapia cellulare anche la correzione dei geni malfunzionanti coinvolti in alcune malattie ereditarie. Nei prossimi 2-5 anni, è probabile che molte terapie basate sulle cellule staminali saranno sperimentate in trial clinici, soprattutto per quanto riguarda la rigenerazione del tessuto muscolare e la riparazione di fratture ossee. Nella ricerca per una cura per il diabete di tipo I, c'è un crescente interesse sulle fonti delle cellule staminali embrionali ... embrioni, feti o adulti ... che possono essere usate per rinnovare a scopo terapeutico le cellule beta del pancreas che producono l'insulina. Nel sistema circolatorio è in aumento l'impiego terapeutico del trapianto di midollo osseo o di sangue derivato dal cordone ombel-

licale. Questo tipo di ricerche potrà condurre ad una migliore comprensione delle cellule cancerose responsabili della leucemia, e attraverso queste, allo sviluppo di terapie farmacologiche più accurate.

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

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

In realtà, esistono poche evidenze di presenza costante e diffusa di cellule pluripotenti nei tessuti adulti. Pertanto, uno dei principali obiettivi della ricerca sulle cellule staminali è trovare il modo di riprogrammare una cellula adulta in modo che diventi pluripotente. Il trasferimento nucleare è un modo per ottenere questo risultato. Questa tecnica sarà presto usata per creare

delle cellule staminali embrionali da pazienti per studiare le malattie che colpiscono i motoneuroni (nell'ambito degli studi sulla sclerosi laterale amiotrofica). Altre gravi malattie degenerative ereditarie potrebbero essere affrontate con questo approccio ... in questo contesto, la chiave di volta è la comprensione delle basi delle malattie ereditarie per le quali i geni coinvolti non sono ancora stati identificati, oppure non esiste ancora un buon modello di studio. La ricerca con le cellule staminali embrionali potrebbe portare anche alla comprensione dei meccanismi per riprogrammare e accelerare lo sviluppo di metodi che non richiedono il trasferimento nucleare in uova denucleate.

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

### 1.3 Riflessioni

Nonostante lo sviluppo di applicazioni basate sulle cellule staminali è talvolta presentato come una scelta tra la ricerca con cellule staminali embrionali o con cellule staminali da adulto, gli avanzamenti biomedici possono provenire indifferentemente da entrambi gli approcci.

E' noto che le cellule staminali embrionali sono pluripotenti, cioè hanno la capacità di dar luogo a qualsiasi tipo cellulare nel corpo. Nonostante ciò, questa potenza è offuscata dalla mancanza di certezze sulla loro stabilità in uno stato differenziato o parzialmente differenziato.

Inoltre, sono noti solo un numero limitato di segnali necessari per ottenere il differenziamento definitivo. Le cellule staminali da adulto, nonostante abbiano un ambito ristretto di tipi

cellulari che possono generare, si possono controllare facilmente, soprattutto proprio perché hanno poche potenzialità. Ad ogni modo, diversi studi hanno dimostrato che la ricerca in un settore produce benefici che ricadono anche nell'altro settore. Pertanto, è importante sostenerle entrambe.

Le cellule staminali sono un'entità che deve essere compresa e manipolata in laboratorio prima di essere introdotta nel paziente. In generale, l'effetto diretto delle cellule staminali sulla rigenerazione è dovuto alla proliferazione e differenziazione delle cellule nel tessuto desiderato. In alcuni casi, comunque, il trapianto di cellule può avere effetti benefici indiretti, dovuti a segnali antinfiammatori e di crescita emessi dalle cellule, chiamato anche effetto bystander (effetto del vicino).

E' necessaria molta ricerca sulle caratteristiche e sulla fisiologia dei tessuti per comprendere a fondo come l'introduzione di cellule staminali interagisca con il tessuto ospite e a che cosa si possa ricondurre l'essenza del potere rigenerativo. Questo tipo di ricerche rappresenta una base per l'ottimizzazione delle strategie terapeutiche. Alcuni tipi di rigenerazione tissutale possono richiedere l'introduzione di due o più tipi cellulare diversi per ottenere un beneficio clinico ottimale. In altri casi, può essere efficace somministrare semplicemente una miscela di citochine al posto delle cellule, oppure utilizzare un approccio misto con cellule e citochine.

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

cazioni (per esempio, per il muscolo scheletrico e il rivestimento dei vasi sanguigni), l'infusione di cellule staminali nel sistema circolatorio può essere utilizzata come via di somministrazione. Però, nella maggior parte delle applicazioni delle terapie basate sulle cellule è molto probabile sia necessaria l'introduzione diretta nel sito della riparazione/rigenerazione. Questo richiede tecniche ed equipaggiamenti disegnati specificamente per ogni applicazione clinica, e l'applicazione di sofisticate tecniche di imaging per tracciare le cellule introdotte.

Inoltre, diversi approcci sperimentali ... soprattutto nella riparazione del tessuto osseo e delle cartilagini ... sono basati sull'utilizzo di matrici di supporto in cui le cellule crescono prima di essere impiantate. La ricerca su questi materiali biocompatibili dovrebbe stare al passo con quella sulle cellule staminali e la produzione dovrebbe essere scalata per soddisfare la domanda. Sia nella ricerca di base che in quella clinica, è necessario sviluppare le tecniche di selezione delle popolazioni di cellule staminali vere, che sono rare, tra una miscela di precursori parzialmente differenziati, notevolmente più abbondanti. Questa separazione delle cellule è importante per aumentare l'efficacia e la specificità delle cellule utilizzate per la somministrazione. Inoltre, in molti casi, non è ancora noto se i precursori coltivati in vitro siano ancora in grado di differenziarsi e di funzionare in modo appropriato dopo il trapianto. Ovviamente, una produzione sufficientemente abbondante e il controllo della qualità sono prerequisiti per l'applicazione clinica sicura delle terapie cellulari.

Comunque, l'efficacia delle cellule individuate per la terapia è, alla fine dei conti, importante quanto la sicurezza. Le cellule che sono sottoposte a controlli regolatori interni molto selettivi lo fanno ad un prezzo: possono perdere una parte dei componenti che gli conferiscono le potenzialità di rigenerare i tessuti, e dopo il trapianto potrebbero non comportarsi come desiderato. E' pertanto necessario mantenere le cellule in uno stato appropriato per evitare di compromettere la funzionalità delle cellule staminali prima del trapianto.

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

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

Uno dei principali problemi per la ricerca sulle cellule staminali, in particolare su quella su cellule staminali embrionali umane, è il blocco legislativo per il libero scambio di materiali e la collaborazione a livello internazionale. La legislazione in merito è molto diversa tra le nazioni in Europa, impedendo a questo settore di ricerca di beneficiare degli avanzamenti scientifici raggiunti a livello internazionale. In alcune nazioni, i ricercatori possono effettuare ricerche con un numero limitato di cellule staminali embrionali umane, ma non possono proseguire le ricerche su altre linee cellulari staminali umane sviluppate da collaboratori in altre nazioni dell'Europa.

Per quanto riguarda il discorso del valore economico e dei brevetti, i ricercatori che lavorano sulle cellule staminali europee hanno a disposizione lo strumento della protezione della proprietà intellettuale relativa alla manipolazione di linee staminali embrionali già stabilizzate e di derivati differenziati, ma non derivate dagli embrioni umani. L'attuale linea dell'Ufficio Eu-

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

In accordo all'attuale linea dell'EPO, sono esclusi dalla brevettabilità tutte le richieste per prodotti il cui processo richiede l'uso diretto o indiretto di embrioni umani, comprese le cellule derivate dagli embrioni. Stabilire se questa interpretazione sia corretta o meno, e, in particolare, che sia corretta in merito all'esclusione dalla brevettabilità delle linee staminali embrionali umani già stabilizzate ... molto diverse dalle originali che costituivano l'embrione ... è una decisione che dipende dall'EPO stessa, che, probabilmente, non risolverà prima del 2008.

Se l'interpretazione finale includerà anche la 23d(c), potrebbero essere esclusi dalla brevettabilità anche tutte le applicazioni e le tecnologie che coinvolgono le cellule staminali embrionali, con importanti conseguenze negative sugli investimenti commerciali futuri in questo settore in Europa. Questa situazione peculiare ... i brevetti sulle cellule staminali sono concessi praticamente ovunque nel mondo, compresi gli Stati Uniti ... e la mancanza di un verdetto risolutivo dell'EPO, induce i ricercatori e le aziende a registrare i brevetti a livello di singole nazioni. Per via delle differenze peculiari tra le nazioni e del problema dell'interpretazione della Direttiva Europea sulle Biotecnologie, l'intero processo rischia di andare in contrasto con gli strumenti progettati, previsti proprio dalla Direttiva, per ottenere l'armonizzazione attraverso l'intera Europa, con il rischio di scaturire in processi legali alla Corte Europea di Giustizia.

Riassumendo, l'attuale situazione della proprietà intellettuale è così complessa e lontana da una risoluzione finale, che l'incentivo, se esiste, per il coinvolgimento di aziende durante lo sviluppo di applicazioni che fanno uso di cel-

lule staminali in Europa è minimo. Negli Stati Uniti e in altre nazioni in cui i brevetti sulle cellule staminali sono già assegnati, gli investitori e le aziende si stanno concentrando in questo settore. Questa situazione mette il settore europeo delle biotecnologie in svantaggio nei confronti dei competitori globali e può riflettersi con conseguenze negative per l'economia e la salute.

#### 1.4 Raccomandazioni

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

1. Dovrebbe essere riconosciuto che la ricerca sulle cellule staminali ha un enorme valore in termini prospettici di ricaduta sulla salute, sulla produzione di conoscenza e sullo sviluppo economico. Inoltre, la ricerca sulle cellule staminali embrionali dovrebbe essere integrata all'interno dei grandi filoni della ricerca biomedica, come lo studio in vitro e in vivo delle malattie, lo studio della degenerazione cellulare, lo sviluppo di farmaci e le piattaforme per lo studio della tossicità e per lo sviluppo di terapie rigenerative.

2. La ricerca su cellule staminali embrionali e da adulto sono complementari e dovrebbero essere supportate entrambe; analogamente, si dovrebbe supportare anche la ricerca per comprendere il processo di riprogrammazione del nucleo che si verifica durante il trasferimento nucleare, la fusione cellulare e in altre tecniche.

3. La comunicazione e la formazione sulla ricerca su cellule staminali e sulle applicazioni derivanti dovrebbero essere promosse con un'attiva partecipazione di scienziati, medici, esperti di etica, legislatori e gruppi di interesse di pazienti.

4. La proprietà intellettuale in merito all'utilizzo delle cellule staminali embrionali umane e delle linee derivate dovrebbe essere brevettabile per incoraggiare lo sviluppo dell'industria e favorire il passaggio dalla ricerca di base a quella applicata.

5. La legislazione sulle cellule staminali e relative applicazioni dovrebbe essere chiarita e armoniz-

zata tra le varie nazioni, e, dove possibile, gli ostacoli legislativi alla libera collaborazione internazionale tra gli scienziati dovrebbero essere rimossi.

6. Le richieste legislative dovrebbero essere formulate in modo accurato, in modo che non siano eccessivamente stringenti e che non ci siano ingiustificate barriere burocratiche o economiche all'applicazione clinica delle cellule staminali, come accade attualmente.

7. Si dovrebbe sviluppare misure efficaci di valutazione e procedure standard per l'utilizzo clinico delle cellule staminali. Nello stabilire le procedure cliniche, le misure di valutazione dovrebbero prevedere tanto misure di valutazione dell'efficacia che della sicurezza.

8. Si dovrebbe promuovere la costituzione di banche dati di cellule staminali con alti livelli di qualità e dovrebbe essere facilitato l'accesso a livello internazionale di scienziati e aziende.

9. Si dovrebbe promuovere una maggiore armonizzazione e interconnessione dei trial clinici in Europa, per facilitare studi comparabili e la valutazione di tutte le terapie disponibili (comprensivi, ma non solo, le cellule staminali). Questo dovrebbe essere fatto nell'ottica di benefici che ricadono su tutti i cittadini e dovrebbe essere finanziato con fondi pubblici.

10. Si dovrebbero fare investimenti sullo sviluppo della tecnologia per permettere la produzione su larga scala di cellule staminali per applicazioni nello screening farmacologico, per i test tossicologici e per il trapianto di cellule.

## 2 Introduzione

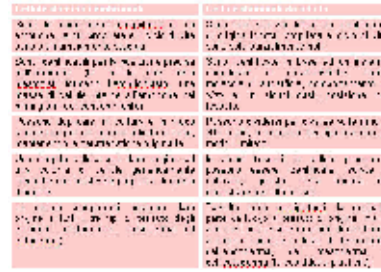
(di Andrew Moore, *EMBO*)

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

questo oggi possiamo pensare di usare le cellule staminali in terapia solo perché c'è stata una moltitudine di ricerche che ci hanno fornito le basi scientifiche. Nel contempo, l'applicazione delle cellule staminali è diversa da qualsiasi altra strategia terapeutica applicata su ampia scala. L'utilizzo delle cellule staminali, in particolare di quelle embrionali, rientra nella tecnologia di trasferimento della postgenomica, che ha le sue premesse nel progetto di sequenziamento del genoma umano. Le aziende negli Stati Uniti utilizzano già i dati provenienti dalla genomica per identificare e derivare linee di cellule staminali embrionali. Nonostante la loro natura rivoluzionaria, il concetto di utilizzare le cellule staminali per scopi terapeutici ha molto in comune con i principi che stanno alla base della moderna trapiantologia d'organi; invece di introdurre un intero organo in un paziente, si inserisce solo una determinata popolazione di cellule. Inoltre, se queste cellule derivano dallo stesso individuo, non si pone il problema della reazione immunitaria. Alcune terapie cellulari già ampiamente sperimentate che utilizzano le cellule staminali possono essere considerate come una strategia intermedia tra il trapianto d'organo e il trapianto di cellule: tra queste, per esempio, il trapianto di midollo osseo e il trapianto delle isole pancreatiche (contenenti le cosiddette cellule beta, che producono l'insulina nel pancreas). La tecnologia dei trapianti ha permesso alla medicina di curare i pazienti in modi che la sola la chirurgia e farmacologia non avrebbero potuto fare; lo stesso si può pensare che accada, in prospettiva, della tecnologia delle cellule staminali. Inoltre, le cellule staminali possono essere potenzialmente impiegate in un ampio spettro di malattie, comuni e rare, e in tutte le fasce d'età (per esempio, artrite reumatoide, distrofia muscolare di Duchenne e deficienze immunitarie congenite). Esistono casi ampiamente sperimentati nell'utilizzo clinico delle cellule staminali. Per esempio, migliaia di pazienti hanno beneficiato del trapianto di midollo osseo. Durante la Guerra Fredda, la paura di una guerra nucleare ha accelerato la ricerca per la riparazione dei tessuti umani che sono particolarmente soggetti al danno da radiazione (ovvero, i tessuti che si autorigenerano

continuamente durante la vita), come il sangue. Il primo successo nel trapianto di midollo osseo ha avuto come esito la sopravvivenza a lungo termine di un paziente affetto da leucemia (il cui midollo osseo malato era stato distrutto dalla radioterapia, prima del trapianto) ed è stato condotto nel 1956 dal Dr. E. Donnall Thomas a New York; in questo modo, il principio è stato trasformato in un'applicazione clinica in grado di salvare la vita dei pazienti. Altri progressi sono stati fatti da altri ricercatori nel 1968 (con il primo trapianto di midollo osseo da donatore per curare una malattia diversa dal cancro) e nel 1973 (con il primo trapianto di midollo osseo da donatore non appartenente alla stessa famiglia). Oggi, migliaia di vite sono salvate grazie al trapianto di pelle per trattare le ustioni e migliaia di occhi sono salvati dalla cecità grazie all'utilizzo delle cellule staminali della cornea. In certi casi di danno alla cornea, il trapianto tradizionale non è efficace, semplicemente perché non rigenera come fa un tessuto normale. Le cellule staminali possono aiutare a superare questo problema. Un numero significativo di malattie che potrebbero essere trattate con le cellule staminali sono dovute a geni alterati che manifestano il proprio effetto in un tessuto particolare o in una sottopopolazione di cellule del paziente. Utilizzare cellule staminali, in cui è stata corretta l'anomalia nel gene non funzionale nel paziente, è un'interessante alternativa al metodo classico che utilizza i vettori virali per trasferire il gene riparato in situ. Si registrano successi per quanto riguarda le cellule staminali modificate geneticamente in trial clinici per almeno una grave e debilitante malattia della pelle. Le cellule staminali sono molto diverse per quel che riguarda il modo di ottenerle, la capacità proliferativa e il differenziamento nelle cellule adulte a cui possono dare origine. **Capitolo a cura di: Andrew Moore, EMBO**

## 2.1 Fonti di cellule staminali



Le cellule staminali da adulto possono essere ottenute dalle cosiddette nicchie presenti nei tessuti adulti (alcune di queste cellule sono state identificate in molti tessuti, dal cervello al muscolo) 1. Cellule staminali fetali (per esempio, da feti abortiti o dal cordone ombelicale) 2. Cellule staminali embrionali: - da embrioni non utilizzati nella fecondazione in vitro -attraverso il trasferimento nucleare, noto anche come trasferimento nucleare di cellule somatiche, in cui il nucleo di una normale cellula del corpo è inserito in un uovo fecondato da cui è stato rimosso il nucleo originario. L'ambiente presente dentro l'uovo fecondato permette di azzerare il nucleo trasferito ad uno stadio primordiale. Spesso si sente citare l'ipotesi che le cellule staminali adulte possano rimpiazzare le cellule staminali embrionali ... ponendo fine alle problematiche etiche nell'utilizzo di quest'ultime. Le potenzialità di una cellula staminali adulta per risolvere dei problemi non devono essere sopravvalutate, soprattutto perché (come mostrato nel box 1) non è ancora del tutto nota la natura delle cellule staminali presenti in molti tessuti. La ricerca sulle cellule staminali embrionali contribuisce alla conoscenza delle cellule staminali embrionali e viceversa. E' necessaria, e con urgenza, molta più ricerca per scostarsi dalla posizione attuale d'incertezza in merito ai benefici e meriti relativi dell'applicazione delle diverse cellule staminali. L'utilizzo di animali nella ricerca sulle cellule staminali si è dimostrato un aspetto insostituibile e molto importante. Dal primo esperimento sul trapianto di midollo osseo agli esperimenti odierni basati sulla genomica (per definire la natura genetica delle cellule staminali e del loro sviluppo), gli esperimenti sugli animali sono diventati indispensabili. Quando si tratta di applicazioni

terapeutiche, non esiste un'autorità regolatoria (né l'americana FDA né l'europea EMEA) che approvi una procedura applicativa senza il supporto dei risultati di test preclinici sulla sicurezza e sulla tossicità condotti sugli animali. Per permettere alla terapia con cellule staminali di entrare in clinica, devono essere effettuati molti più sforzi. Esistono molte questioni aperte per quanto riguarda il metodo di somministrazione delle cellule. Il metodo, la via e il sito di introduzione in un paziente sono probabilmente specifici del tipo particolare di cellula staminale e dell'impiego. Le potenzialità per la somministrazione locale potrebbero essere ampiamente aumentate grazie allo sviluppo della tecnologia dei cateteri, aumentando la sicurezza. L'infusione di cellule nel sangue in modo che possano raggiungere il target desiderato è probabilmente uno degli impieghi minori (per esempio, per il trapianto di vasi sanguigni o altre parte direttamente accessibili di un sistema vascolare). Nell'applicazione clinica, probabilmente le cellule staminali dovrebbero essere almeno parzialmente differenziate prima di essere introdotte in un paziente. L'introduzione di cellule staminali indifferenziate dovrebbe essere limitata a casi rari ed eccezionali. Le cellule pre-differenziate sono un materiale più controllato, già pronte per la trasformazione nel tessuto desiderato. Non mancano casi interessanti già applicati che si avvalgono di cellule staminali, per esempio, la terapia a base di cellule staminali per rigenerare l'epidermide è ormai una procedura effettuata correntemente con successo. Dal momento che le cellule staminali sono un sistema così importante per la terapia, è importante considerare che il loro studio permette ai ricercatori di indagare anche quali sistemi si attivano in una cellula staminale quando ripara un danno dall'interno di un organismo. Le ricerche attuali sulla distrofia muscolare e sull'atrofia muscolare sono un esempio dei risultati di questo tipo di studi. Inoltre, le cellule staminali sono importanti per la ricerca anche per le loro caratteristiche generali, perché aiutano i ricercatori nella comprensione del cancro, della biologia dello sviluppo, della farmacologia, delle malattie degenerative e dei meccanismi di mantenimento di funzioni fisiologiche normali, per menzionare alcune delle

possibili applicazioni. Le cellule staminali, per la loro proprietà di differenziare nei diversi tipi cellulari che si trovano in un organismo, sono un materiale ideale per testare i farmaci: per esempio, per lo studio dell'effetto terapeutico su uno specifico tipo cellulare, per l'identificazione di effetti collaterali prevedibili con l'analisi in vitro e per il metabolismo epatico. In linea teorica, le cellule staminali derivate da una persona potrebbero essere utilizzate per tracciare un profilo della risposta biologica ad un farmaco. Questo uso delle cellule staminali è probabile che possa diventare un settore di applicazione molto grande, con un impatto significativo sull'aumento della sicurezza nei trattamenti terapeutici. La tecnica del trasferimento nucleare ha delle potenzialità molto interessanti per studiare come i diversi tessuti si comportano in presenza di una malattia particolare, o in seguito al trattamento con determinati farmaci. Il trasferimento nucleare potrebbe rendere possibile la produzione controllata di cellule geneticamente identiche, ma funzionalmente diverse, da uno stesso individuo. Inoltre, potrebbe essere utilizzato per studiare le malattie orfane, che colpiscono poche persone e di cui, pertanto, esistono pochi campioni clinici su cui condurre le ricerche.

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

### 3 Le cellule staminali

(di *Martin Evans, Cardiff School of Biosciences, Cardiff, United Kingdom*)

Le cellule staminali sono un componente fondamentale durante lo sviluppo embrionale e fetale, il mantenimento, la rigenerazione e la riparazione dei tessuti. Le cellule staminali sono centrali anche per lo sviluppo e la crescita dell'uomo e sono anche fonti importanti di nuove cellule per la rigenerazione terapeutica in seguito a malattie o danni ai tessuti. Il corpo è costituito da un grande numero di cellule funzionalmente specializzate (tecnicamente si dice differenziate), che sono organizzate a formare specifici tessuti e organi. Durante lo sviluppo e la vita, molti tessuti sono in grado di autoripararsi in seguito ad un danno. Questo processo che conduce alla rigenerazione e alla riparazione dipende da una popolazione di cellule di riserva che si dividono lentamente per automantenersi ma che possono proliferare per fornire i precursori commissionati per uno specifico tipo di cellula differenziata. Queste popolazioni di cellule staminali sono specializzate (commissionate) per dare luogo a cellule con uno specifico destino di differenziamento. Nonostante siano stati fatti alcuni studi che hanno dimostrato che le cellule staminali estratte da un tessuto sono in grado di ripopolare altri tessuti, questi risultati sono controversi. Nondimeno, cellule staminali specifiche di un determinato tessuto, quindi altamente specializzate, sono quello di cui si ha bisogno se si vuole effettuare una terapia a base di cellule, sempre che siano isobili in numero sufficiente. Nei primi stadi dello sviluppo sono presenti popolazioni di cellule in grado di dividersi con potenzialità molto ampie di sviluppo (ma non tutte queste popolazioni cellulari diventano cellule staminali proliferanti, cioè in grado di dar luogo ad un numero elevato di divisioni cellulari). Se questo è abbastanza ovvio, non lo è il momento in cui, durante la progressione da una singola linea cellulare totipotente si passa a molte linee cellulari con destini più ristretti, in cui il ciclo mitotico e il destino cellulare restano intatti. Ad ogni modo, le cellule

staminali embrionali sono state isolate originariamente da un embrione di topo e solo in seguito da un piccolo numero di altre specie, tra cui l'uomo. Le cellule staminali embrionali sono pluripotenti, cioè sono alla base dell'albero del differenziamento e mantengono la potenzialità embrionale di dare origine a molti, se non tutti, i tipi cellulari. Il vantaggio potenziale delle cellule staminali riguarda la loro capacità di essere isolate, di duplicarsi un numero elevato di volte e di essere in grado di differenziare in altri tipi cellulari del corpo. Questo permette di avere a disposizione una strategia per ottenere una popolazione di cellule precursori, che possono essere impiegate per la terapia rigenerativa di tessuti adulti danneggiati per i quali non esistono altre fonti endogene o sufficienti. Il trapianto dei tessuti è associato al rischio di reazioni immunologiche e rigetto, a meno che le cellule donatrici non siano immunologicamente correlate o idealmente identiche a quelle del paziente. Uno scenario affascinante (a cui si devono molti degli sforzi in questo settore) riguarda la produzione di una fonte di cellule staminali embrionali, geneticamente identiche al paziente dal per il quale è necessario sviluppare dei precursori specializzati di cellule di determinati tessuti. Questo può avvenire grazie alla ...sdifferenziazione... di una cellula del paziente allo stadio di staminale embrionale. Il solo metodo attualmente noto, che funziona nel modello animale, è il trasferimento nucleare in un oocita e la derivazione dall'embrione che si sviluppa da esso di una linea cellula di cellule staminali embrionali. Questa tecnica di trasferimento nucleare può essere utilizzata per generare una linea cellulare specifica e personalizzata per ogni paziente. La possibilità di questo scenario, che coinvolge la generazione di un embrione mediante il trasferimento del nucleo di una cellula adulta in un oocita enucleato, per ottenere una linea di cellule staminali embrionali, dalla quale ottenere cellule per ripopolare i tessuti di un organismo adulto, è stato ampiamente dimostrato nel topo (2).

**Capitolo a cura di: Martin Evans, Cardiff School of Biosciences, Cardiff, United Kingdom**

### 3.1 Il punto della situazione

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

### 3.2 Prospettive

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

queste ragioni, l'Europa dovrebbe mantenersi all'avanguardia nella ricerca e applicazione delle cellule staminali. A tal fine, abbiamo bisogno di una regolamentazione che facilita gli avanzamenti e previene gli abusi, e in cui il cittadino nutra fiducia. In assenza di un quadro etico e legale, con considerazioni separate sull'intervento sulla riproduzione in laboratorio e la biologia cellulare terapeutica. Le cellule staminali embrionali dovrebbero essere considerate come un tipo di cellula, non come un embrione. E' noto che il nucleo di una cellula adulta può essere riprogrammato ... ovvero, il differenziamento può essere revertito, ma abbiamo a disposizione un solo metodo al momento: il trasferimento del nucleo in un oocita. I nuclei possono anche essere sdifferenziati usando la fusione cellulare. Stiamo comprendendo la maggior parte dei fattori che determinano la stabilità e lo stato differenziato, e sappiamo che sono entrambi reversibili. I metodi per differenziare direttamente i nuclei delle cellule somatiche sono ancora in via di sviluppo. Ad ogni modo, dal momento che i prodotti terapeutici sono popolazioni di cellule precursori commissionati, abbiamo bisogno di maggiori conoscenze in merito all'induzione e validazione del differenziamento cellulare. E' importante investire pesantemente nelle cellule e nella biologia dello sviluppo utilizzando sia organismi modello (principalmente il topo) che cellule umane in coltura.

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

### 3.3 Riflessioni

Il fiasco del team di Hwang ha portato alla luce sia i problemi pratici che etici dell'approccio basato sul trasferimento nucleare. Il principale ostacolo potrebbe essere etico per il reperimento di un numero sufficiente di oociti. La derivazione di un embrione per trasferimento nucleare deve essere perfezionata, per diventare efficiente, ed è necessaria molta ricerca ulteriore prima che questo possa essere fatto. Al fine di produrre una terapia cellulare, la fonte deve essere istocompatibile con il paziente. L'approccio personalizzato può essere ottenuto mediante clonazione o altro metodo di sdifferenziamento, ma attualmente esistono altre vie più praticabili. Se fosse possibile istituire una grande banca di cellule staminali embrionali geneticamente diversi, sarebbe possibile trovare, probabilmente, per molti pazienti il corretto match. Un altro approccio potrebbe essere avere una banca di cellule più piccola, pre-caratterizzata in modo da avere un assortimento tale da essere tollerata per il trapianto da molti pazienti. Il calcolo del numero di linee cellulari necessarie per un'associazione accettabile per il paziente è sorprendentemente piccolo (6). Questa banca, progettata con cura, potrebbe essere prodotta a partire da embrioni ottenuti mediante fecondazione in vitro di soggetti selezionati. Questo, da solo, presenta dei grossi problemi etici, persino maggiori dell'utilizzo del trasferimento nucleare. Al fine di rendere possibile l'applicazione terapeutica, devono essere stabilite delle linee cellulari, validate e mantenute in accordo alla regola di Buona Pratica di Produzione.

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

Bibliografia 1: Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004 Mar 5;116(5):639-48. 2: Hochedlinger, K., W.

M.Rideout, et al. (2004)...Nuclear transplantation, embryonic stem cells and the potential for cell therapy....*Hematol J* 5 Suppl 3: S114-7. 3: Dennis Normile, Gretchen Vogel, and Jennifer Couzin CLONING: South Korean Team's Remaining Human Stem Cell Claim Demolished *Science* 13 January 2006: Vol. 311. pp. 156 - 157 4: Cibelli JB, Lanza RP, West MD, Ezzell C. The first human cloned embryo. *Sci Am*. 2002 Jan;286(1):44-51. 5: Stojkovic, M., P. Stojkovic, et al. (2005). ...Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes....*Reprod Biomed Online* 11(2): 226-31.

## 4 Potere e potenzialità

(di Austin Smith, Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research Institute for Stem Cell Biology, University of Cambridge, United Kingdom)

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

## 4.1 Il punto della situazione

La nostra capacità di produrre le cellule staminali si basa sulle ricerche effettuate per studiare le proprietà di *tumori*, i teratocarcinomi, che contengono numerosi tessuti specializzati, quali capelli, denti e tessuti intestinali (1). I teratocarcinomi contengono anche cellule non specializzate.

Negli anni Settanta del Novecento, è stato scoperto che sono dovuti a cellule staminali cancerose. Ognuna di esse è in grado di dare origine a tutte le cellule specializzate che si trovano nei tumori. Pertanto, sono pluripotenti. Inoltre, possono essere coltivate in laboratorio.

Nel contempo, è stato scoperto che impiantando embrioni precoci di topi, prelevati dall'utero, in altri tessuti, si sviluppano dei teratocarcinomi. Queste osservazioni accentuano l'interesse per la produzione di cellule staminali pluripotenti direttamente dall'embrione. Questo è stato fatto per la prima volta nei topi nel 1981 e quindi nei primati, uomo compreso, negli anni Novanta del Novecento.

Le cellule staminali sono derivate da embrioni precoci chiamati *blastocisti*. Le blastocisti sono lo stadio che precede l'impianto nell'utero per la formazione di tessuti specializzati. Possono contenere fino ad oltre 100 cellule non specializzate, pluripotenti, le fondatrici dell'intero organismo qualora l'embrione si impianta nell'utero e si sviluppa. Le cellule pluripotenti nell'embrione non sono in grado di automantenersi dopo l'impianto, ma si trasformano in cellule specializzate, con un processo definito differenziamento. Nel laboratorio, comunque, è possibile indurre uno stato definito di automantenimento, in cui le cellule si moltiplicano senza differenziarsi.

La capacità delle cellule staminali di automantenersi dipende da segnali specifici indotti da molecole chiamate *fattori di trascrizione*. L'automantenimento delle cellule staminali può essere indotto artificialmente in laboratorio, e se le cellule staminali embrionali del topo sono reinserite in una blastociste, smettono di automantenersi e rientrano nel normale percorso di sviluppo, differenziandosi in tutti i tipi cellulari

che caratterizzano i tessuti dei feti.

Gli animali che si sviluppano da queste blastocisti presentano in molti tessuti, sparsi per l'organismo, cellule derivate dalle cellule staminali embrionali introdotte artificialmente. Questi animali sono definiti chimere. Comunque, nonostante le cellule staminali embrionali possono contribuire allo sviluppo di tessuti e organi del topo, lo possono fare solo con il supporto delle altre cellule che compongono la blastociste in cui sono inserite. Pertanto, non sono totipotenti.

Le cellule staminali embrionali umane sono prodotte con un metodo simile a quelle murine, utilizzando blastocisti soprannumerarie derivate dalla fecondazione in vitro, o da blastocisti difettive individuate con l'analisi genetica preimpianto. In seguito al consenso informato, questi embrioni possono essere donati alla ricerca nelle nazioni in cui è permessa la derivazione delle cellule staminali embrionali. Le cellule staminali embrionali clonali possono differenziare in un ampio spettro di tipi cellulari, pertanto sono pluripotenti. E' interessante notare che le cellule staminali embrionali di topo e di uomo richiedono diverse condizioni per mantenere la capacità di automantenersi in vitro.

Inoltre, per ragioni etiche, non è ancora noto se le cellule staminali embrionali possano contribuire alla formazione di chimere. E' un caso un po'infelice, quindi, che a cellule provenienti da due specie diverse è stato dato lo stesso nome prima che sia stata dimostrata un'identità comune (2).

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

## 4.2 Prospettive

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

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

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

Un problema attuale da affrontare è la comprensione delle differenze tra la biologia dello sviluppo di base nel topo e nell'uomo durante le prime fasi embrionali, ma è comunque ragionevole pensare che la produzione controllata e scalabile di popolazioni di cellule differenziate da cellule staminali embrionali si svilupperà in pochi anni. In questo modo, saranno a disposizione dei ricercatori e delle aziende biofarmaceutiche una nuova risorsa per la scoperta e lo sviluppo di farmaci.

Il differenziamento diretto in tipi cellulari di rilevanza clinica, come i neuroni dopamminergici e le cellule beta pancreatiche, dovrebbe portare alla formazione di una piattaforma per una rigorosa valutazione preclinica delle terapie di sostituzione cellulare. Un'ulteriore opportunità è fornita dalle cellule staminali embrionali per la produzione e caratterizzazione di cellule staminali embrionali, che possono essere veramente rare in vivo. Questo può condurre a metodi per isolare queste cellule staminali direttamente dai tessuti adulti o, persino, per sviluppare farmaci

che possono attivare le cellule staminali residenti nei tessuti in modo che riparino i danni.

Le cellule staminali sono critiche per lo sviluppo dei settori sopraccitati, perché ci sono pochissime evidenze dell'esistenza di cellule pluripotenti nell'organismo adulto. Ad ogni modo, l'utilizzo delle cellule staminali per i trapianti potrebbero indurre il rigetto da parte del sistema immunitario dei pazienti. Questo può essere superato utilizzando farmaci immunosoppressivi, che sono però costosi e presentano diversi effetti collaterali. Un obiettivo ambizioso per i ricercatori, pertanto, potrebbe essere trovare i metodi per convertire le cellule adulte in pluripotenti. E' noto che questo può essere ottenuto mediante il trasferimento nucleare negli oociti o per fusione con le cellule staminali.

Inoltre, durante lo sviluppo del topo, le cellule germinali possono essere convertite, in particolari condizioni, in cellule staminali pluripotenti simili a quelle embrionali (4). La prossima sfida è identificare le proteine che mediano questa riprogrammazione e trasformare direttamente le cellule dei tessuti adulti.

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

## 4.3 Riflessioni

La ricerca sulle cellule staminali embrionali è ancora nell'infanzia, e le sfide scientifiche per imbrigliare queste cellule non dovrebbero essere sottovalutate. Una scala di tempo realistica per lo sviluppo di nuove terapie dovrebbe essere misurata in decenni, piuttosto che in an-

ni. Per esempio, le cellule staminali umane sono geneticamente eterogenee, ed è ancora da scoprire se possono essere trattate in modo standard come quelle, geneticamente uniformi, dei topi. La stabilità genetica delle cellule staminali durante l'espansione a lungo termine è incerta e richiederà un monitoraggio esteso prima di permettere la produzione su ampia scala di fenotipi funzionalmente maturi, adatti per lo screening biofarmaceutico.

Le complesse richieste dovute alla regolamentazione sull'uso delle terapie cellulari potrebbero impedire la traslazione clinica e aumentare enormemente i costi. Sono necessari nuovi meccanismi per sovvenzionare trial clinici multicentrici, in assenza di partner industriali.

Questo problema potrebbe essere superato combinando l'inventiva scientifica con investimenti e coordinazione delle attività a livello europeo. Comunque, il clima politico disomogeneo è attualmente una delle barriere più importanti all'avanzamento della ricerca sulle cellule staminali in Europa. Inoltre, la legislazione, in alcune nazioni, non permette ai ricercatori di studiare le cellule linee di cellule staminali embrionali ottenute dopo una data stabilita arbitrariamente.

Esistono dei procedimenti penali per gli scienziati di determinate nazioni che collaborano con altri ricercatori europei sulle cellule staminali embrionali. La ricerca di base sulle cellule staminali in Europa è, pertanto, danneggiata da questa frammentazione e dal fatto che i singoli ricercatori sono sotto la minaccia di azioni legali.

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

A parte il fatto che le cellule staminali non sono embrioni, l'EPO ignora le opinioni del Gruppo

Europeo sull'Etica, secondo il quale i brevetti dovrebbero essere permessi su cellule staminali umane modificate e sui processi che coinvolgono le cellule staminali umane, qualsiasi sia la fonte. Nonostante alcune nazioni europee hanno deciso di seguire una linea diversa, permettendo la brevettabilità delle cellule staminali, la posizione dell'EPO mette tutta l'Europa in una posizione di svantaggio rispetto al Nord America e all'Asia, dove i brevetti sulle cellule staminale e sulle loro applicazioni sono concessi routinariamente.

- Sono necessari programmi transdisciplinari coordinati per risolvere le grandi sfide scientifiche, cliniche e tecniche che permettano di spostare le cellule staminali dal bancone al paziente, in modo sicuro, efficace e praticabile. - Sono necessari nuovi finanziamenti per supportare i trial clinici sulla terapia cellulare di sostituzione. - La legislazione restrittiva a livello nazionale e il fallimento della procedura di brevettabilità minano la morale e la competitività della ricerca europea, restituendo un futuro non geograficamente omogeneo dal punto di vista economico e dei benefici per la salute che possono derivare dalla ricerca sulle cellule staminali.

#### 4.4 Conclusioni

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

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

## 5 Trasferimento somatico nucleare

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

Nuove opportunità per la medicina e la biologia provengono dalla capacità di derivare cellule staminali embrionali da embrioni artificiali, creati in vitro usando una tecnica chiamata trasferimento nucleare di cellule somatiche, e dalla possibilità di controllare il differenziamento in tutti i tipi cellulari dell'organismo adulto.

Il trasferimento nucleare prevede la rimozione delle informazioni genetiche presenti in un uovo non fertilizzato e la sostituzione con il materiale genetico proveniente da una cellula presa dal corpo (o soma, da cui il termine cellule somatiche), per esempio, di un paziente. Nel caso di persone che soffrono di malattie ereditarie, l'embrione risultante avrebbe le stesse caratteristiche genetiche del paziente, così come anche le cellule staminali derivate dall'embrione risul-

tante. Le cellule staminali potrebbero essere fatte differenziare nelle stesse tipologie delle cellule affette dalla malattia, in modo che mostrino tutte le caratteristiche tipiche delle cellule malate del paziente.

Una volta che il metodo sarà sviluppato, diventerà possibile studiare le malattie genetiche umane in un modo completamente nuovo. Questo approccio ha la potenzialità di fornire nuove opportunità ... non disponibili con altri sistemi ... per studiare le malattie ereditarie in cui la causa genetica non è stata identificata. Un esempio è la famiglia di malattie note con il nome di malattia dei motoneuroni (MND), quali la sclerosi laterale amiotrofica (ALS) e la Sindrome di Lou Gehrig, che sarà utilizzata come esempio nei prossimi paragrafi. **Capitolo a cura di: Ian Wilmut, Centre for Regenerative Medicine, The Queen's Medical Research Institute, University of Edimburgh, United Kingdom.**

### 5.1 Il punto della situazione

L'approccio utilizzato per studiare le malattie ereditarie umane mediante l'espansione in vitro di cellule staminali clonate si sviluppa secondo due passaggi:

1. il trasferimento nucleare di cellule somatiche per produrre una singola cellula simile ad un uovo umano fertilizzato, cioè un embrione con le caratteristiche ereditate dal paziente che soffre della malattia in studio;
2. derivazione delle cellule staminali da questa cellula;
3. ottenimento di una linea cellulare del tipo cellulare specifico che risente della patologia. Mentre il secondo e terzo passaggio sono stati raggiunti utilizzando embrioni derivati dalla fecondazione in vitro, non ci sono attualmente risultati di derivazione di cellule staminali embrionali da embrioni umani prodotti mediante trasferimento nucleare (passaggio numero 2).

Il fallimento nella derivazione di linee di cellule staminali mediante trasferimento nucleare probabilmente dipende da limitazioni attuali della tecnica stessa. Le cellule staminali embrionali sono ottenute da embrioni al sesto giorno

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

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

## 5.2 Prospettive

La capacità di produrre cellule staminali da embrioni prodotti con il trasferimento nucleare offre nuove opportunità per studiare malattie ereditarie, come la ASL, una malattia progressiva degenerativa del muscolo che causa ogni anno circa 130000 morti in tutto il mondo. La degenerazione dei motoneuroni è la causa più comune di questa patologia, ma le cause non sono note. In una piccola proporzione di casi, la malattia si verifica ripetutamente all'interno di una famiglia, ma sembra possibile che gravi malattie genetiche e fattori ambientali contribuiscono alla patogenesi dell'ALS.

Esperimenti nei topi suggeriscono che gli effetti tossici di una proteina anomala possono causare danno sia ai motoneuroni che alle cellule vicine, ma la comprensione del meccanismo dettagliato è ancora lontana. Per capire come le proteine anomale causano la malattia, potrebbe essere molto utile studiare in laboratorio le cellule nervose prelevate da pazienti con ASL. Sfortunata-

mente, non è possibile con le cellule prese direttamente da pazienti viventi, poiché i motoneuroni si trovano all'interno del sistema nervoso centrale.

Inoltre, una volta prelevate, è improbabile che si riesca a mantenerle in coltura e ad espanderle in un numero sufficiente per lo studio. Infine, anche il prelievo nel momento della morte del paziente non è adeguato, ci potrebbero essere molti cambiamenti secondari dovuti alla malattia o all'invecchiamento naturale.

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

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

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

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

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

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

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

### 5.3 Riflessioni

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

Queste cellule modificate potrebbero essere confrontate con quelle della linea originale, con le quali sono identiche ad eccezione del preciso cambiamento associato alla malattia che è stato introdotto. Questo metodo è semplice e diretto, ma possibile solo per una piccola porzione di casi in cui la mutazione genetica è stata identificata.

Nel caso dell'ALS, questo riguarda il 2% dei pazienti. In questa situazione, un confronto diretto e preciso potrebbe essere fatto tra cellule neuronali delle linee delle cellule staminali con o senza il difetto genetico.

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

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

Nello sviluppo e nella verifica del trasferimen-

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

- Il tasso di successo del trasferimento nucleare nel produrre embrioni umani è, sostanzialmente, molto basso al momento. E' necessario un maggior approfondimento per capire come il nucleo trasferito si azzeri prima di tornare allo stato embrionale. - E' necessaria più ricerca per stabilire metodi di produzione di cellule staminali embrionali da embrioni ottenuti mediante trasferimento nucleare (o per ottimizzare il processo di trasferimento nucleare, se il gran numero di fallimenti risultasse dovuto a questa fase) - Se le cellule staminali dovessero essere prodotte in modo ripetibile con il trasferimento nucleare, dovrebbero essere effettuati appropriati confronti con le cellule staminali derivate in modo convenzionale, per escludere effetti collaterali dovuti esclusivamente alla procedura di trasferimento nucleare.

## 5.4 Conclusioni

Le possibilità che emergono prefigurano come interessante la possibile creazione di linee di cellule staminali da embrioni ottenuti mediante trasferimento nucleare.

I benefici non comprendono solo l'implementazione della ricerca e del trattamento di malattie gravi ereditarie degenerative, ma si tratta di un metodo applicabile per lo studio farmacologico generale a livello industriale, aprendo la prospettiva ad un miglioramento delle condizioni di vita per milioni di persone. Le cellule derivate in certi casi possono facilitare la riduzione del numero di animali utilizzati per cercare informazioni o testare dei farmaci per una malattia.

La coltura di cellule staminali derivate da embrioni ottenuti mediante fecondazione in vitro, e la stabilizzazione di linee cellulari sono già state realizzate e non ci sono praticamente più problemi tecnici. E' stato dimostrato che è possibile ottenere diversi tessuti a partire da cellule staminali embrionali differenziate in modo artificiale in laboratorio (con, per esempio, appropriati fattori di crescita).

Il passaggio dal trasferimento nucleare all'ottenimento di cellule di un tessuto adulto, nella sua fase più critica prevede la derivazione di cellule staminali embrionali da embrioni derivati dal trasferimento nucleare.

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

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

## 6 Cellule del sangue

(di Elaine Dzierzak, Erasmus University Medical Center, Department of Cell Biology, Rotterdam, The Netherlands)

Le cellule staminali da cui ha origine il sangue, le cellule staminali emopoietiche, sono le più ampiamente studiate e applicate nella pratica clinica, secondo un processo che comprende il differenziamento e il trapianto. La ricerca in questo settore è in corso da diverse decadi e ha contribuito al miglioramento delle terapie di sostituzione del sangue in caso di malattie genetiche o tumorali. Le sfide attuali in questo settore comprendono:

1) l'espansione ex vivo delle cellule staminali

emopoietiche utilizzate per il trapianto autologo (self, o con cellule derivate dallo stesso paziente) e allogenico (non self, o con cellule derivate da donatore); 2) la conoscenza del programma molecolare delle cellule staminali per poter manipolare in modo efficace cellule staminali normali e leucemiche; 3) la stimolazione della produzione di staminali emopoietiche dalle cellule staminali embrionali o altri precursori. **Capitolo a cura di: Elaine Dzierzak, Erasmus University Medical Center, Department of Cell Biology, Rotterdam, The Netherlands**

## 6.1 Il punto della situazione

Le cellule staminali emopoietiche producono quotidianamente un numero enorme di cellule del sangue, come globuli rossi, macrofagi, linfociti e piastrine, attraverso un processo di differenziamento di tipo gerarchico.

Le cellule staminali emopoietiche sono identificate in modo stringente in base alla loro capacità di generare tutte le linee cellulari del sangue per un lungo periodo di tempo dopo il trapianto in un paziente privo del sistema ematopoietico. Il trapianto di queste cellule è stato applicato nell'uomo per la prima volta per terapie di sostituzione cellulare (1).

Centinaia di migliaia di pazienti sono stati trapiantati con successo con cellule staminali emopoietiche derivate da donatori di midollo osseo (il tessuto adulto in cui risiedono). Più di recente, le cellule del cordone ombelicale sono state utilizzate con successo per la terapia di sostituzione del sangue (1). La reazione di rigetto al trapianto è molto meno frequente nei pazienti in cui sono trapiantate le cellule che derivano dal cordone ombelicale, cellule che sono facilmente accessibili.

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

Studi della citologia, della biologia molecolare e dello sviluppo hanno aumentato le nostre conoscenze nella comprensione del processo che porta alla formazione, mantenimento, espansione e differenziamento delle cellule staminali emopoietiche (2,3). Per esempio, il differenziamento delle cellule staminali emopoietiche in eritrociti (globuli rossi), granulociti, macrofagi e linfociti (globuli bianchi) è il risultato della stimolazione con i fattori di crescita. Questi fattori di crescita sono stati identificati e sono utilizzati routinariamente in clinica per stimolare l'emopoiesi (la produzione delle cellule del sangue) e per mobilizzare le cellule staminali emopoietiche nel circolo sanguigno.

Comunque, conosciamo molto poco dei fattori che permettono l'automantenimento. L'automantenimento è il processo attraverso cui le cellule staminali emopoietiche si dividono per produrre due cellule figlie, di cui una si differenzia, per esempio in globulo bianco, mentre l'altra mantiene le potenzialità di cellula staminale. Al momento, non sono noti fattori di crescita, o combinazioni di questi, in grado di promuovere l'espansione delle cellule staminali emopoietiche (cioè, la produzione di due cellule staminali durante la divisione, invece che una staminale e una differenziata).

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

Le cellule stromali del midollo osseo sono state coltivate ex vivo in laboratorio per studiare l'interazione molecolare tra le cellule stami-

nali emopoietiche e l'ambiente circostante. La conoscenza della programmazione molecolare delle cellule staminali emopoietiche, come anche delle cellule stromali all'interno delle nicchie, è di grande importanza per il miglioramento delle terapie del sangue.

Lo sviluppo dell'ambiente e dei fattori adeguati è attualmente un punto caldo della ricerca del settore ematopoietico (2,3). Si pensa che le cellule staminali emopoietiche si generino solo durante lo sviluppo embrionale e che non siano più prodotte nell'adulto. Il trapianto di cellule a scopo di ricerca in modelli animali ha permesso di identificare la fonte da cui si originano le cellule staminali emopoietiche: i vasi sanguigni in via di sviluppo, come l'aorta dorsale e l'arteria ombelicale. Molti altri tessuti, tra cui il sacco vitellino e la placenta, potrebbero contribuire alla formazione delle cellule staminali emopoietiche presenti nell'adulto.

La formazione delle cellule staminali emopoietiche nell'embrione umano sembra essere molto simile a quella del topo (3). Durante le prime quattro settimane dal concepimento, le cellule staminali emopoietiche si trovano nell'aorta dorsale e più tardi nel sacco vitellino. Sembrano essere potenti quanto quelle del midollo osseo nell'adulto e del cordone ombelicale. La manipolazione molecolare dei programmi genetici ed epigenetici che dirigono la generazione e l'espansione delle cellule staminali emopoietiche nello sviluppo, rappresenta un'ulteriore e importante scoperta nella regolazione di queste cellule e potrebbe portare al miglioramento delle terapie di sostituzione del sangue.

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

## 6.2 Prospettive

Le Prospettive per la salute dell'utilizzo delle informazioni derivate dalla ricerca sulle cellule staminali embrionali emopoietiche comprende la capacità di produrre de novo le stesse cellule staminali emopoietiche nell'adulto a partire da altre linee cellulari.

a dimostrazione che lo sviluppo primordiale delle cellule staminali emopoietiche dai vasi sanguigni implica, ovviamente, che durante il processo di generazione si stabilisca un particolare stato molecolare (genetico ed epigenetico). La comprensione delle caratteristiche di questi precursori embrionali, delle cellule staminali emopoietiche e delle cellule stromali presenti al momento della formazione di quelle emopoietiche, insieme al confronto con le cellule e l'ambiente presenti nell'adulto potrebbero permettere di identificare vie di segnalazione su cui agire per stimolare o inibire le staminali nell'adulto con piccoli farmaci selettivi per il target.

E' stato dimostrato che vie di segnalazione molecolare già ben descritte, quali quelle di Notch, Hedgehog e Wnt, sono coinvolte nella crescita delle cellule emopoietiche. Inoltre, sono state acquisite ulteriori conoscenze sulla formazione ed espansione delle cellule staminali emopoietiche durante lo stadio embrionale e il loro contributo potenziale al sistema emopoietico nell'adulto. E' interessante notare che non è noto se nei mammiferi le cellule staminali emopoietiche generate durante lo stadio embrionale migrino effettivamente e colonizzino il midollo osseo per formare il tessuto emopoietico definitivo.

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

La disponibilità di un numero illimitato di cellule staminali per il differenziamento nelle linee cellulari desiderate, ha fatto nascere la pos-

sibilità di usare le cellule staminali embrionali per terapie di sostituzione del sangue, come metodo alternativo all'utilizzo di cellule staminali emopoietiche da midollo osseo o da cordone ombelicale (3).

Inoltre, la possibilità di avere ceppi donatori universali di cellule staminali embrionali da cui derivare le staminali emopoietiche, potrebbe ovviare ai problemi relativi alla ricerca di donatori di cellule staminali compatibili. Dal momento che la prima dimostrazione del differenziamento ematopoietico nelle cellule staminali embrionali è stato effettuato circa 20 anni fa, molti approfondimenti sono stati fatti sullo sviluppo embrionale del sistema emopoietico del topo per comprendere il differenziamento delle cellule staminali in emopoietiche.

Attraverso gli sforzi di pochi laboratori, il miglioramento delle condizioni di coltura delle cellule staminali hanno permesso di aumentare la capacità di produrre cellule delle linea eritroide (precursori dei globuli rossi), della linea mieloide (precursori dei globuli bianchi coinvolti nell'immunità non specifica ) e della linea linfoide (precursori dei linfociti B e T del sistema immunitario specifico), e di identificare un precursore comune dei vasi e delle cellule emopoietiche (4). Inoltre, è stato possibile ottenere anche il differenziamento delle cellule staminali embrionali umane (5).

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

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

### 6.3 Prospettive applicative

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

### 6.4 Riflessioni

Purtroppo, al momento, non è stato ancora possibile ottenere cellule staminali emopoietiche adatte per il trapianto dalle cellule staminali embrionali di topo e dell'uomo (5).

Saranno necessari più studi in vitro sul differenziamento delle cellule staminali emopoietiche per trovare indizi in merito alla derivazione diretta delle staminali emopoietiche da quelle embrionali. Se il differenziamento simultaneo dei tessuti che circondano i tessuti embrionali è necessario per l'induzione della formazione delle cellule staminali emopoietiche (come appare nel caso dell'aorta dorsale durante l'embriogenesi), sarà necessario sviluppare sistemi di coltura multidimensionali per il differenziamento di cellule staminali embrionali, per la coltivazione anche delle cellule ausiliarie.

Ulteriori studi potranno fornire informazioni su come le cellule staminali embrionali possano essere ottenute dalle cellule staminali embrionali operando sui programmi di sviluppo. Inoltre, dovrebbero essere sviluppate nuove opportunità per ottenere un grande numero di cellule staminali emopoietiche da un tessuto facilmente accessibile, come la placenta. Infine, questi studi forniranno informazioni che permetteranno di capire come le cellule staminali emopoietiche sono generate dalla vascolatura embrionale.

- La generazione di cellule staminali emopoietiche derivate dalle cellule staminali embrionali e/o da cellule vascolari probabilmente necessita

un ambiente di sviluppo complesso.

## 6.5 Conclusioni

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

1. Hakim Nadey S and Pappas Vasilos E. (2003) History of Organ and Cell Transplantation, Imperial College Press, pp 304. and Leukemia and Lymphoma Society
2. Dzierzak E. (2005) The emergence of definitive hematopoietic stem cells in the mammal. *Current Opinion in Hematology*. 12:197- 2002.
3. Hematopoietic stem cell development: Review Issue (2005 Ed: Yoder MC. *Experimental Hematology*, 33.
4. Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL (2003) Normal and leukemic hemopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *PNAS* 100(1):11842-11849.
5. Wang L, Li L, Shojaei F, Levac K, Cerdan C, Menendez P, Martin T, Rouleau A, Bhatia M. (2004) Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity*, 21:31-41.

## 7 Tessuto osseo

(di Paolo Bianco, Università La Sapienza, Roma, Italia)

Ogni anno nel mondo vengono effettuati oltre 800.000 trapianti ossei, con un mercato che si aggira in totale intorno ai 300 milioni di euro.

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

**Capitolo a cura di: Paolo Bianco, Università La Sapienza, Roma, Italia**

### 7.1 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 (8x10<sup>10</sup> 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'epider-

mide umana possono essere cresciuti in laboratorio per dare origine a strati di quello che viene definito epitelio stratificato (la parte esterna della nostra pelle), ed hanno le caratteristiche della pelle normale. I cheratinociti ottenuti dallo stesso paziente che deve essere trattato, i cosiddetti cheratinociti autologhi, sono stati utilizzati in giro per il mondo per rigenerare un epidermide funzionale in pazienti che soffrono di ustioni gravi. L'epidermide umana si rinnova ogni mese. E' stato possibile ottenere in questi pazienti la ripresa della rigenerazione epidermica ... con oltre 20 anni di monitoraggio, cioè in oltre 200 cicli di rinnovamento. Questa tecnologia si è dimostrata essere salvavita. L'epitelio della cornea degli occhi ha dato una grande quantità di informazioni sulle cellule staminali dei cheratinociti. A seconda della loro esatta localizzazione nella cornea o in tessuti adiacenti, hanno diverse caratteristiche e proprietà. Le cosiddette cellule in moltiplicazione transiente continuano a migrare nella cornea da luoghi talvolta distanti alcuni millimetri, in pratica l'equivalente di spingere una persona da una parte di un affollato stadio all'altro, senza gambe! Le ustioni chimiche agli occhi hanno come conseguenza la perdita di un gruppo particolare di cellule al confine tra la cornea (parte trasparente) e la sclera (parte bianca) dell'occhio, le cosiddette cellule del limbus. Sorprendentemente, il danno è riparato da cellule che derivano dalla regione della congiuntiva (la sottile membrana che ricopre la superficie esterna dell'occhio). Questo anomalo processo di cicatrizzazione induce la formazione di nuovi vasi sanguigni, infiammazione cronica e la cicatrice. In questo modo la capacità di vedere dell'occhio può essere fortemente compromessa, fino anche alla cecità. I trapianti allogenici (da donatori) di cornea non hanno buon esito a meno di prendere le cellule del limbus dell'occhio danneggiato e trapiantarle in contemporanea. Questo approccio è stato applicato con successo (il monitoraggio più lungo al momento è di cinque anni dopo l'operazione), ridando la vista normale a pazienti che non avrebbero potuto essere aiutati dalla chirurgia convenzionale. L'uretra, il tubo in cui l'urina scorre all'interno del pene, è rivestita da un epitelio pluristratificato. In una

malattia congenita chiamata ipospadia, l'uretra finisce a livello della superficie ventrale del pene e, in casi estremi (circa il 20%) alla sua base, in pratica l'uretra è totalmente assente. Il trattamento richiede la ricostruzione dell'uretra, generalmente con un autotrapianto (trapianto di tessuto proveniente dallo stesso donatore), fatto ripiegando pelle adiacente o trasferendo la pelle presa da un'altra parte del corpo o, persino, dall'epitelio che riveste la vescica. Questo è talvolta problematico, perché possono crescere peli, si possono avere secrezioni sebacee, calcificazione e persino forature all'interno dell'uretra. Le cellule epiteliali prese da un estremo dell'uretra possono essere cresciute in laboratorio e quindi usate per ricostruire la sezione 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 es-

sere salva-vita (per esempio, in vittime delle ustioni). 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 ( $8 \times 10^{10}$  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 sec-

onda della loro esatta localizzazione nella cornea o in tessuti adiacenti, hanno diverse caratteristiche e proprietà. Le cosiddette cellule in moltiplicazione transiente continuano a migrare nella cornea da luoghi talvolta distanti alcuni millimetri, in pratica l'equivalente di spingere una persona da una parte di un affollato stadio all'altro, senza gambe! Le ustioni chimiche agli occhi hanno come conseguenza la perdita di un gruppo particolare di cellule al confine tra la cornea (parte trasparente) e la sclera (parte bianca) dell'occhio, le cosiddette cellule del limbus. Sorprendentemente, il danno è riparato da cellule che derivano dalla regione della congiuntiva (la sottile membrana che ricopre la superficie esterna dell'occhio). Questo anomalo processo di cicatrizzazione induce la formazione di nuovi vasi sanguigni, infiammazione cronica e la cicatrice. In questo modo la capacità di vedere dell'occhio può essere fortemente compromessa, fino anche alla cecità. I trapianti allogenici (da donatori) di cornea non hanno buon esito a meno di prendere le cellule del limbus dell'occhio danneggiato e trapiantarle in contemporanea. Questo approccio è stato applicato con successo (il monitoraggio più lungo al momento è di cinque anni dopo l'operazione), ridando la vista normale a pazienti che non avrebbero potuto essere aiutati dalla chirurgia convenzionale. L'uretra, il tubo in cui l'urina scorre all'interno del pene, è rivestita da un epitelio pluristratificato. In una malattia congenita chiamata ipospadia, l'uretra finisce a livello della superficie ventrale del pene e, in casi estremi (circa il 20%) alla sua base, in pratica l'uretra è totalmente assente. Il trattamento richiede la ricostruzione dell'uretra, generalmente con un autotrapianto (trapianto di tessuto proveniente dallo stesso donatore), fatto ripiegando pelle adiacente o trasferendo la pelle presa da un'altra parte del corpo o, persino, dall'epitelio che riveste la vescica. Questo è talvolta problematico, perché possono crescere peli, si possono avere secrezioni sebacee, calcificazione e persino forature all'interno dell'uretra. Le cellule epiteliali prese da un estremo dell'uretra possono essere cresciute in laboratorio e quindi usate per ricostruire la sessione mancante dell'uretra. Quattordici anni dopo il trattamento, l'epitelio dell'uretra di questi pazi-

enti 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).

## 7.2 Prospettive

Il concetto di cellule staminale del tessuto scheletrico non è una novità recente, risale agli anni Sessanta del Novecento. Più recentemente, le cellule staminali del tessuto scheletrico hanno guadagnato una posizione centrale, in quanto rappresentano un tipo specifico di cellule staminali post-natali, e sono state rinominate ...cellule staminali mesenchimali....

Le cellule staminali del tessuto scheletrico sono contenute in una frazione del midollo osseo che non da origine alle cellule del sangue (il cosiddetto tessuto stromale). Possono essere isolate

in coltura a partire da piccole quantità di midollo osseo, ottenute mediante una procedura di estrazione che non presenta particolari difficoltà. Si può indurre le cellule staminali del tessuto scheletrico (SSC, dall'inglese Skeletal Stem Cell) a moltiplicarsi in coltura e ad evolvere verso una forma matura, che può dar luogo a tessuto osseo (il costituente principale delle ossa), a cartilagine (il costituente principale delle aree rivolte verso le articolazioni delle ossa), il tessuto adiposo (un componente del midollo osseo che riempie le cavità ossee e le parti molli intorno alle ossa), il tessuto fibroso (il costituente principale dei tendini e legamenti) e il tessuto necessario per l'emopoiesi (lo stroma ematopoietico, che crea l'ambiente per la formazione delle cellule sanguigne all'interno del midollo delle ossa).

Tutti questi tessuti, insieme, costituiscono lo scheletro e possono essere generati a partire da una singola cellula staminale del tessuto scheletrico. Questo può essere dimostrato utilizzando un modello di trapianto appropriato, in cui le cellule originate in vitro da una singola SSC possono dare origine ad uno o più tipi di tessuti dello scheletro in vivo. Inizialmente progettati come esperimenti per provare il principio teorico, con topi immunodeficienti come riceventi, gli studi sui trapianti si sono evoluti in modelli preclinici e, quindi, in studi clinici pilota, con lo scopo di utilizzare le SSC per la rigenerazione del tessuto osseo. A questo punto, i trial clinici sono già in corso, o comunque già pianificati, in tutto il mondo. L'uso delle SSC per la rigenerazione del tessuto osseo attraverso l'ingegneria tissutale è un traguardo che si può ipotizzare raggiungibile ... se non domani, al massimo nel futuro prossimo. Al momento, l'approccio più comune all'ingegnerizzazione del tessuto osseo è basta sulla generazione di un costrutto composto da cellule e biomateriali che viene trapiantato localmente. La componente cellulare del costrutto è ottenuta attraverso la coltura in vitro delle SSC isolate dal midollo osseo del paziente stesso. Le linee cellulari ottenute in questo modo sono combinate con materiale di supporto, solitamente composte da una fase minerale (idrossiapatite, fosfato di tricalcio, carbonato di calcio o combinazioni di questi). Le cellule aderiscono alla porzione min-

erale, che a sua volta, facilita la deposizione di nuovo tessuto osseo da parte delle cellule presenti nel supporto. Idealmente, la struttura di supporto deve essere riassorbibile dall'organismo del ricevente nel tempo, lasciando in loco solo il tessuto osseo neoformato.

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

### 7.3 Riflessioni

Nell'ingegneria dei tessuti per le ossa sono necessari, e sono attesi, avanzamenti per quel che riguarda lo sviluppo dei biomateriali. I materiali utilizzati nelle prime fasi di studio (preclinica e clinica) sono stati selezionati sulla base della capacità di facilitare la formazione del tessuto osseo da parte di cellule che normalmente svolgono questa funzione in vivo (materiale osteoconduttivo).

L'utilizzo di cellule staminali per l'ingegnerizzazione dei tessuti ossei pone peculiari sfide e i materiali utilizzati come supporto dovranno essere adattati per mantenere le caratteristiche proprie delle cellule staminali nel lungo termine, dopo il trapianto in vivo. Sono in corso degli studi per progettare e validare una nuova generazione di materiali, tra cui quelli disegnati per rilasciare fattori bioattivi in modo controllato.

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

di per identificare biomateriali migliori e per assicurare la stabilità del tessuto.

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

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

Inoltre, devono essere anche sviluppati sistemi in cui i singoli geni non devono essere solo trasferiti nelle cellule, ma silenziati. Questo è necessario per la cura di specifiche malattie scheletriche in cui l'eccessiva attività di un prodotto genico ... e non la mancanza dello stesso ... causa anomalie nella struttura e nella funzione delle ossa. Lo sviluppo di metodi efficaci per veicolare le cellule staminali in tutti i punti dello scheletro è un punto importante per la cura delle malattie che coinvolgono l'intero organismo. Al momento, non ci sono solide evidenze che si possano veicolare le SSC all'intero scheletro utilizzando il torrente sanguigno, per esempio con un'iniezione intravenosa.

Nell'area della biologia delle cellule staminali che ha risvolti diretti per la clinica, sono necessari e attesi progressi nella purificazione di frazioni cellulari di cellule staminali, comprese nelle popolazioni cellulari che possono essere attualmente espianate e messe in coltura. Questa popolazione include una popolazione in relazione gerarchica di cellule staminali e progenitrici con potenzialità diverse nella duplicazione cellulare e nella maturazione in specifici tipi cellulari del tessuto scheletrico (differenziamento). La disponibilità di una popolazione di cellule staminali purificate permetterebbe la

progettazione di strategie che non necessitano della cultura in vitro prima del passaggio alla clinica. Questo semplificherebbe enormemente l'uso clinico delle SSC, e probabilmente aumenterebbe l'efficacia.

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

## 7.4 Conclusioni

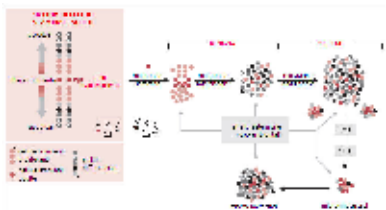
E' già stato dimostrato il valore delle cellule staminali derivate dagli epiteli per riparare difetti congeniti e altri danni, alcuni dei quali ben oltre i risultati derivati dal trapianto convenzionale di cellule e tessuti.

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.

## 8 Cellule staminali e tumori

(di Riccardo Fodde, Department of Pathology, Josephine Nefkens Institute, Erasmus MC)



Le cellule staminali cancerose sono un modello utile ... come sostenuto da un numero crescente di studi sperimentali ... per spiegare e studiare il cancro. In generale, il cancro si pensa che origini da un tessuto normale, in seguito ad un processo progressivo attraverso diversi stadi, a partire dalla lesione primarie fino allo stadio invasivo (maligno). Le metastasi locali e a distanza derivano dalle lesioni maligne primarie e rappresentano una delle principali cause di elevata frequenza di mortalità tra i pazienti affetti da cancro nel mondo industrializzato.

Insieme a questa sequenza di eventi, l'accumulazione progressiva di alterazioni geniche in specifici geni tumorali è considerata la forza trainante per l'inizio, la progressione e la metastasi del cancro.

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

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

I tumori non sono macchinari in grado di proliferare in modo autonomo, ma presentano aspetti molto eterogenei per quanto riguarda la morfologia e gli aspetti funzionali. Infatti, un singolo tumore può presentare aree diverse con comportamenti diversi: proliferazione, arresto del ciclo cellulare, differenziamento epiteliale, adesione cellulare e disseminazione. In accordo a questo modello più dinamico delle SCS

(figura 1), la maggior parte dei tipi tumorali derivano da nicchie di cellule staminali caratterizzate da un bilancio finemente coordinato tra automantenimento, migrazione, proliferazione, differenziamento e apoptosi.

Le mutazioni in geni noti per essere responsabili di questo bilanciamento nei tessuti normali danno luogo alla formazione di masse tumorali parzialmente differenziate ed eterogenee che, in seguito a mutazioni addizionali e sotto l'influenza positiva dei fattori microambientali, progrediscono verso il tumore maligno.

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

Per riepilogare: - l'eterogeneità tumorale non è spiegata dall'attuale modello genetico per l'inizio e progressione verso lo stadio maligno e metastasi dei tumori - le CSC derivano dalla controparte normale all'interno delle nicchie delle cellule staminali - le CSC rappresentano una piccola ma rilevante sottopopolazione all'interno della massa tumorale. **Capitolo a cura di: Riccardo Fodde, Department of Pathology, Josephine Nefkens Institute, Erasmus MC**

## 8.1 Il punto della situazione

Tipo di cancro	Marcatori specifici delle CSC	Riferenza
Leucemia	CD34 <sup>+</sup> CD33 <sup>-</sup>	2001, 2002, 2003, 2004, 2005
Melanoma	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup>	2002, 2003, 2004, 2005
Carcinoma	CD133 <sup>+</sup>	2002, 2003, 2004, 2005
Mieloma	CD138 <sup>+</sup>	2002, 2003, 2004, 2005
Neoplasia	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup>	2002, 2003, 2004, 2005
Endometrio	CD133 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>	2002, 2003, 2004, 2005

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

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

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

(crescita del tessuto o neoplasia, dovuta a più automantenimento che differenziamento).

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

Inoltre, in accordo con il modello SCS, una piccola sottopopolazione di cellule mantiene le proprietà di cellule staminali ed è responsabile della crescita tumorale (per automantenimento) e dell'eterogeneità (per differenziamento). Sono state ottenute evidenze sperimentali per l'esistenza delle cellule staminali cancerose in diversi tipi tumorali, quali leucemia, mieloma multiplo, tumore alla mammella, al cervello, alla prostata e al polmone (tabella 1). Questi studi consistono nella dissociazione dei tumori umani in singole cellule, mantenute in sospensione e quindi separate in base ai marcatori presenti sulla loro superficie, quindi trapiantate in animali immunodeficienti (NOD/SCID).

Le cellule staminali cancerose sono identificate in base alla loro capacità di replicare la tumorigenesi anche se trapiantate in basso numero nei modelli sperimentali. Per esempio, una cellula su 105 cellule della leucemia mieloide acuta esprime il marcatore di superficie CD34+CD38+ ed è in grado di dar luogo all'eterogeneità istologica della malattia quando trapiantata in animali SCID. Analogamente, il cancro alla mammella comprende una sottopopolazione (1-10%) di CD44+CD24<sup>low</sup> lin<sup>-</sup>. Queste cellule CSC putative della mammella possono formare tumori in topi NOD/SCIP anche se l'impianto prevede l'introduzione di sole 200 unità. E' interessante notare come molti marcatori di superficie siano presenti in SCS isolate da diversi tipi di cancro, forse ad indicare che si attivano le stesse vie di segnalazione della trasduzione. La deregolazione della segnalazione della via di Wnt, per esempio, è stato dimostrato essere un evento precoce nella progressione maligna dei tu-

mori del colon, della mammella, della pelle e del tessuto ematopoietico ed è probabilmente responsabile dell'attivazione dell'automantenimento delle cellule staminali in corrispondenza delle nicchie tessuto-specifiche.

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

## 8.2 Prospettive

Le cellule staminali cancerose offrono prospettive per il miglioramento della prognosi e il trattamento del cancro. La dimostrazione dell'esistenza in diversi tumori maligni umani di una minoranza di cellule staminali cancerose in grado di riprodurre l'eterogeneità e la malignità delle malattie umane in esperimenti animali ha diverse implicazioni per la prognosi e il trattamento del cancro.

Uno degli strumenti attualmente considerati come una promettente risorsa per la prognosi e la valutazione della risposta a trattamenti farmacologici è l'analisi del profilo di espressione. Se la nascita del tumore e il comportamento invasivo è dovuto ad una minoranza di cellule CSC, la loro quantità all'interno della massa tumorale potrebbe correlare con il rischio per il paziente di sviluppare metastasi locali e a distanza.

Inoltre, il profilo di espressione di un intero tumore mediante analisi di microarray, analizzando l'intero assetto di geni umani, è improbabile che aiuti ad individuare l'espressione di geni caratteristici delle SCS, dal momento che queste

cellule sono diluite in una maggioranza di cellule con caratteristiche eterogenee. Analogamente, il profilo di espressione di interi tumori potrebbe avere un basso impatto nella progettazione di approcci fatti su misura.

L'identificazione di caratteristiche specifiche delle CSC grazie al profilo di espressione di CSC permetterebbe l'analisi bioinformatica del profilo tumorale e una maggiore accuratezza nella predizione clinica del comportamento metastatico e in risposta al trattamento. Inoltre, faciliterebbe l'identificazione di nuove terapie che hanno le CSC come target. Oltre che dalle tradizionali chemioterapie e radioterapie, la riduzione del tumore potrebbe derivare dalla morte di cellule tumorali differenziate. Inoltre, se le CSC costituiscono una minoranza delle cellule tumorali e se, come riportato in letteratura, sono caratterizzate da una resistenza intrinseca alla radiazione e agli agenti chimici, probabilmente sono in grado di resistere a terapie adiuvanti e dare origine alla ripresa del cancro. Quindi, lo sviluppo di terapie che agiscono in modo specifico contro le CSC è probabile che dia luogo ad un aumento considerevole della sopravvivenza a lungo termine dei pazienti.

L'ipotesi delle cellule staminali cancerose suggerisce nuove Prospettive per la rilevazione delle cellule cancerose circolanti dopo la rimozione chirurgica del tumore maligno primario. In generale, le cellule cancerose circolanti nel sangue e nel midollo osseo sono note essere presenti in elevate quantità nei pazienti affetti da cancro. Le cellule cancerose circolanti, ad ogni modo, riflettono l'eterogeneità della massa tumorale primaria e solo una minoranza è in grado di dare metastasi in organi distanti. Le CSC, a causa della loro plasticità intrinseca e della capacità di transdifferenziare in seguito a stimoli provenienti dall'ambiente circostante, rappresentano una sottopopolazione, molto rilevante dal punto di vista clinico, di cellule cancerose migranti in grado di riprodurre la lesione primaria in siti distanti.

L'identificazione dei marcatori di superficie delle CSC per specifici tipi di cancro (tabella 1) probabilmente permetterà l'identificazione e la quantificazione di CSC migranti nei fluidi corpor-

ei, per guidare il trattamento e la sorveglianza postclinica del decorso del paziente affetto da cancro.

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

### 8.3 Conclusioni

L'ipotesi delle cellule staminali cancerose rappresenta un concetto molto innovativo nella biologia del cancro con profonde e fondamentali implicazioni per la clinica. La ricerca sulle cellule staminali cancerose si muoverà in parallelo con quella sulle normali cellule staminali embrionali e adulte.

E centrale in entrambi i casi, lo studio e l'identificazione dei marcatori di superficie, per la loro possibilità di essere utilizzati, in prospettiva, per distinguere tessuti sani da tessuti malati. La caratterizzazione molecolare conseguente delle cellule staminali purificate attraverso l'analisi del profilo genetico e proteico porrà le basi per la gli studi che potrebbero portare a chiarire i meccanismi molecolari e cellulari che regolano l'automantenimento e il differenziamento nell'omeostasi e nel cancro.

Questi progressi nella nostra conoscenza della biologia delle cellule staminali cancerose apriranno nuove porte per il miglioramento della diagnosi di rischio, nella prognosi, nella sorveglianza, nella prevenzione e nella terapia mirata del cancro. A questo scopo, sia la ricerca applicata che di base devono essere sostenute, combinando l'analisi genetica, cellulare e molecolare di modelli sperimentali in vivo e in vitro di CSC con l'identificazione, purificazione e analisi delle stesse ottenute da biopsie e fluidi corporei di pazienti affetti da cancro.

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