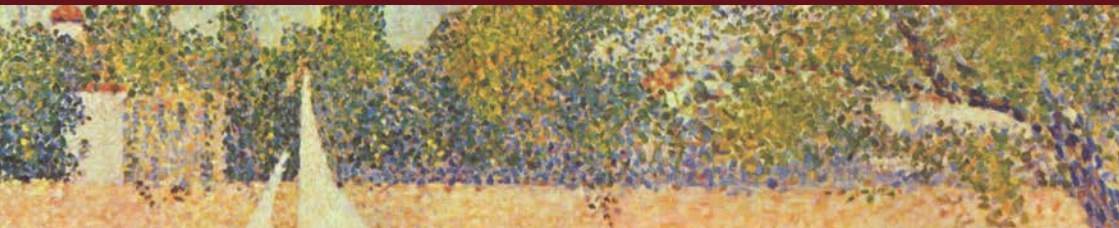


Ciclo di Incontri “Scienza, Innovazione e Salute”  
III° Incontro

## “Le applicazioni delle cellule staminali in medicina rigenerativa”



Materiali a cura dell'Ufficio della Sen. Prof. Elena Cattaneo

Roma, 15 aprile 2014

Sala Zuccari – Palazzo Giustiniani – Senato della Repubblica

La presente pubblicazione è a cura esclusiva dell'Ufficio della Senatrice e Professoressa Elena Cattaneo. I testi raccolti e le opinioni espresse non impegnano in alcun modo il Senato della Repubblica.

## Indice

| Sezione     |                                                                                                                                     | Pag. |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>1.</b>   | Programma dell'evento                                                                                                               | 5    |
| <b>2.</b>   | Glossario                                                                                                                           | 7    |
| <b>3.</b>   | Prospettiva storica della ricerca su cellule staminali                                                                              | 13   |
| <b>3.1</b>  | La storia delle cellule staminali                                                                                                   | 13   |
| <b>3.2</b>  | Cronologia essenziale della ricerca sulle cellule staminali e della regolamentazione dei trattamenti                                | 20   |
| <b>4.</b>   | Cellule staminali in biologia e nella medicina rigenerativa, Elena Cattaneo                                                         | 31   |
| <b>5.</b>   | Staminali e trapianti, Michele De Luca                                                                                              | 53   |
| <b>6.</b>   | Don't market stem-cell products ahead of proof, Paolo Bianco                                                                        | 57   |
| <b>7.</b>   | Regole per le Terapie Avanzate a base di Cellule Staminali. Quali tutele per i pazienti? Luca Pani                                  | 59   |
| <b>8.</b>   | Interventi della giornata                                                                                                           | 63   |
| <b>8.1</b>  | Come portare sul banco del laboratorio i quesiti della clinica? Le cellule staminali come modello di malattia (E. Cerbai)           | 64   |
| <b>8.2</b>  | Staminali e neuro-immuno-infiammazione (S. Maione, F. Rossi)                                                                        | 65   |
| <b>8.3</b>  | Cellule staminali e malattie del cervello (G. Martino)                                                                              | 66   |
| <b>8.4</b>  | Cellule staminali commerciali: sfide amministrative e di governo (P. Bianco)                                                        | 68   |
| <b>8.5</b>  | Terapia genica con cellule staminali ematopoietiche (L. Naldini)                                                                    | 70   |
| <b>8.6</b>  | Le malattie che curano le malattie lisosomiali (A. Biffi)                                                                           | 71   |
| <b>8.7</b>  | Cellule staminali della pelle in terapia cellulare e genica (M. De Luca)                                                            | 72   |
| <b>8.8</b>  | Ricostruzione della cornea da cellule staminali: esempio di adeguamento alle nuove normative sulle terapie avanzate (G. Pellegrini) | 74   |
| <b>8.9</b>  | Le sfide culturali della medicina rigenerativa (G. Corbellini)                                                                      | 75   |
| <b>8.10</b> | Prodotti medicinali per terapie avanzate: quali regole tutelano i pazienti? (L. Pani)                                               | 76   |



# 1

## PROGRAMMA

- 9,00-9,45** Accoglienza e registrazione dei partecipanti
- 9,45** Apertura dei lavori
- Indirizzo di saluto di **Pietro Grasso**, Presidente del Senato della Repubblica
- Introduzione dei lavori di **Emilia Grazia De Biasi**, Presidente della Commissione Igiene e Sanità
- Coordinationo: **Marco Cattaneo** (Direttore Le Scienze) e **Armando Massarenti** (Responsabile edizione domenicale del Sole 24 Ore)
- Partecipano i componenti della Commissione Igiene e Sanità del Senato.
- 10,00** *Sperimentazione preclinica*
- Elisabetta Cerbai**, Università degli Studi di Firenze  
*Come portare sul banco del laboratorio i quesiti della clinica? Le cellule staminali come modello di malattia*
- Sabatino Maione** e **Francesca Rossi**, Seconda Università degli Studi di Napoli  
*Staminali e neuro-immuno-infiammazione*
- Gianvito Martino**, Ospedale San Raffaele, Unità INSPE - Milano  
*Cellule staminali e malattie del cervello*
- Paolo Bianco**, Università la Sapienza - Roma  
*Cellule staminali commerciali e sfide amministrative e di governo*
- Interventi dall'audience

**11,00**

*Staminali che curano*

**Luigi Naldini**, Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica, Tiget - Milano  
*Terapia genica con cellule staminali ematopoietiche*

**Alessandra Biffi**, Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica, Tiget - Milano  
*Le staminali che curano le malattie lisosomiali*

**Michele De Luca**, Centro di Medicina Rigenerativa "Stefano Ferrari" Dipartimento di Scienze della Vita Università di Modena e Reggio Emilia  
*Cellule staminali della pelle in terapia cellulare e genica*

**Graziella Pellegrini**, Centro di Medicina Rigenerativa "Stefano Ferrari" Dipartimento di Scienze della Vita Università di Modena e Reggio Emilia  
*Ricostruzione della cornea da cellule staminali: esempio di adeguamento alle nuove normative sulle terapie avanzate*

**12,00**

*Fonti, Regole e Comunicazione a tutela del malato*

**Gilberto Corbellini**, Università la Sapienza - Roma  
*Le sfide culturali della medicina rigenerativa*

**Luca Pani**, Agenzia Italiana del Farmaco - Roma  
*Prodotti Medicinali per Terapie Avanzate: quali regole tutelano i pazienti?*

Intervento dei moderatori

Interventi dall'audience

**13,15**

Termine dei lavori

# 2

## GLOSSARIO

Termini e locuzioni comunemente in uso nella ricerca su cellule staminali pubblicata sul sito web del Consorzio Europeo EuroStemCell ([www.eurostemcell.org](http://www.eurostemcell.org)), finanziato dall'Unione Europea, 7PQ, contratto no. 241878

**Analisi clonale:** Analisi delle proprietà delle singole cellule. Essenziale per la dimostrazione formale della potenza e della capacità di auto-rinnovamento. Vedi anche: potenza, auto-rinnovamento.

**Auto-rinnovamento:** Capacità di una cellula staminale di dividersi e produrre copie di se stessa per un periodo di tempo indefinito. Questa è una capacità caratteristica delle cellule staminali. Vedi anche: analisi clonale, nicchia, cellula staminale.

**Blastocisti:** Uno stadio precoce dell'embrione di circa 100 cellule che non si è ancora impiantato nell'utero. La blastocisti è una sfera costituita da uno strato esterno di cellule, una cavità piena di liquido ed una formazione cellulare all'interno, definita massa cellulare interna

**Cellula figlia:** Una delle due o più cellule che derivano dalla divisione di una singola cellula. Vedi anche: divisione asimmetrica.

**Cellula iniziatrice del tumore:** Cellula che produce un nuovo tumore a seguito di trapianto. E' una proprietà chiave delle cellule staminali tumorali. Vedi anche: cellula staminale tumorale.

**Cellula progenitrice:** Termine generico per una cellula senza capacità di auto-rinnovamento che contribuisce alla formazione di un tessuto. In alcuni casi genera le cellule staminali del tessuto stesso. Sinonimo: precursore.

**Cellula progenitrice:** Termine generico per ogni cellula in divisione che ha la capacità di dare origine ad un altro tipo cellulare. Il termine si può riferire anche a probabili cellule staminali delle quali la capacità di auto-rinnovamento non è stata ancora dimostrata. Sinonimi: progenitore, cellule progenitrici, progenitori.

**Cellula somatica:** Qualunque cellula di una pianta o di un animale diversa dalle cellule germinali (cellule riproduttive). Vedi anche: cellule staminali pluripotenti indotte (iPS).

**Cellula staminale:** Una cellula che può produrre continuamente cellule figlie uguali a se stessa oppure cellule con proprietà differenti e più ristrette. Vedi anche: auto rinnovamento, staminalità.

**Cellula staminale embrionale:** Linee cellulari staminali pluripotenti derivate dall'embrione prima della formazione dei tre foglietti germinativi. Vedi anche: pluripotente.

**Cellula staminale tissutale:** Cellula staminale derivata o residente in un tessuto fetale o adulto con capacità di differenziamento limitata all'ambito delle cellule che appartengono al suddetto tessuto. Queste cellule sostengono il mantenimento e la riparazione durante il corso della vita in alcuni tessuti. Sinonimo: cellula staminale adulta.

**Cellula staminale tumorale:** Cellula dotata di capacità di auto-rinnovamento responsabile del mantenimento del tumore e che dà origine ad una progenie differenziata costituente la maggior parte del tessuto neoplastico. Le cellule staminali tumorali identificate nelle leucemie ed in alcuni tumori solidi rappresentano target terapeutici critici. Vedi anche: cellula tumorale di origine, cellula iniziatrice del tumore.

**Cellula tumorale di origine:** Cellula pre-cancerosa che dà origine ad una cellula staminale cancerosa. Può essere una cellula staminale mutata o un precursore che ha acquisito proprietà di auto-rinnovamento attraverso una mutazione. Vedi anche: cellula staminale tumorale

**Cellule germinali:** Cellule riproduttive in organismi multicellulari. Vedi anche: zigote.

**Cellule staminali emopoietiche:** Cellule staminali che danno origine a tutte le cellule del sangue.

**Cellule staminali pluripotenti indotte (iPS):** Un tipo di cellula staminale pluripotente derivata da una cellula non pluripotente, tipicamente una cellula somatica adulta, attraverso la manipolazione di alcuni geni. Leggi in nostro documento sulle cellule iPS. Vedi anche: pluripotente, cellula somatica. Sinonimi: cellule iPS, pluripotenza indotta.

**Clonazione terapeutica:** Produzione di cellule staminali embrionali da cellule adulte ottenute da un paziente. Ciò viene ottenuto tramite una tecnica chiamata trasferimento del nucleo da cellula somatica.

**Coltura cellulare:** Crescita delle cellule in supporti da laboratorio, per ricerca sperimentale. Le cellule vengono fatte crescere in una soluzione o terreno di coltura che contiene nutrienti e fattori di crescita. Diversi fattori possono essere aggiunti al terreno per indurre cambiamenti nel comportamento cellulare. Vedi anche: linea cellulare.



**Determinazione:** Coinvolgimento in un programma mirato al differenziamento. Per una cellula staminale questo implica la perdita della capacità di autorinnovarsi. Vedi anche: differenziamento.

**Differenziamento:** Processo attraverso il quale le cellule diventano differenziate per eseguire delle funzioni particolari. Vedi anche: determinazione.

**Discendenza (Lineage):** Termine utilizzato per descrivere cellule con un progenitore comune, cioè originate dallo stesso tipo di cellula immatura.

**Divisione asimmetrica:** Divisione cellulare che dà origine a due cellule figlie con proprietà differenti. Osservata in alcune ma non in tutte le cellule staminali, può verificarsi anche in altri tipi di progenitori. Vedi anche: cellula figlia, filamento immortale.

**Epatocita:** La cellula funzionale del fegato. Gli epatociti producono enzimi per la detossificazione dai cataboliti, sintetizzano le proteine del plasma, producono la bile e contribuiscono al controllo dei valori ematici degli zuccheri entro limiti ristretti.

**Epitelio:** Un tipo di tessuto che riveste le superfici e le cavità del corpo. Esempi di epitelio includono la cornea dell'occhio, gli strati della pelle e le pareti dei polmoni. Il tessuto epiteliale può anche formare le ghiandole. In greco, "epi" significa "sopra", mentre "theli" significa "tessuto".

**Fattore di trascrizione:** Una proteina che si lega a specifiche sequenze del DNA e quindi attiva o reprime la formazione di RNA messaggero (processo conosciuto come trascrizione del DNA a RNA). L'RNA messaggero porta il codice per la produzione di nuove proteine. Vedi anche: proteina.

**Filamento immortale:** Ipotesi del mantenimento del filamento di DNA parentale durante la divisione asimmetrica. Rappresenta un potenziale meccanismo per la protezione delle cellule staminali dalle mutazioni associate alla replicazione. Vedi anche: divisione asimmetrica.

**Linea cellulare:** Una popolazione di cellule che esprimono gli stessi geni, espansa in laboratorio per diversi cicli di crescita e divisioni cellulari. Vedi anche: coltura cellulare.

**Macrofago:** Un tipo di cellula bianca del sangue ed un componente versatile del sistema immunitario. Costantemente in ricognizione, i macrofagi sono in grado di individuare ed uccidere diversi tipi di batteri. Rappresentano solitamente la prima risposta ad ogni attacco all'organismo.

**Medicina rigenerativa:** Ricostituzione di un tessuto malato o compromesso attraverso l'attivazione di cellule residenti, oppure attraverso il trapianto di cellule. Vedi anche: terapia cellulare sostitutiva.

**Multipotente:** Capace di formare la moltitudine di cellule mature che costituiscono un intero tessuto o più tessuti. Esempio cellule staminali emopoietiche (del sangue). Vedi anche: potenza.

**Nicchia:** Microambiente cellulare che fornisce il supporto e gli stimoli necessari per sostenere l'auto-rinnovamento. Vedi anche: auto-rinnovamento.

**Oligopotente:** Capace di formare due o più cellule mature in un tessuto. Ad esempio, le cellule staminali neurali che possono dare origine a diversi tipi di neuroni nel cervello sono oligopotenti. Vedi anche: potenza.

**Plasticità:** Nozione non ancora dimostrata secondo la quale le cellule staminali di un tessuto possono dare origine ai tipi cellulari di un altro tessuto in alcune condizioni.

**Pluripotente:** Capace di formare tutte le discendenze cellulari dell'organismo, incluse le cellule germinali ed alcune, se non tutte, le cellule degli annessi extraembrionali. Esempio: cellule staminali embrionali. Vedi anche: cellula staminale embrionale, cellule staminali pluripotenti indotte (iPS).

**Potenza:** Insieme di opzioni per la specificazione disponibile per una cellula. Vedi anche: analisi clonale, multipotente, oligopotente, totipotente, unipotente.

**Proteina:** Vedi anche: fattore di trascrizione.

**Ricostituzione a lungo termine:** La capacità di cellule trapiantate di rinnovare continuamente un tessuto. Rappresenta il test definitivo per le cellule staminali emopoietiche, epiteliali e spermatogoniali.

**Riprogrammazione:** Incremento nella potenza. Si verifica naturalmente negli organismi con capacità rigenerative (dedifferenziamento). Si può indurre sperimentalmente nelle cellule di mammifero attraverso il trasferimento nucleare, la fusione cellulare, la manipolazione genetica o la coltura in vitro.

**Staminalità:** Nozione non dimostrata secondo la quale diverse cellule staminali sono regolate da geni e meccanismi comuni. Vedi anche: cellula staminale.

**Terapia cellulare sostitutiva:** Ricostituzione di un tessuto attraverso l'integrazione funzionale di una progenie di cellule staminali trapiantate. Diverso da effetto trofico "bystander", anti-infiammatorio o immunomodulatorio delle cellule trapiantate. Vedi anche: medicina rigenerativa

**Totipotente:** Sufficiente per formare un intero organismo. Lo zigote è totipotente; non dimostrato per le altre cellule staminali dei vertebrati. Vedi anche: potenza, zigote.

**Traslazione clinica:** Processo che prevede l'applicazione clinica della conoscenza scientifica attraverso una ricerca attentamente controllata e diversi passaggi di approvazione.

**Trial clinico:** Studio in soggetti umani per rispondere a specifiche domande su vaccini, nuove terapie o nuovi metodi per utilizzare trattamenti già conosciuti. I trial clinici sono utilizzati per determinare se nuovi farmaci o trattamenti sono efficaci e sicuri. I trial si svolgono in quattro fasi: nella Fase I il nuovo farmaco viene testato su un piccolo gruppo; la Fase II espande lo studio ad un gruppo più grande di persone; la Fase III estende lo studio ad un gruppo di persone ancora più ampio. La Fase IV ha luogo dopo che il farmaco o trattamento è stato brevettato e messo in commercio.

**Unipotente:** Che dà origine ad una singola cellula matura. Ad esempio le cellule staminali spermatogoniali sono unipotenti, dal momento che possono dare origine solo agli spermatozoi. Vedi anche: potenza.

**Zigote:** Una singola cellula che risulta dalla fusione dei gameti maschili e femminili (spermatozoo ed oocita) durante la fecondazione. Vedi anche: cellule germinali, pluripotente.



# 3

## PROSPETTIVA STORICA DELLA RICERCA SU CELLULE STAMINALI

### 3.1

#### La storia delle cellule staminali

di Mauro Capocci

Dipartimento di Scienze e Biotecnologie Medico-chirurgiche, Unità Storia della Medicina, Sapienza Università di Roma

(adattato dal primo capitolo di M. Capocci e G. Corbellini, *Le cellule della speranza. Il caso Stamina tra mito e realtà*, Codice Edizioni, Torino, 2014)

È della seconda metà dell'Ottocento l'uso del termine e del concetto di “cellula staminale”, ad indicare una cellula “primigenia”, con significato evolutivo o fisiologico. Infatti, *stamzell* è il nome che nel 1868 il naturalista darwiniano Ernst Haeckel propone per l'ipotetico organismo da cui avrebbe preso il via tutto l'albero evolutivo della vita. Una sorta di “falsa partenza”, poiché per vedere il termine utilizzato con un significato più vicino all'oggi si deve aspettare la fine del secolo, dopo che proprio il ricambio fisiologico delle cellule era stato individuato come una delle caratteristiche fondamentali dei tessuti e come tale degno di attenzione non solo come strumento per la comprensione della biologia, ma anche per il potenziale medico. Sulle proprietà di rinnovamento il medico italiano Giulio Bizzozero fondò una duratura classificazione dei tessuti dell'organismo umano – labili, stabili, perenni – avendo compreso che la vita di un organismo è legata a un “processo continuo, fisiologico di rigenerazione che vale a conservarne immutate la costituzione e le proprietà”<sup>1</sup>. Inoltre, le teorie di August Weissman sui *determinanti* che sarebbero presenti nelle cellule germinali e somatiche, con il differenziamento che procede per “sottrazione” nel corso dello sviluppo, spinsero molti ricercatori – soprattutto tedeschi – a studiare il percorso delle cellule dalle prime fasi fino allo stadio adulto. Da questi studi emerse l'esistenza di alcune cellule più importanti di altre, che all'inizio dell'ultimo decennio dell'Ottocento furono battezzate da diversi autori con il nome di *stamzellen*: Theodor Boveri e Valentin Haecker nel 1892 usano il termine proprio con questo significato,

---

<sup>1</sup> G. Bizzozero (1894). *Accrescimento e rigenerazione nell'organismo*. In Atti dell'XI Congresso Medico Internazionale. A cura di. Roma, Rosenberg & Sellier. I, pp. 276-306.

relativo allo sviluppo individuale<sup>2</sup>. Ma non si parla di rigenerazione, in questo caso, né questo collegamento si trova nel primo uso anglosassone del termine “stem cell”, introdotto da Edmund B. Wilson nel 1896. Direttamente collegato alla rigenerazione è invece l’uso che ne fa Jacob Keller, nel 1894, secondo il quale queste *stamzellen* “nella planaria hanno il compito della rigenerazione ed eventualmente si prestano alla proliferazione fissipara”<sup>3</sup>.

La denominazione non sarà immediatamente adottata da tutti: quasi quindici anni più tardi queste cellule sono chiamate, “Stamzellen”, “formative cells”, “freie Bindegewebzellen”, “embryonale Zellen”, “Neoblasten”<sup>4</sup>. La diversità di nomi rifletteva la progressiva specializzazione delle scienze della vita, conservatasi praticamente immutata fino a pochi anni fa. La diversità terminologica derivava inoltre dalle peculiari potenzialità delle cellule staminali conosciute: a seconda degli organismi e dei tessuti in cui venivano osservate, veniva loro dato un nome.

Tuttavia sulla loro funzione vi era poco dubbio, e già negli anni Dieci era chiaro che la loro destinazione finale, cioè il tessuto cui davano vita, fosse dovuta a “fattori estrinseci alle cellule staminali”<sup>5</sup>. Fattori costanti, che nella rigenerazione fisiologica replicavano la determinazione che avviene nell’ontogenesi, e che determinano il comportamento di queste cellule dalla “potenzialità istogenetica multipla”. Sono queste *cellules-souches*, “una categoria di elementi a potenzialità istogenetica multipla” perché “scappate alla determinazione istogenetica” che avviene nell’embrione, ad avere il ruolo principale nella rigenerazione fisiologica<sup>6</sup>.

Rimaneva il mistero di quali fossero i fattori che determinavano l’espressione della “potenzialità” delle cellule, e a risolvere questo problema si dedicarono molti embriologi nei primi decenni del Novecento, tra cui Hans Spemann, Paul Weiss, Jacques Loeb e Thomas Hunt Morgan. Mentre i primi misero a punto sistemi sempre più fini per evidenziare la gerarchia dei sistemi di sviluppo, con alcuni tessuti in grado di determinare il destino degli altri, Morgan cercò la risposta nel materiale contenuto nelle cellule, di fatto dando il via alla ricerca genetica sui cromosomi (come gli fu riconosciuto dal premio Nobel del 1933). Contemporaneamente, proprio per studiare i meccanismi di crescita dei tessuti Ross Harrison aprì nei primi decenni del Novecento la strada delle colture cellulari in vitro, una tecnologia fondamentale per le ricerche sulla biologia delle cellule, tra cui gli studi sulla rigenerazione e il differenziamento. Uno dei risultati teoricamente più rilevanti ottenuti dallo stesso Harrison fu quello di notare che le cellule dovevano costituire una massa minima per poter proliferare: cioè, una

---

<sup>2</sup> A. Droscher (2012). *Where does stem cell research stem from? A terminological analysis of the first ninety years*. In *Differing routes to stem cell research : Germany and Italy*. A cura di Mazzolini e Rheinberger. Bologna, Berlin, Il Mulino; Duncker & Humblot, pp. 19-54.

<sup>3</sup> J. Keller, *Die ungeschlechtliche Fortpflanzung der Süßwasserturbellarien*, in «Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft», **28** (1894), pp. 370-407.

<sup>4</sup> P. Steinmann, *Untersuchungen über das Verhalten des Verdauungssystems bei der Regeneration der Tricladen*, in «Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen», **25** (1908), pp. 523-568.

<sup>5</sup> V. Danckhoff, *Differentiation by Segregation and Environment in the Developing Organism* in «The American Naturalist», **51** (1917), 607, pp. 419-428.

<sup>6</sup> M. Abeloos, *La régénération et les problèmes de la morphogenèse*, Paris, Gauthier-Villars, 1932.

singola cellula non proliferava, anche se posta nelle migliori condizioni di nutrimento. Le cellule tumorali, dimostrò Harrison negli anni Venti del Novecento, contravvengono a questa regola, e sono immuni all'influenza dai tessuti che le circondano, così che non modificano radicalmente il loro comportamento quando isolate e poi reintegrate nell'organismo: sono in grado di produrre colonie anche a partire da un singolo elemento. Un altro carattere peculiare delle cellule tumorali, scoperto grazie alle colture tissutali, è la loro immutata capacità di produrre tumori una volta reimmesse nell'organismo dopo l'isolamento.

### **Cloni, teratomi, embrioni**

Dallo sviluppo delle tecniche embriologiche, e da un'intuizione di uno degli embriologi più influenti dell'epoca nacque anche il primo esperimento riuscito di clonazione per trasferimento nucleare. Immaginato da Hans Spemann, che ne parlò nella sua lezione Nobel nel 1938, fu portato a termine solo negli anni Cinquanta da Robert Briggs e Thomas King<sup>7</sup> negli USA, i quali utilizzarono nuclei provenienti da cellule indifferenziate di embrioni di *Rana pipiens*, e dimostrarono che l'introduzione del nucleo riusciva a stimolare l'avvio dello sviluppo ontogenetico. Circa un decennio più tardi, John Gurdon riuscì nella clonazione di una rana (*Xenopus laevis*) adulta utilizzando il nucleo di una cellula dell'epitelio intestinale<sup>8</sup>. Dalla clonazione di Gurdon, a Dolly sono passati oltre trent'anni: nel frattempo la "meccanica dello sviluppo" e l'embriologia sperimentale sono diventate biologia dello sviluppo, e molti processi dello sviluppo sono stati chiariti definitivamente, così che oggi abbiamo informazioni piuttosto complete sulle diverse fasi di sviluppo cellulare e su quelle del ciclo vitale della singola cellula. La storia della comprensione dei meccanismi cellulari è andata di pari passo con gli sviluppi delle tecniche zootecniche e delle conoscenze sulla fecondazione artificiale. Dolly è dunque il risultato di una lunga e multiforme storia scientifica. Le cellule staminali, come concetto biologico, hanno quindi un'origine storica variegata. Lo studio delle cellule della rigenerazione e quelle dell'embrione è stato affiancato alla fine dell'Ottocento dalla ricerca sui lignaggi cellulari dei tessuti adulti. Questo approccio si è rivelato il più fruttuoso in termini di comprensione dei meccanismi eziopatologici di diverse malattie, nonché foriero delle poche terapie che sfruttano le capacità di divisione asimmetrica delle cellule staminali. Fa parte di questo filone lo studio delle cellule staminali ematopoietiche. Già all'inizio del XX secolo il russo Alexander Maximow aveva ipotizzato che le cellule del sangue avessero tutte un'origine comune, da rintracciare all'interno del midollo osseo<sup>9</sup>. Negli anni Cinquanta divenne poi chiaro che proprio delle cellule presenti nel midollo erano in grado di dare origine a tutte le cellule del sangue, e furono messe a punto le procedure cliniche per i trapianti di midollo. Prima si

---

<sup>7</sup> R. Briggs e T. J. King, *Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs*, in «Proc Natl Acad Sci U S A», **38** (1952), 5, pp. 455-463.

<sup>8</sup> J. B. Gurdon, *The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles*, in «J Embryol Exp Morphol», **10** (1962), pp. 622-40.

<sup>9</sup> A. Maximow, *Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere*, in «Folia Hematologica», **8** (1909), pp. 125-134.

sperimentò su gemelli omozigoti – per i quali si sapeva che la reazione di rigetto immunitario non sarebbe stato un problema – per patologie oncologiche come le leucemie, mentre negli anni successivi si riuscì a trapiantare il midollo anche di pazienti non geneticamente correlati, e a usare la procedura in malattie non oncologiche. Oggi il trapianto di tutto il midollo è stato affinato grazie alle conoscenze sulla biologia delle cellule staminali: infatti, vengono reimmesse nel donatore solo le cellule staminali ematopoietiche isolate nel ricevente.

Il primo modello sperimentale per lo studio delle cellule staminali umane fu ottenuto invece studiando i teratomi, tumori benigni delle cellule germinali al cui interno si trovano molti tipi cellulari diversi, indicando l'esistenza di cellule in grado di dare origine a tessuti di tipo diverso. Osservate sin dall'antichità, il nome di queste neoformazioni deriva da *teratos*, mostro in greco, poiché vi si rintracciano capelli, denti, cartilagini e altre strutture ben riconoscibili. L'origine dei teratomi era stata ascritta a una "cellula embrionale" latente nell'organismo adulto già negli anni Ottanta dell'Ottocento, ma solo nella seconda metà del Novecento si riuscì a identificarla. Fu Leroy Stevens del Jackson Laboratory di Bar Harbor tra anni Cinquanta e Sessanta a descrivere in modo dettagliato la biologia di questo tipo di tumori, a partire dall'evento che li origina in un piccolo gruppo di cellule nella cresta genitale negli embrioni di topo<sup>10</sup>. Contemporaneamente, Barry Pierce e Lewis Kleinsmith dimostravano che i teratomi nelle gonadi derivano da un'unica cellula, trapiantando trapiantare singole cellule indifferenziate ottenute da teratomi, e provocando nei topi destinatari nuove formazioni tumorali<sup>11</sup>. In altre parole, avevano dimostrato che un'unica cellula – la cellula staminale multipotente del teratoma – poteva dare vita a tutte le cellule diverse che si riscontravano nel tumore.

Le cellule embrionali dei teratomi sono poi state il modello sperimentale per le tecniche di coltura delle staminali. Solo negli anni Settanta Martin Evans e Gail Martin dello University College di Londra riuscirono a mantenere indifferenziata una linea di cellule staminali del teratoma: la chiave fu la scoperta del fatto che solo oltre una certa soglia di aggregazione le staminali iniziano a differenziarsi, riprendendo i tipici processi di sviluppo embrionale<sup>12</sup>. Per far ciò, fu centrale l'introduzione di una nuova tecnica di coltura, che utilizzava uno strato di cellule incapaci di dividersi come sostegno per le cellule da crescere.

Parallelamente, si sviluppò la ricerca sulle altre cellule staminali totipotenti, quelle provenienti dagli embrioni, la cui storia si intreccia con gli studi sulla fecondazione *in vitro*. Fu infatti lo stesso gruppo di Cambridge, guidato da Robert Edwards, che fece nascere nel 1978 la prima *bambina in provetta*, a coltivare cellule embrionali prelevate da blastocisti di coniglio, assistendone al progressivo differenziamento. Pochi anni dopo, si riuscì a ottenere nel topo le prime linee di cellule staminali embrionali: la loro caratterizzazione si basò sugli studi fatti sulle

---

<sup>10</sup> L. C. Stevens, *Experimental Production of Testicular Teratomas in Mice*, in «Proc Natl Acad Sci U S A», **52** (1964), pp. 654-61.

<sup>11</sup> L. J. Kleinsmith e G. B. Pierce, Jr., *Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells*, in «Cancer Res», **24** (1964), pp. 1544-51.

<sup>12</sup> G. R. Martin e M. J. Evans, *The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture*, in «Cell», **2** (1974), 3, pp. 163-72; G. R. Martin e M. J. Evans, *Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro*, in «Proc Natl Acad Sci U S A», **72** (1975), 4, pp. 1441-5.



cellule staminali dei teratomi, ricercandone gli stessi marcatori, e sulle loro capacità di differenziazione<sup>13</sup>. Nel giro di pochi anni furono anche evidenziate le caratteristiche del mezzo di coltura necessarie affinché non iniziasse il differenziamento delle cellule.

La coltivazione delle cellule staminali embrionali umane avvenne più tardi, nonostante fossero già disponibili gli stessi strumenti utilizzati per l'identificazione della loro controparte murina. All'origine di questo ritardo, vi fu probabilmente la difficoltà a procurarsi il materiale necessario per la ricerca (embrioni umani), e i connessi problemi etici. Così solo nel 1998 le cellule staminali embrionali umane sono state ottenute e coltivate *in vitro*, dal gruppo dell'Università del Wisconsin – Madison guidato da Jim Thomson e finanziato da una company, la Geron<sup>14</sup>. Con questo risultato, si è aperta una nuova era per la medicina rigenerativa.

### L'alba della medicina rigenerativa

Le cellule staminali embrionali sono potenzialmente in grado di rigenerare ogni tessuto dell'organismo adulto, e quindi controllarne appieno i processi di sviluppo significherebbe di fatto avere una fonte infinita di tessuti per la cura delle malattie degenerative o di importanti lesioni del sistema nervoso centrale, nonché delle cellule che *in vitro* possono replicare qualsiasi tipo di malattia e costituire un perfetto modello sperimentale. Le promesse terapeutiche sono tuttavia ancora piuttosto remote. Diversi studi in fase preliminare indicano la possibilità di utilizzarle nella clinica, ma i timori per il loro comportamento sul lungo periodo permangono. Il principale limite al loro utilizzo, al di là delle questioni bioetiche è che il loro grande potenziale è un'arma a doppio taglio, che le rende difficili da controllare e quindi suscettibili di trasformarsi in cellule tumorali.

I problemi etici posti dalle cellule staminali embrionali sono stati superati dalle cosiddette *cellule staminali pluripotenti indotte* (iPSC). Queste sono cellule sono state ottenute dal gruppo di Shinya Yamanaka a Kyoto prima nel topo poi nella nostra specie, rispettivamente nel 2006 e nel 2007, grazie all'espressione di quattro geni specifici (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-myc* e *Klf4*), e praticando la transfezione con un virus<sup>15</sup>. Successivamente, è stato dimostrato che è possibile ottenere lo stesso risultato con ripetuti trattamenti con proteine specifiche, che imitano l'attivazione di questi geni. Yamanaka nel 2012 è stato premiato con il Nobel per questi studi fondamentali per oltrepassare gli ostacoli bioetici, in quanto consentono di ottenere cellule pluripotenti senza distruggere gli embrioni. Rimangono tuttavia da fugare i dubbi sulla sicurezza di queste cellule, che hanno come le cellule staminali embrionali, un'alta propensione a formare tumori. Inoltre, se vengono ottenute grazie a una transfezione virale, potrebbero portare

---

<sup>13</sup> M. J. Evans e M. H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*, in «Nature», **292** (1981), 5819, pp. 154-6.

<sup>14</sup> J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall e J. M. Jones, *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*, in «Science», **282** (1998), 5391, pp. 1145-7.

<sup>15</sup> K. Takahashi e S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*, in «Cell», **126** (2006), 4, pp. 663-76; K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda e S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*, in «Cell», **131** (2007), 5, pp. 861-72.

all'attivazione di geni patogeni. Le strategie di silenziamento di questi geni saranno cruciali per introdurre le iPSC nella clinica. Ad oggi, le loro potenzialità sono state dimostrate in modelli animali, ma le applicazioni negli umani sono ancora lontane. Come le ESC, sono al momento da considerare più uno strumento sperimentale (per la farmacologia per esempio) che un mezzo terapeutico.

Alle cellule pluripotenti, native o indotte, fanno da contraltare le cellule staminali cosiddette adulte, o somatiche, che hanno già percorso una prima parte del processo di differenziamento, ma hanno ancora la possibilità di differenziarsi in un numero limitato di cellule. Questo tipo di staminali viene estratto direttamente dai tessuti dell'organismo adulto, senza quindi la distruzione degli embrioni. Rintracciate praticamente in ogni distretto corporeo, sono alla base del rinnovamento fisiologico più o meno rapido dei diversi tessuti. La loro limitata capacità proliferativa le rende relativamente sicure nell'uso clinico, ma la loro limitata plasticità ne inficia l'uso. Non sempre infatti le cellule staminali di un tessuto, se reinfuse in un paziente, riescono a differenziare in tutte le cellule necessarie a una rigenerazione completa. Il controllo di questi processi è all'oggi ancora estremamente limitato, anche per le cellule meglio caratterizzate. Il primo esempio di terapia con cellule staminali, usato da decenni, è il trapianto di cellule staminali ematopoietiche, detto anche trapianto di midollo osseo. In questa procedura, il midollo viene prelevato dal donatore, e da questo tessuto si prelevano le cellule staminali, per reinfonderle nel paziente ricevente. Nonostante queste cellule siano note e utilizzate da molto tempo, l'espansione *in vitro* di questo particolare tipo cellulare (che garantirebbe una maggiore efficacia ai trapianti) continua ad essere estremamente difficile. Un'altra applicazione efficace della terapia cellulare si basa sull'uso delle cellule staminali della pelle, messo a punto da Howard Green nel 1983 per il trattamento dei grandi ustionati. Cellule staminali sono state utilizzate anche da Michele De Luca e Graziella Pellegrini per trattare i pazienti la cui cornea è stata danneggiata da ustioni chimiche estese. Applicazioni più spettacolari, ma comunque ancora lontane dalla clinica vengono dalla cosiddetta ingegneria dei tessuti. In questo campo ci si sta attrezzando per produrre interi organi, nella loro intera struttura tridimensionale, e alcuni risultati preliminari ne hanno mostrato la fattibilità. Tuttavia, è ancora lungo il percorso per arrivare a un loro utilizzo terapeutico, dovendo superare i problemi legati all'inserimento fisiologicamente funzionale degli organi prodotti all'interno dell'organismo.

Molta attenzione hanno ricevuto anche le cellule staminali mesenchimali (dette anche stromali), prelevate da diversi tessuti (sangue del cordone ombelicale, tessuto adiposo, midollo osseo), e che normalmente si differenziano in cartilagine, osso e adipe. Diverse pubblicazioni hanno mostrato dati controversi sulla plasticità di queste cellule, ipotizzando la loro trasformazione in cellule muscolari e neuroni, anche se questi risultati non sono stati confermati. Queste cellule si sono dimostrate attive nel rilasciare fattori di crescita e citochine capaci di indurre effetti importanti: stimolano l'angiogenesi, rallentano i processi di morte cellulare e contrastano i processi infiammatori. I risultati ottenuti in alcune sperimentazioni *in vivo* sarebbero da attribuire a queste caratteristiche, e non esistono prove di una loro plasticità nel differenziamento. Anche i presunti miglioramenti nei pazienti ottenuti con le infusioni di cellule staminali mesenchimali autologhe ed eterologhe effettuate secondo metodi clinicamente più sicuri di quelli raccontati ai giornali dalla Fondazione Stamina, sarebbero da ascrivere alle proprietà antinfiammatorie delle citochine rilasciate. Gli effetti

benefici di un trapianto o un'infusione di mesenchimali sarebbero quindi temporanei, e non il prodotto di una rigenerazione cellulare. Va quindi sottolineato come tutte le terapie a base di cellule staminali (sia quelle ampiamente collaudate sia quelle in fase di sperimentazione) utilizzate con qualche apparente successo, non ne hanno sfruttato la plasticità. Il trapianto di midollo per la cura di alcune malattie del sangue, per esempio, non prevede che le cellule staminali ematopoietiche modifichino il proprio destino. Anche i risultati positivi osservati nel corso di terapie sperimentali contro malattie degenerative o per l'infarto del miocardio, non sembrano in realtà dovuti a un "salto" tissutale da parte delle cellule, quanto ai processi che riescono a stimolare nell'ambiente che le circonda. Inoltre, anche i trial clinici condotti utilizzando cellule staminali (soprattutto mesenchimali) per il trattamento dell'infarto hanno finora dato risultati inferiori alle attese.

È proprio quindi la pratica clinica a essere l'ultimo grado di giudizio per la presunta plasticità delle cellule staminali somatiche: la persistenza e la funzionalità delle cellule staminali transdifferenziate dopo trapianto nell'organismo sono le caratteristiche principali che possono permettere di sapere quali sono i limiti di una terapia cellulare. Da qui la necessità di coniugare ricerca di base e ambito clinico, con sperimentazioni condotte con metodi rigorosi e dotate di un robusto razionale scientifico: medicina e biologia si inseguono in un circolo virtuoso.

La medicina rigenerativa, ormai istituzionalizzata ad ogni livello, avrà la possibilità di ricambiare le tante speranze suscitate nel pubblico solo se sarà in grado di muoversi nel solco della tradizione storica che è stata tracciata: l'intreccio di tanti e diversi filoni di ricerca, ognuno con il proprio bagaglio di conoscenze, tecniche e approcci. Una molteplicità in grado di affrontare ad ogni livello le questioni della rigenerazione terapeutica per l'organismo umano, così da comprenderne i meccanismi e mettere a punto trattamenti efficaci. Rinunciare a integrare le diverse prospettive significherebbe privare la pratica clinica di fondamenti biologici, aprendo le porte a una medicina empirica incapace di produrre nuove conoscenze e di indicare le strade più promettenti, e rischiando di trasformarsi in una pratica sempre meno scientifica. Il "caso Stamina" rappresenta un esempio estremo: "Funziona! Non vi basta?" gridano i profeti autoproclamati, sollevandosi dalla responsabilità di analizzare le basi biologiche del fenomeno. Ma è proprio questa capacità di connettere biologia e medicina che rappresenta la nostra tradizione medica, e in ultima analisi ci fornisce gli strumenti per distinguere le buone pratiche cliniche dalle illusioni parascientifiche.

### 3.2

## Cronologia essenziale della ricerca sulle cellule staminali e della regolamentazione dei trattamenti con farmaci

Adattato e modificato da P.Bianco, M. Capocci, G. Corbellini, Cronologia della ricerca sulle cellule staminali mesenchimali (MSC) in rapporto agli sviluppi della scienza delle staminali e della ricerca medica. In M. Capocci e G. Corbellini (a cura di), *Le cellule della speranza. Il caso Stamina tra inganno e scienza*. Codice Edizioni, Torino, 2014. Adattamento e modifiche di E. Cattaneo e G. Corbellini.

| Cronologia Staminali                                                                                                                                                                                                                                                                         | Cronologia regolamentazioni                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1868</b> Ernst Haeckel usa il termine <i>stamzell</i> per indicare un “organismo ancestrale unicellulare” da cui sono derivati gli organismi multicellulari.                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>1892</b> Theodor Boveri e Valentin Hecker usano il termine <i>stamzell</i> per identificare le cellule cui maggiormente è ascrivibile lo sviluppo ontogenetico. Nel 1894 Jacob Keller associa le <i>stamzellen</i> anche alla rigenerazione e alla riproduzione asessuale nella planaria. |                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>1896</b> Edmund Wilson usa il termine inglese “stem cell” in <i>The Cell in Development and Inheritance</i>                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>1906</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US <i>Pure Food and Drug Act</i> : lo scopo è di smascherare farmaci adulterati e con etichette ingannevoli. L'incarico di controllare viene affidato al Bureau of Chemistry del Dipartimento dell'Agricoltura. |
| <b>1909</b> L'istologo ed embriologo russo Alexander A. Maximow ipotizza l'origine comune di tutte le cellule del sangue, indicando (erroneamente) i linfociti come cellule staminali ematopoietiche.                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                 |

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1930</b>           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Viene creata la Food, Drug and Insecticide Organization del Dipartimento dell'Agricoltura statunitense, che nel 1927 aveva incorporato il Bureau of Chemistry, assume il nome di Food and Drug Administration (FDA).      |
| <b>1938</b>           | Hans Spemann immagina per la prima volta l'esperimento di clonazione per trasferimento nucleare                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Il US <i>Food, Drug and Cosmetic Act</i> , accentua i controlli sui farmaci che sono commercializzati sul piano della sicurezza, e amplia i poteri dell'FDA                                                               |
| <b>1945-</b>          | Gli effetti delle bombe atomiche lanciate su Hiroshima e Nagasaki, aprono la strada a ricerche finanziate pubblicamente sugli effetti delle radiazioni e sulla radioprotezione: studi strategici finanziati dal Department of Defense danno inizio agli studi che porteranno all'identificazione della cellula staminale ematopoietica (HSC, hematopoietic stem cell). Studi simili condotti per la stessa ragione in URSS, porteranno al lavoro di Alexander Friedenstein, allievo di Maximow e alla scoperta delle staminali mesenchimali (MSC, mesenchymal stem cell). |                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>1947</b>           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Il tribunale di Norimberga condanna i medici nazisti sulla base di un codice etico che diverrà noto come Codice di Norimberga, e che giudica illecito sperimentare su soggetti umani in assenza di "consenso volontario". |
| <b>1952</b>           | Briggs e King realizzano l'esperimento immaginato da Spemann e ottengono girini normali trapiantando nuclei da cellule della blastocisti in oociti enucleati di <i>Rana pipiens</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>1957</b>           | Edward Donnall Thomas pubblica i dati dei primi trapianti di midollo osseo nell'uomo.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>1961-<br/>1963</b> | Ernest A. McCulloch e James E. Till dimostrano l'esistenza di progenitori multipotenti nel midollo osseo (CFU-                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                           |

S): prima prova (incompleta)  
dell'esistenza della cellula staminale  
ematopoietica

---

|             |                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1962</b> | John Gurdon ottiene la nascita di rospi ( <i>Xenopus laevis</i> ) mediante trapianto nucleare di cellule differenziate in oociti enucleati.                                | Il caso della talidomide induce gli Stati Uniti a integrare il <i>Food, Drug and Cosmetic Act</i> del 1938, con un emendamento che richiede una "substantial evidence" di efficacia dei farmaci per cui si chiede l'autorizzazione.                                                                                                                                              |
| <b>1964</b> |                                                                                                                                                                            | La <i>World Medical Association</i> emana la <i>Helsinki Declaration</i> , che aggiorna le basi etiche della sperimentazione clinica sull'uomo, periodicamente aggiornata e oggi alla sesta edizione. La Dichiarazione di Helsinki stabilisce gli standard etici che devono essere rispettati per garantire la protezione dei soggetti arruolati nelle sperimentazioni cliniche. |
| <b>1968</b> | Presso l'Università del Minnesota, il gruppo di Robert Good porta a termine il primo trapianto di midollo per trattare un bambino con un'immunodeficienza grave combinata. | L'Organizzazione Mondiale della Sanità inizia a elaborare delle linee guida internazionali per la valutazione clinica dei farmaci.                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>1969</b> | Thomas effettua con successo alla Washington University di Seattle i primi trapianti di midollo su adulti con leucemia.                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|             | Robert Edwards, Barry Barrister e Patrick Steptoe ottengono la prima fecondazione <i>in vitro</i> di un oocita umano                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>1978</b> | Il 25 luglio nasce Louise Brown, la prima bambina concepita <i>in vitro</i> . L'equipe di Edwards è in grado di coltivare un embrione umano.                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

---

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1980</b>      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Viene approvato negli USA il Bayh-Dole Act, che permette il brevetto di invenzioni realizzate con fondi federali. Ciò consente anche alle università pubbliche di brevettare i propri risultati.                                                                                                                                 |
| <b>1981</b>      | Martin Evans e Matt Kaufman isolano e coltivano cellule staminali derivate da blastocisti di topi.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>1984</b>      | Eugene Bell del MIT conia il termine "tissue engineering".                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>1985-1993</b> | Maureen Owen contribuisce a formulare il concetto di "sistema stromale" e "cellula staminale stromale", in analogia con l'ematopoiesi. Definisce "sistema stromale" l'insieme delle vie ( <i>lineage</i> ) generate da un progenitore stromale comune (adipociti, cartilagine, osso, fibroblasti), e il progenitore comune come una putativa cellula staminale. Alla fine degli anni Ottanta Alexander Friedenstein si trasferisce in sabbatico a Oxford, da Owen, e ipotizza che i progenitori multipotenti da lui identificati siano delle possibili cellule staminali osteogeniche. | Europa e Giappone sviluppano le loro linee guida di <i>good clinical practice</i> . Le differenze tra US, Europa e Giappone sul piano regolatorio comportano una perdita di efficienza economica per le imprese farmaceutiche che devono investire in trials diversi se vogliono vendere un farmaco su un mercato che è globale. |
| <b>1987</b>      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | La Congregazione per la Dottrina della Fede rilascia l'istruzione <i>Donum Vitae – Il rispetto della vita umana nascente e la dignità della procreazione</i> .                                                                                                                                                                   |
| <b>1988</b>      | Elaine Gluckman esegue in Francia il primo trapianto di cellule staminali emopoietiche del cordone ombelicale per curare un bambino seienne con anemia di Fanconi. Il risultato è possibile grazie alle ricerche di Edward A. Boyse, che lavorando negli anni Ottanta allo Slona-Kettering Institute di New York dimostra che le cellule del cordone ombelicale possono essere trapiantate al posto del midollo per ricostituire il sistema immunitario                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

umano.

L'uso delle staminali del cordone ombelicale ha dei limiti tecnici, che non giustificano l'eccitazione circa l'utilità di bancare i cordoni ombelicali come riserva "personale" di staminali per il titolare biologico, se non in rari casi molto selezionati.

---

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1994</b> | L'NIH Human Embryo Research Panel dichiara che la creazione di embrioni umani solo per scopi di ricerca non incoraggerà gli aborti, e sull'onda delle reazioni pubbliche il Presidente Clinton annulla il documento NIH e ribadisce la moratoria sui finanziamenti alla ricerca su cellule derivate da embrioni umani. |
| <b>1995</b> | Con il Dickey-Wicker Amendment, il Congresso degli Stati Uniti mette al bando il finanziamento federale della ricerca su cellule ottenute da embrioni umani.                                                                                                                                                           |
| <b>1996</b> | Nasce la International Conference on Harmonisation (ICH) che riunisce le autorità regolatorie di Europa, US e Giappone, insieme a esperti dell'industria farmaceutica, per uniformare gli standard per l'accettazione dei risultati degli studi clinici.                                                               |
| <b>1997</b> | Il 23 febbraio viene annunciata su <i>Nature</i> la nascita di Dolly, il primo mammifero clonato utilizzando il nucleo di una cellula somatica adulta.                                                                                                                                                                 |

Michele De Luca e Graziella Pellegrini pubblicano su *Lancet* di avere ottenuto la rigenerazione di un epitelio corneale funzionale trapiantando cellule staminali limbali coltivate in pazienti con ustioni che hanno distrutto il



limbus.

---

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1998</b>      | James Thomson isola e coltiva cellule embrionali pluripotenti umane (Science 1988). Il suo lavoro è stato finanziato da Geron Corporation, che acquisisce, insieme alla Wisconsin University, i relativi brevetti per sviluppare commercialmente le "cellule staminali embrionali umane".                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>1999-2000</b> | Vengono pubblicati una serie di studi che dimostrerebbero la "transdifferenziazione" di staminali del sangue in neuroni o di staminali neurali in cellule del sangue attraverso semplice impianto delle cellule. Gli studi non sono confermati e/o vengono abbandonati.                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>2001</b>      | Un gruppo di medici e ricercatori cinesi, con appoggi universitari e governativi, effettua il primo trattamento di un caso di SLA con staminali da cordone ombelicato manipolato, e nel 2005 darà vita a Beike Biotech, un'impresa privata che ha ricevuto però oltre 100 milioni di dollari di finanziamento governativo, e che rifornisce diversi ospedali cinesi con preparati a base di staminali da cordone ombelicale per trattare un'ampissima gamma di malattie. | Il biologo, imprenditore e filantropo William A. Haseltine utilizza l'espressione "medicina rigenerativa", inventata nel 1992 da Leland Kaiser, per raggruppare le tecnologie (dalla terapia genica alla terapia con staminali all'ingegneria tissutale alla protetica biomeccanica) che hanno il comune obiettivo di ripristinare la funzione normale di organi, tessuti e cellule danneggiati da traumi, malattie e o "consumati" dal tempo. |

Non esistono studi controllati e nemmeno un razionale scientifico relativamente all'efficacia e agli effetti di questi trattamenti.

Il 9 agosto, dal suo ranch in Texas, George W. Bush emette la prima ordinanza del suo mandato presidenziale, vietando il finanziamento con fondi federali di ricerche che impiegano cellule staminali embrionali umane prodotte dopo quella data, comunicando che erano disponibili circa 64 linee cellulari per fare ricerche su staminali embrionali, tutte derivate da embrioni soprannumerari abbandonati in cliniche ginecologiche. Analisi successive dimostrarono che le linee di cellule

effettivamente disponibili erano nell'ordine di alcune unità.

---

**2002** Nasce l'International Society for Stem Cell Research (ISSCR), un'organizzazione indipendente per promuovere la comunicazione pubblica e professionale sulla ricerca di base e applicativa delle cellule staminali.

---

**2003**

L'Unione Europea vara il VI programma quadro della ricerca con l'obiettivo di formare grandi consorzi di ricerca e aumentare la competitività dell'eurozona. Il Programma parte però con un anno di "moratoria" per quanto riguarda le ricerche che includono staminali embrionali. Alcuni ministri – tra cui quello italiano - degli allora 15 stati membri chiedevano tempo per definire una politica comunitaria sulla ricerca che faceva uso di queste cellule affascinanti e controverse. Al termine, durante il semestre italiano, l'ex Ministro Moratti si presentò a Bruxelles con un nulla di fatto. La Commissione UE diede quindi seguito al mandato del Parlamento Europeo di finanziare anche la ricerca che include cellule staminali embrionali umane, nel rispetto di linee guida tuttora in vigore e sono adottate da tutti i ricercatori che fanno parte dei consorzi di ricerca finanziati dai fondi comunitari.

---

**2004**

Nello stato della California viene approvata la Proposition 71, attraverso un referendum che si tiene il 2 novembre e con il 59% di voti favorevoli. La Proposition 71 autorizza quello stato a finanziare con 3 miliardi di dollari per un periodo di 10 anni la ricerca su cellule staminali embrionali.

---

**2005** Esplode il caso di Woo Suk Hwang della Seoul National University, che sostiene di aver trovato il modo di

Il 25 maggio entrano in vigore le norme previste dalla *Good Tissue Practice* della US Food and Drug

ottenere la clonazione terapeutica – cioè cellule staminali embrionali umane geneticamente identiche ai pazienti che necessitano la terapia cellulare – ma gli scienziati indagano e i risultati si rivelano manipolati. Hwang verrà estromesso dai circuiti scientifici, processato e espulso dall'Università.

Administration. L'ultimo aggiornamento risale al dicembre 2011.

Prima designazione di FDA per un iter Fast Track (che accorcia i tempi per l'uso clinico di un farmaco) assegnato a un prodotto a base di cellule staminali.

---

**2006** Shinya Yamanaka pubblicando su *Cell*, dimostra che i geni Oct4, Klf4, Sox2, Myc (OKSM) riprogrammano cellule somatiche adulte in cellule pluripotenti.

Giulio Cossu e collaboratori pubblicano su *Nature* i risultati di studi su cani distrofici, dimostrando che le staminali mesangioblastiche producono beneficio dopo trapianto. Gli studi aprono alla sperimentazione clinica tuttora in corso.

---

**2007** I ricercatori dell'Oregon National Primate Research Center pubblicano su *Nature* il risultato di esperimenti in cui ottengono embrioni clonati di scimmia e cellule staminali embrionali dagli stessi.

Il 13 novembre l'Unione Europea ribadisce che le cellule estensivamente modificate *ex vivo* sono medicinali per terapie avanzate (e non trapianti cellulari): Regulation EC (No) 1394/2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004

---

**2008** All'università di Bristol viene effettuato in una giovane donna il primo trapianto di una trachea ottenuta ingegnerizzando le cellule staminali della stessa paziente.

L'ISSCR pubblica le nuove Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cells. Alla loro stesura partecipano alcuni scienziati italiani.

---

**2009** .

Il 9 marzo il nuovo presidente USA Barack Obama, come primo atto del suo mandato presidenziale firma l'Ordine Esecutivo che rimuove il veto al finanziamento pubblico della ricerca su staminali derivate da

embrioni.

---

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2010</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | FDA approva le prime due sperimentazione cliniche di cellule staminali embrionali, condotte da Geron e da Advanced Cell Science. La sperimentazione di Geron viene interrotta per dichiarati problemi economici.                                                                                                                                                            |
| <b>2011</b> | Lorenz Studer dello Sloan-Kettering di New York pubblica su <i>Nature</i> il primo studio che dimostra la produzione di neuroni dopaminergici autentici da staminali embrionali umane e da cellule iPS. I progenitori dopaminergici trapiantati in modelli animali di Parkinson (topo e ratto) funzionano con risultati nell'animale mai visti prima. Il trapianto nella scimmia dimostra la sopravvivenza e la maturazione delle cellule trapiantate. | In maggio viene chiusa dalle autorità tedesche l'XCell Center di Dusseldorf, che somministrava trattamenti a base di staminali derivate da cordone ombelicale per trattare diversi tipi di malattia, al costo di circa 25mila € a trattamento. Nel 2010 nella clinica tedesca si era verificato un caso di morte in un bambino di 18 mesi appena sottoposto alla procedura. |
| <b>2012</b> | Paolo Rama del S.Raffaele di Milano e Graziella Pellegrini insieme a Michele De Luca dell'Università di Modena e Reggio Emilia pubblicano su <i>New England Medical Journal</i> i risultati dei loro trapianti di staminali limbari nelle lesioni della cornea, dimostrando il recupero della vista anche molti anni dopo il trapianto.                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>2012</b> | Su <i>Lancet</i> sono riportati i miglioramenti della visione in due pazienti colpiti da degenerazione maculare, che da quattro mesi hanno ricevuto impianti di cellule epiteliali pigmentate retiniche ottenute a partire da staminali embrionali umane.                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>2013</b> | Il team di Luigi Naldini del San Raffaele di Milano pubblica due lavori su <i>Science</i> , dimostrando l'efficacia della terapia genica in staminali in due malattie genetiche.                                                                                                                                                                                                                                                                       | Esplode in Italia il caso Stamina. Un ospedale del nord Italia autorizza un ente non medico e un professore di lettere indagato dai NAS a iniettare preparati ignoti in pazienti con malattie rare e degenerative incurabili. L'ordinanza di blocco dell'AIFA e dei NAS è aggirata da diversi tribunali che ordinano                                                        |

In Gennaio, Nature Medicine pubblica un'articolata discussione sulla natura e possibile funzione terapeutica di MSC (Bianco et al Nat Med 2013), che è fortemente critica dell'uso indiscriminato di infusioni di MSC per malattie diverse, del proliferare di trial clinici senza fondamento scientifico, e della confusione concettuale e metodologica in tema di MSC

all'ospedale la somministrazione del "trattamento" non controllato. Un decreto ministeriale (57/2013) sancisce la continuazione del trattamento non provato per coloro che l'hanno iniziato. Dopo una serie di vicissitudini il Parlamento approva la sperimentazione clinica del preteso "metodo Stamina", che nel frattempo si scopre essere copiato da artefatti russi, oltre che respinto dall'ufficio brevetti USA. Una commissione scientifica voluta dal Ministero della Salute dirà, si spera, l'ultima parola, insieme alle indagini del PM di Torino Guariniello.

Intanto il 24 maggio tredici studiosi di staminali pubblicavano un articolo su *The EMBO Journal* in cui partendo dalle vicende del caso Stamina italiano, avvertono che anche in Europa la regolazione delle terapie con cellule staminali è sotto attacco, come negli Stati Uniti, e ribadiscono le ragioni e le prove per cui si dovrebbe continuare a regolare queste terapie come farmaci (Paolo Bianco et al., Regulation of stem cell therapies under attack in Europe: for whom the bell tolls, *The Embo Journal* 2013, 32, 1489-1495)

---

**2014** Dal 2006 ad oggi la ricerca sulla riprogrammazione di cellule adulte ha compiuto enormi passi attraverso verifiche e convalide multiple, e ha dimostrato che è possibile riprogrammare anche una cellula specializzata (fibroblasto) in un'altra specializzata (esempio in un neurone) direttamente, senza "passare" per lo stadio di pluripotenza e attraverso l'espressione forzata di geni specifici del destino cellulare desiderato. Nei primi mesi del 2014 un gruppo giapponese,

pubblicando su *Nature*, ritiene addirittura possibile che l'esposizione di cellule adulte ad ambiente acido sia sufficiente per ottenere la loro riprogrammazione in un'altra tipologia cellulare. La comunità scientifica tuttavia attende ulteriori controlli e repliche indipendenti di questi ultimi risultati.

Nel frattempo Masayo Takahashi del Riken Center for Developmental Biology annuncia intanto la selezione di pazienti per il primo trial clinico di un trattamento con cellule iPS, per una forma di cecità legata all'invecchiamento.

# 4

## CELLULE STAMINALI IN BIOLOGIA E NELLA MEDICINA RIGENERATIVA

di Elena Cattaneo  
Dipartimento di Bioscienze e Centro di Ricerca sulle Cellule Staminali, Università degli Studi di Milano

Articolo pubblicato su Seminari di Ematologia Oncologica, volume VIII, n. 2 – 2011, 5-22, ISSN2038\_2839.

### Introduzione

Normalmente lo sviluppo dei mammiferi procede a senso unico, con cellule dapprima immature che successivamente si specializzano (differenziano), diventano meno versatili, e quindi popolano e costruiscono i nostri tessuti. E' infatti solo in una breve finestra temporale, e cioè nelle prime fasi dello sviluppo, precisamente allo stadio di blastocisti, che tutte le cellule hanno la capacità di trasformarsi in uno qualsiasi dei 220 tipi cellulari del corpo umano, dalle cellule cardiache ai neuroni alle cellule della pelle. E' possibile estrarre queste cellule dalle blastocisti sovranumerarie (non in Italia), dando origine a linee di **cellule staminali embrionali (ES)** che possono essere propagate *in vitro* in modo illimitato senza che perdano quella loro straordinaria pluripotenza differenziativa (1).

Nelle successive fasi dello sviluppo dell'embrione impiantato, quindi allo stadio fetale, le cellule staminali che popolano i tessuti in via di formazione sono già specializzate avendo acquisito identità e potenzialità differenziative più ristrette e tipiche del tessuto in cui risiedono. Queste staminali sono anche dette staminali somatiche, o tessutali o fetali ma a volte le si trova raggruppate anche alla voce "staminali adulte", intese come cellule staminali dei tessuti già specializzati. Queste cellule garantiscono l'espansione numerica e la specializzazione necessaria alla formazione dei diversi tessuti di un individuo.

Nell'individuo formato, **cellule staminali adulte** continuano a popolare i diversi organi e tessuti, dovendo garantire quel ricambio cellulare necessario per la funzionalità dell'organo e la sopravvivenza dell'organismo. In questi singoli tessuti o organi adulti, la presenza di staminali sarà tanto più abbondante quanto maggiore è la necessità e la capacità rigenerativa del tessuto in questione. Le staminali adulte sono quindi molto diverse tra loro, come localizzazione, abbondanza e specializzazione, dovendo generare tessuti diversi.

Infine, ultime a comparire sulla scena, le **cellule staminali pluripotenti indotte (iPS)** sono il risultato del percorso a ritroso di quanto sopra descritto.

Partendo da una cellula matura è possibile, in laboratorio, riportare le cellule indietro nel tempo fino ad uno stadio qualificabile come simile a quello delle ES “vere” (2, 3).

Sono queste capacità delle cellule staminali, cioè la loro propensione all'auto-rinnovamento nonché la potenzialità differenziativa (diversa per le diverse staminali) ad attirare l'attenzione della ricerca. Questo interesse è soprattutto determinato dalla possibilità e dalla speranza di un loro impiego a livello clinico per trapianti riparativi. Ma le cellule staminali presenti nei tessuti adulti e nella blastocisti rappresentano anche una straordinaria possibilità di studio dello sviluppo umano, oltre ad essere un importante strumento di conoscenza di come si formano e come si ammalano i nostri tessuti, o dei meccanismi alla base delle malattie genetiche, potendo anche fornire informazioni circa la potenziale tossicità di farmaci. Il grosso challenge sarà però capire se e in quali condizioni queste cellule potranno essere impiegate in strategie di trapianto per sostituire cellule perdute nel corso di una lesione o di un processo degenerativo (4,5). In alcuni limitati ma importanti casi queste speranze sono già una realtà. Per tutte le altre situazioni occorrerà studiare e mettere a confronto le proprietà di tutte le staminali note, embrionali, fetali, adulte e iPS. Soprattutto, per quanto straordinaria una staminale possa essere in vitro, il vero test da superare è quello della sua capacità trapiantologica. Questo test rappresenta la “quintessenza” del comportamento delle staminali poiché è direttamente correlato alle funzioni di base della staminale, la sua capacità di integrarsi, aderire, migrare, sopravvivere, proliferare, decidere il proprio destino, differenziarsi e degenerare.

### **Le proprietà funzionali delle cellule staminali**

In base a quanto descritto sopra, sono due le caratteristiche che distinguono le cellule staminali: (a) l'auto-rinnovamento (o *self-renewal*), ossia la proprietà per la quale le cellule sono in grado di riprodurre se stesse e (b) il potenziale differenziativo, inteso come la capacità di una singola cellula di dare origine a una progenie che comprende differenti tipi cellulari.

Una ulteriore caratteristica, ancora più rigorosa, è su base funzionale: una cellula staminale è tale quando è in grado di generare tutte le cellule del tessuto in cui si trova per l'intera durata della vita dell'organismo. In base a tale definizione la staminale del sangue o della pelle si collocano ai vertici di questa classificazione. Tuttavia, per la maggior parte degli altri tessuti e delle altre staminali, ad oggi, questa dimostrazione funzionale manca o è incompatibile con il ruolo della staminale in questione (pensiamo ad esempio alla staminale del cervello, vedasi poi). C'è quindi molto dibattito su quali siano le “vere” cellule staminali. In base alla definizione sopra indicata anche le cellule ES, paradossalmente, non rientrerebbero tra le “vere” staminali essendo presenti nella blastocisti solo transientemente. Tuttavia nessun'altra cellula dell'organismo ne emula la pluripotenza e la capacità di autorinnovamento.

La classificazione può anche essere basata sulle caratteristiche di plasticità di una cellula. Le staminali vengono quindi definite *pluripotenti* o *multipotenti*. Al gruppo delle pluripotenti appartengono sia le ES che le iPS. Diversamente dallo zigote, le cellule pluripotenti non possono generare un organismo completo. Queste cellule sono in grado di produrre i derivati dei tre foglietti germinativi (ectoderma, mesoderma ed endoderma) e quindi generare staminali tessuto-



specifiche ma anche le tipologie di cellule funzionalmente distinte e mature che da essi derivano. Le cellule pluripotenti non possono generare cellule dei tessuti extra-embryonali (trofoectoderma e placenta). Al gruppo delle multipotenti appartengono invece le cellule staminali adulte. E' importante sottolineare che le staminali adulte (del sangue, della pelle, del muscolo, del sistema nervoso, del rene, ecc.), sebbene raggruppate in un'unica tipologia, comprendono categorie e definiscono ambiti di ricerca ben distinti, in quanto a caratteristiche delle cellule, possibilità del loro isolamento ed espansione, potenzialità differenziativa e ipotetici impieghi terapeutici.

Una nota a parte merita lo zigote. *Si tratta* di una cellula *totipotente* in quanto può differenziare dando origine ad un organismo completo. E' una cellula transiente non espandibile come tale. Diversamente dalle staminali pluripotenti, lo zigote può dare origine ai tessuti extra-embryonali.

### **La pluripotenza delle embrionali e i tests da superare**

Furono Martin Evans e Matthew Kaufman, nel 1981, i primi a riuscire a coltivare in laboratorio le cellule ES (6). Partirono da blastocisti di topo, l'embrione *in vitro* pre-impianto. La blastocisti ha una morfologia sferoidale cava, che si forma a partire dallo stadio di 32 cellule (3,5 giorni post-coitum nel topo). E' composta da una parete esterna costituita da un monostrato di cellule epiteliali polarizzate, il trofoectoderma, che circonda la cavità interna (blastocela) e che racchiude un ammasso di cellule non polarizzate, la inner cell mass (ICM), presente ad un polo dello sferoide. Le cellule ES, isolate dalla ICM, sono state adattate per crescere e quindi dividersi *in vitro* generando linee di cellule ES stabili nel tempo e in quanto a caratteristiche biologiche. Queste cellule proliferano pur mantenendo la potenzialità di differenziarsi, quando opportunamente stimolate, dando origine a tutte le cellule dei tre foglietti embrionali, come farebbero se non fossero state rimosse dalla blastocisti. Esse sono quindi in grado di generare cellule del mesoderma, endoderma ed ectoderma. Ma il test d'elezione che devono superare per essere definite "pluripotenti" è quello della formazione delle chimere. Cioè, se re-introdotte in una blastocisti accettore, cellule staminali veramente pluripotenti devono integrarsi e contribuire a formare tutti i tessuti del corpo *in vivo*, incluso la linea germinale. Questo test viene comunemente condotto sulle cellule (e blastocisti) di topo e da qualche tempo anche nel ratto. Infine, un ulteriore test che viene condotto riguarda la formazione di teratomi. Se iniettate sottocute in un topo immunodepresso, le cellule pluripotenti generano un teratoma. Questo è un tumore dei tessuti embrionali, generalmente benigno. Esso è composto da tessuti derivanti da tutti e tre i foglietti embrionali: ectoderma, endoderma e mesoderma. Di qui la sua composizione morfologica comprendente tessuto nervoso, peli, tessuto tiroideo, tessuto osseo, cartilagineo, muscolare (6).

La derivazione di linee di cellule ES murine e la loro comprovata capacità di colonizzare tessuti animali dopo trapianto in blastocisti si è rivelata cruciale nel campo della mutagenesi sito-diretta e per indagare il ruolo di geni *in vivo*. E' grazie a questa scoperta e allo sviluppo della tecnologia del gene knock-out (ricombinazione omologa) ideata da Mario Capecchi che oggi è possibile studiare la funzione di singoli geni *in vivo*, nell'animale, eliminando in modo costitutivo o inducibile un gene nelle cellule ES che poi costituiranno l'animale in studio. Nel 2007, Oliver Smithies e Mario Capecchi, insieme a Martin Evans ricevettero il premio Nobel per la Medicina per queste scoperte.

Anche le cellule iPS superano il test della pluripotenza in quanto sono in grado di colonizzare i tessuti del topo dopo iniezione nella blastocisti, anche se alcuni lavori sembrano indicare una intrinseca capacità di generare tumori nell'animale. E' tuttavia possibile che questo fenomeno sia legato alla strategia usata per l'ottenimento delle iPS e che questo problema possa essere facilmente superato. In base a quanto descritto sopra non dovrebbe sorprendere che le cellule staminali adulte falliscano nei test di pluripotenza.

### **Le cellule staminali embrionali umane: risultati, speranze e conflitti.**

La disponibilità delle cellule staminali embrionali di topo ha permesso alla ricerca enormi passi avanti circa lo sviluppo di protocolli e di strategie per derivare da esse, in modo controllato, progenitori tissutali più ristretti, capaci di completare il differenziamento *in vitro* oppure *in vivo* dopo trapianto. Con questi protocolli è stato possibile ottenere dalle ES diverse classi di neuroni maturi (ad esempio i motoneuroni che degenerano nella sclerosi amiotrofica laterale o i neuroni dopaminergici che degenerano nel Parkinson) ma anche cellule cardiache, cellule muscolari o del pancreas. Dalle ES è anche stato possibile isolare quelle tipologie cellulari intermedie, come le staminali tissutali, così difficilmente purificabili direttamente dal tessuto *in vivo*. Un esempio è rappresentato dalle staminali neurali (7). Presenti in modo limitato nel cervello e difficili da isolare in modo prospettico (vedasi poi) è stato possibile ottenerle partendo dalle ES indotte a intraprendere un percorso di induzione neurale. Dopo circa 10 giorni dall'induzione, le staminali neurali ottenute dalle ES - solitamente transientemente presenti nel piattino di coltura - sono state "catturare" ed indotte in uno stato di continua proliferazione in presenza di mitogeni, prevenendo il loro spontaneo differenziamento terminale. Queste cellule, note con il nome di NS (da Neural Stem), rappresentano la prima staminale tissutale isolata e propagata in modo illimitato e omogeneo (cioè con il 100% della coltura composta da cellule NS). A seguito di questa scoperta, effettuata nel topo, altre cellule simili alle NS sono state ottenute dall'uomo. Si può quindi concludere che gli studi su cellule ES di topo hanno illuminato circa le potenzialità delle ES. Ed era ovvio che l'evento tanto atteso, a questo punto, non poteva che essere la derivazione di analoghe cellule dalla blastocisti umana.

Nel 1998 James Thomson e colleghi descrivono la derivazione di linee cellulari ES umane a partire da blastocisti umane (sovranumerarie) (8). Queste cellule hanno un aspetto inequivocabile caratterizzato dalla crescita a colonia composta da cellule con un nucleo di grosse dimensioni. Inoltre queste cellule presentano una carta d'identità specifica costituita dalla positività per una serie di marcatori come Oct4 e Nanog che ne determinano lo stato di pluripotenza.

Il grande interesse verso le cellule ES umane risiede nel fatto che, come la loro controparte murina, esse possono differenziare in tutti i tipi cellulari (ad esclusione dei derivati extraembrionali) del corpo umano, fetale ed adulto. In laboratorio, le cellule ES umane sono state differenziate in cellule epidermiche, adrenali e cheratinociti, ma anche in cellule dell'endotelio, del rene, dell'osso, del muscolo e del cuore, del pancreas e del fegato, anche se l'efficienza di queste conversioni non è totale. E' stato anche riportato il differenziamento di cellule ES umane in cardiomiociti ed in neuroni elettrofisiologicamente maturi, comparabili

con quelli presenti normalmente *in vivo*. I dati finora ottenuti indicano che questa capacità differenziativa non è emulabile da nessuna altra staminale adulta. Diversi studi hanno inoltre dimostrato che il trapianto di cellule derivate da cellule ES umane può migliorare, in modelli animali, alcune malattie congenite, incluso malattie cardiovascolari e diabete, o traumi del midollo spinale. Tuttavia il rischio dell'insorgenza di teratomi non è da sottovalutare e rappresenta uno degli aspetti in studio. Va comunque sottolineato che nell'applicazione clinica, la ricerca su queste cellule mira a differenziare parzialmente le cellule ES prima del trapianto nel paziente. Queste ultime rappresentano infatti un materiale più sicuro e già pronto per la trasformazione nel tessuto desiderato.

### **Le staminali adulte, una inesauribile fonte endogena**

Da sempre le cellule staminali adulte attirano l'interesse della ricerca di base e clinica per il fatto di essere "tessuto specifiche" quindi in un certo senso già specializzate, di essere endogene e quindi fisiologicamente rilevanti oltre che di più facile accesso rispetto alle embrionali (9). Ad esempio, l'estrema propensione rigenerativa del sangue nell'adulto è garantita da una inesauribile riserva di cellule staminali ematopoietiche "professioniste" che risiedono nel midollo osseo delle ossa piatte. Ogni giorno, queste cellule sono capaci di produrre 2,5 MLD di eritrociti, 2,5 MLD di piastrine e 1 MLD di leucociti per kg di peso corporeo per sostituire quelle "usurate". Un altro tessuto ricco in staminali è l'epidermide la quale, ogni minuto, perde (e deve rigenerare)  $30 \times 10^3$  cellule del suo strato più superficiale per permettere al nostro organismo di vivere. Si può quindi calcolare che ogni 3 settimane l'epidermide si rigenera. Anche la cornea ha una intensa capacità rigenerativa, praticamente ogni due settimane si forma nuova cornea. Posizione intermedia hanno i tessuti stabili (o potenzialmente rinnovabili) come il fegato le cui cellule esprimono una capacità rigenerativa solo in seguito a lesione. Al polo opposto si trova il cervello, tessuto perenne per eccellenza il quale, a fronte degli ipotetici 100 MLD di neuroni presenti nell'adulto, perde circa  $85 \times 10^3$  neuroni sottocorticali al giorno che non vengono più sostituiti. Tuttavia, scoperte degli ultimi 50 anni dimostrano che anche il cervello adulto possiede una quota, seppur limitata, di cellule staminali in grado di generare neuroni che popolano due zone specifiche dell'organo.

Queste evidenze indicano che cellule con caratteristiche di staminali esistono in vivo nell'adulto e in molti casi assolvono a funzioni rigenerative importanti. Tuttavia è bene ricordare che i protocolli per il loro isolamento da tessuto restano ancora primitivi - eccetto per sangue e pelle per le quali, soprattutto per quest'ultima, notevoli passi sono stati fatti in merito alla loro espandibilità. Questo significa che la possibilità di sfruttare la differente capacità rigenerativa delle staminali endogene portandole in laboratorio al fine di produrne in grande quantità, migliorandone le caratteristiche senza che perdano quelle fisiologiche desiderate (come la capacità differenziativa) rappresenta ancora terreno esplorato finora con scarsi risultati, con alcune rare eccezioni.

Un esempio emblematico è rappresentato dalle cellule staminali ematopoietiche (*Hematopoietic Stem Cell* o HSC), probabilmente le cellule staminali adulte meglio conosciute. Le HSC possono essere isolate in modo prospettico (con anticorpi specifici), quindi arricchite e utilizzate sia in trapianti di tipo autologo che allogenico per il trattamento di pazienti con immunodeficienze ereditarie, malattie autoimmuni o altre malattie a carico del sistema ematopoietico per

ricostituire le diverse tipologie di cellule ematiche e le difese del sistema immunitario. Tuttavia queste cellule non possono essere espanse in vitro e numerosi gruppi stanno lavorando in questa direzione.

Per le staminali adulte della pelle e della cornea esistono invece ormai solidi protocolli che ne permettono l'espansione. Studi di base hanno dimostrato che le cellule staminali dell'epidermide (lo strato protettivo esterno della nostra pelle, che non ha vasi sanguigni) possono essere isolate ed espanse in modo illimitato fino a generare un numero di cellule tali da coprire l'intero corpo umano (10,11). La capacità di tali cellule di produrre olocloni (cloni della cellula madre) le qualifica come staminali. Anche l'epitelio della cornea dell'occhio adulto contiene cellule con caratteristiche di staminalità. Queste sono state identificate al confine tra la cornea (parte trasparente) e la congiuntiva dell'occhio. Si tratta delle cellule del *limbus*. Queste rigenerano continuamente l'epitelio corneale, mantenendone la caratteristica trasparenza, essenziale per una corretta visione. Anche queste cellule, cresciute come olocloni, sono state trapiantate con successo (12, vedasi poi).

Il muscolo scheletrico contiene un tipo di cellule, dette cellule satelliti, che svolgono il ruolo di precursori miogenici e possiedono caratteristiche staminali. Le cellule satelliti sono ritenute una fonte stabile e autorinnovante di cellule muscolari adulte e svolgono il loro ruolo funzionale durante la crescita e/o la riparazione tissutale. Tuttavia le cellule satelliti sembrano essere meno potenti rispetto ad altre staminali nel rigenerare il muscolo dopo trapianto (13, vedasi poi). La presenza di staminali a livello del muscolo cardiaco rappresenta invece un fatto ancora molto dibattuto. Sebbene alcuni gruppi abbiano evidenziato una certa capacità rigenerativa fisiologica del cuore adulto, altri gruppi hanno fallito nel replicare queste scoperte, lasciando ancora una notevole incertezza sul campo (14).

Le cellule staminali sono state localizzate anche in due aree del cervello adulto, l'ippocampo e la zona sottoventricolare (15). La scoperta della presenza di queste cellule nel cervello risale al 1962, quando alcuni ricercatori iniettando timidina triziata in un topo adulto osservarono che essa veniva incorporata e permaneva in cellule che potevano essere assimilate a neuroni. Questa scoperta e alcune successive che ne validarono la rilevanza, rimasero tuttavia senza reale impatto fino al 1990 quando un gruppo canadese descrisse che era possibile isolare dal cervello adulto cellule con caratteristiche di staminalità (16). Oggi sappiamo che queste cellule popolano l'ippocampo e sono in grado di generare nuovi neuroni nell'arco di 4 settimane. Studi condotti nell'animale hanno dimostrato che questa intensa capacità neurogenica dell'ippocampo adulto rende conto dei fenomeni di memoria e apprendimento (15). E' stato infatti possibile documentare che l'esposizione dell'animale ad un ambiente arricchito era in grado di aumentare la neurogenesi e migliorare le capacità di apprendimento dell'animale. Ma anche l'attività fisica ha una funzione neurogenica a livello dell'ippocampo. Viceversa, la funzione delle staminali che risiedono nella zona sottoventricolare dell'adulto è dibattuta (17). Queste cellule sono presenti in catene composte da 4 tipologie cellulari diverse all'interno delle quali i neuroblasti migrano anteriormente nella stria migratoria rostrale facendo convergere le cellule a livello dell'epitelio olfattorio dove queste differenziano in neuroni olfattori (18). A lungo dibattito è stata anche l'identificazione di quella che si presume sia la staminale, tra le 4

tipologie cellule che compongono le catene. Oggi sembra assodato che la staminale di quel distretto sia una cellula con caratteristiche gliali che riveste le catene e che genera una cellula transiente in grado di amplificarsi per poi produrre il neuroblasto che migra. La quarta tipologia cellulare delle catene, la cellula endoteliale, sembra partecipare a questi eventi e alcuni studi la indicano come una staminale "di riserva" (17).

Nonostante esistano staminali neurali nel cervello fetale e adulto, occorre precisare che le strategie adottate fino ad ora per isolarle ed espanderle sono sempre state molto grossolane e retrospettive e basate sulla coltivazione in presenza di mitogeni in grado di indurre la divisione di molte tipologie cellulari. Così, per anni, alla voce "staminali neurali umane cresciute in laboratorio", corrispondevano colture (note con il nome di neurosfere e ottenute da tessuto cerebrale fetale abortivo) altamente eterogenee per quanto riguarda la composizione cellulare. Infatti, a fronte di rare staminali non identificabili presenti nella neurosfera il resto era composto da cellule a diversi stadi di sviluppo e/o parzialmente differenziate. In aggiunta le neurosfere si presentano perlopiù instabili nel tempo, rendendo necessario il continuo ricorso al tessuto fetale. Per ovviare all'eterogeneità diversi gruppi stanno lavorando al tentativo di identificare molecole di membrana espresse solo dalle staminali che permettano la selezione delle cellule desiderate mediante sorting via Fluorescence activated cell sorter. Anche a prescindere dalla necessità dello sviluppo di strategie innovative per l'isolamento prospettico e la propagazione omogenea e stabile delle staminali neurali è importante osservare che colture di neurosfere sono comunque state impiegate con successo nel topo e nella scimmia modello di sclerosi multipla. In questo caso l'efficacia è dovuta a un effetto di rilascio di sostanze antiinfiammatorie protettive piuttosto che dal differenziamento ad oligodendrociti delle cellule donatrici che restano immature in vivo.

Anche il sangue da cordone ombelicale contiene una quantità rilevante (0,3-0,5% del totale) di cellule staminali ematopoietiche simili a quelle del midollo osseo, utili come fonte di cellule staminali per individui immunologicamente compatibili (19). Dal 1988 queste cellule staminali da cordone ombelicale sono impiegate per curare il morbo di Gunther, la sindrome di Hurler, la leucemia linfocitica acuta e molte altre patologie che interessano in particolare i bambini. Sul sangue del cordone viene eseguita la caratterizzazione HLA per determinare se il ricevente sia compatibile o meno con il tessuto ricevuto. I risultati della tipizzazione HLA vengono pubblicati in *database* mondiali accessibili da centri trapianto autorizzati per poter avviare una ricerca di tessuto compatibile con il proprio paziente. I vantaggi relativi all'uso di queste cellule includono una procedura di raccolta non invasiva, un numero virtualmente illimitato di potenziali donatori, e una scarsa incidenza del Graft versus Host Disease nel ricevente. D'altro canto esistono alcuni svantaggi relativi alla limitata quantità di staminali da singolo donatore e soprattutto il diminuito effetto allorreattivo antitumorale cioè del Graft verso la leucemia che si vorrebbe aggredire. Dal punto di vista biologico la staminale del cordone sembra essere più immatura e dotata di maggior potenziale proliferativo rispetto all'adulto. Solitamente, queste cellule vengono donate alle banche pubbliche mondiali per scopi di trapianto. Recentemente il bancaggio "privato" del cordone a scopo autologo (n.d.r. per lo stesso bambino) ha suscitato notevole interesse con l'idea che le cellule staminali del cordone possano eventualmente essere utili in caso di malattia. Tuttavia, le evidenze a dimostrazione di ciò non sembrano sufficienti per prospettare un reale uso di tali

cellule oggi. Il rischio che il futuro bambino possa sviluppare una malattia per la quale le cellule del suo cordone potranno essere terapeuticamente utili è dello 0,063% e, anche in tale caso, cellule derivate da donatori sono 5000 volte più efficaci. Infatti, nel caso di malattie ematologiche genetiche, il trapianto autologo non è appropriato mentre in tutti gli altri casi di leucemie il tessuto donatore presenta una maggiore aggressività verso il tumore. Queste evidenze giustificano la necessità di una campagna informativa istituzionale e aggiornata anche circa eventuali cambiamenti dello stato della ricerca (20). Ciononostante, chi scrive pensa che una legge che vieta il bancaggio ad uso privato (come esiste in Italia), sostenuto cioè con le finanze dei singoli individui, sia concettualmente inappropriato e praticamente inefficace.

Recenti ricerche avevano suggerito l'esistenza di cellule staminali nel liquido amniotico (21). Alcune banche private nel mondo propongono la conservazione a pagamento di queste cellule ossia per le esigenze del nascituro: la pratica, tuttavia, è generalmente limitata alle donne gravide che devono già sottoporsi ad amniocentesi, dato il concreto e documentato rischio di aborto. Numerosissimi studi sono in corso per esplorarne le possibilità di impiego. Alcuni studi pubblicati nel 2007 proponevano le staminali amniotiche come cellule pluripotenti. Questa proposta non trova tuttavia conferma nei dati sperimentali.

In conclusione, nonostante le cellule staminali popolino i nostri tessuti, il loro isolamento e la loro propagazione *in vitro*, senza che venga meno la loro straordinaria e fisiologica multipotenza, necessita lo sviluppo di nuove tecnologie volte a riprodurre *in vitro* la nicchia tissutale nella quale normalmente svolgono la funzione rigeneratrice.

### **Le cellule iPS**

Nel 2006 Shinya Yamanaka dimostra che una cellula specializzata del corpo del mammifero può essere riprogrammata, a ritroso nel tempo, fino allo stadio embrionale, generando una nuova cellula staminale: la cellula iPS. Si tratta di una scoperta dapprima messa a punto sulle cellule di topo e, l'anno successivo, validata nell'uomo, sempre da Yamanaka in parallelo al laboratorio guidato da James Thomson, colui che, nel 1998, isolò per la prima volta le cellule staminali embrionali umane da blastocisti sovranumerarie (22).

Le cellule iPS possono anche essere definite “cellule staminali embrionali surrogate” in quanto simili (ma non identiche, 23) alle embrionali “vere”, soprattutto nel riprodurre la formidabile pluripotenza (la capacità cioè di differenziare dando origine alle 250 tipologie di cellule specializzate dei nostri tessuti), pur essendo generate da un individuo adulto che fisiologicamente non contiene elementi cellulari pluripotenti. Da ogni cellula della nostra pelle (o da altri tessuti specializzati, come ad esempio il sangue) sarebbe dunque possibile ottenere cellule iPS dalle quali poi generare neuroni, cardiomiociti, cellule muscolari o epatiche da usare come “pezzi di ricambio”. In teoria, infatti, e qualora l'indagine su queste cellule non riveli lati inattesi, risolto il rischio di teratomi intrinseco alla pluripotenza e verificata la validità scientifica del trapianto di cellule derivate da elementi pluripotenti in tessuti malati, si potrebbe pensare che ciascun individuo si porti in corpo gli elementi cellulari per procedure di trapianto autologo. In un ipotetico approccio di questo genere le cellule

dell'individuo (ad esempio della pelle) verrebbero dapprima riprogrammate (a iPS) e poi differenziate nella tipologia cellulare di interesse (per esempio neuroni) quindi trapiantati nello stesso individuo con malattia degenerativa.

Nel 2007, i gruppi di Yamanaka e Thomson hanno espresso in modo forzato in cellule di fibroblasto umano in coltura alcuni fattori di trascrizione tipici dello stato di pluripotenza, cioè proteine notoriamente espresse in cellule staminali embrionali umane "vere" e senza le quali perderebbero la loro staminalità (Figura 7). Due tra i fattori utilizzati, Oct4 e SOX2, sono fattori di trascrizione coinvolti nel mantenimento dello stato di pluripotenza delle ES umane; gli altri due, c-Myc e KLF4, sono oncogeni. Ebbene, circa 20 giorni dopo la loro espressione forzata (solitamente ottenuta mediante virus) le cellule assumono una morfologia più allungata per poi dare origine, dopo altri 15-20 giorni, ad una "colonia" tipica della crescita *in vitro* delle cellule staminali embrionali "vere". Osservando questa colonia, che con il tempo cresce e si espande mantenendo il suo aspetto circolare, è possibile vedere che essa è composta da cellule tonde e con un nucleo che occupa quasi tutto il volume cellulare. Questa morfologia cellulare tondeggiante e con un elevato rapporto nucleo/citoplasma, distingue le embrionali da qualsiasi altra cellula non embrionale. Le colonie possono poi essere "passate", cioè frammentate o dissociate di modo che le singole cellule formino altre colonie, garantendo l'espansione in teoria senza alcuna variazione delle loro caratteristiche di pluripotenza. Possiamo inoltre verificare che tale stato sia stato raggiunto, durante la riprogrammazione, e venga mantenuto con i passaggi delle colture riprogrammate ad esempio verificando l'espressione del gene Nanog. Una volta confermata l'effettiva conversione dei fibroblasti a cellule iPS occorre comunque accertare che le nuove cellule iPS siano davvero pluripotenti e quindi in grado di differenziare, per esempio, a neuroni, cardiomiociti, cellule muscolari etc (23). E' anche bene sottolineare che ciò può avvenire in quanto i 4 fattori di riprogrammazione funzionerebbero in modo transiente per poi essere silenziati, consentendo così il successivo differenziamento delle cellule iPS. Dalle cellule iPS (come del resto dalle ES) si potrebbero ottenere anche cellule germinali, oociti e spermatozoi.

Dopo i primi risultati, i vari laboratori nel mondo hanno lavorato per perfezionare e espandere la tecnica di riprogrammazione. Un problema era rappresentato dai vettori virali utilizzati per esprimere in cellule il cocktail di riprogrammazione. Proprio la tendenza di questi vettori, soprattutto dei retrovirus, ad integrarsi in più punti del genoma aveva infatti portato ad una aumentata incidenza di tumori in topi. Sebbene l'efficienza sia notevolmente ridotta oggi sembra possibile riprogrammare anche senza c-myc. Ulteriori metodi sono stati sviluppati per esprimere i fattori di riprogrammazione. Questi includono adenovirus, sendai virus, vettori plasmidi, trasposoni rimuovibili. Altre strategie tendono ad evitare completamente l'uso di virus. In questa categoria rientrano i tentativi di riprogrammazione utilizzando RNA o proteine prodotte *ex vivo* e veicolate ai fibroblasti (24). Si tratterebbe di metodi certamente più sicuri ma che richiedono una lunga procedura, a cui si aggiunge un'efficienza di riprogrammazione ancora troppo bassa (inferiore allo 0,001%). Con queste varie strategie, sono ormai state riprogrammate diverse tipologie cellulari, quali fibroblasti, cheratinociti, cellule staminali del sangue, epatociti, cellule dell'epitelio gastrico, cellule staminali neurali, cellule Beta pancreatiche, cellule del fegato e persino linfociti B.

Questo vasto repertorio di mezzi e strategie ha anche permesso di ampliare gli obiettivi della ricerca (25, 26). Essa infatti oggi comprende il miglioramento delle conoscenze dei meccanismi che sottendono la riprogrammazione cellulare al fine di un impiego delle cellule iPS in strategie di trapianto, ma anche la possibilità di utilizzare queste nuove staminali per studiare *in vitro* le malattie umane in modo paziente-specifico. Pensando alle malattie genetiche, come anche la Malattia di Huntington (malattia neurodegenerativa che colpisce alcuni neuroni del cervello), queste spesso si presentano con sintomi e caratteristiche sottilmente diverse tra i malati tali da fare ipotizzare che l'intorno genico (e non solo il gene mutato) possa influenzare l'esordio, la progressione e/o la manifestazione sintomatica della malattia. Con la riprogrammazione è possibile ottenere cellule iPS da ogni singolo paziente le quali recheranno non solo il gene responsabile della malattia ma anche il resto del corredo genico per poi studiarne *in vitro* le caratteristiche molecolari e cellulari. Cellule iPS sono già state derivate da pazienti con Atrofia Muscolare Spinale, Sclerosi Amiotrofica Laterale, Morbo di Parkinson, Corea di Huntington, con malformazioni cardiache congenite ma anche con diabete giovanile e molte altre patologie (27-32). Una recente ricerca ha sfruttato proprio la tecnologia delle iPS per studiare i meccanismi patofisiologici di una malattia monogenica cardiaca, la sindrome del QT lungo (che causa spesso morte improvvisa). Sono state generate cellule iPS dai pazienti colpiti, che sono state poi differenziate *in vitro* verso cardiomiociti battenti, che hanno mostrato gli stessi difetti funzionali che si ritrovano nel cuore dei pazienti. L'orizzonte è quindi dischiuso alla sperimentazione di nuovi farmaci che possano correggere il difetto patogenetico.

Ma le cellule iPS sono proprio identiche alle ES? Sembra di no (33). Una serie di studi, alcuni pubblicati nel febbraio 2011 indicano che le cellule adulte di partenza mantengono una memoria epigenetica e quindi quando riprogrammate a iPS predispongono le cellule a un "bias" differenziativo. Non si è sicuri del significato di questo aspetto dal punto di vista della pluripotenza delle cellule. Per il momento si tratta di osservazioni che potrebbero essere biologicamente irrilevanti, oppure trattarsi di una caratteristica vantaggiosa o meno. Ma un altro aspetto emerso di recente è rappresentato dalle elevate anomalie cromosomali scoperte in queste cellule. Forse non si tratta proprio di una sorpresa in quanto è difficile immaginare che una cellula forzata a crescere in un piattino di coltura possa restare integra dal punto di vista genomico (34-36). A tale proposito, comunque, una serie di note di cautela sono state rese pubbliche (37, 38). Certo è che, come anche più volte riferito dagli stessi scopritori delle cellule iPS, queste caratteristiche potranno essere studiate e capite nelle differenze e nelle somiglianze e quindi per le loro potenzialità, solamente attraverso un continuo confronto diretto con le staminali embrionali umane "vere".

Infine una novità, degli ultimi mesi, è rappresentata dalla possibilità di istruire le cellule adulte a specializzarsi direttamente "senza passare dal via", senza passare cioè dalle iPS. E' stato infatti dimostrato che è possibile riprogrammare cellule della pelle umana, direttamente a neurone o a cellula cardiaca utilizzando cocktails di fattori di trascrizione tipici delle due cellule specializzate (39). Si tratta di una strategia che può avere vantaggi e svantaggi ma che, oggi, sicuramente indica come, pochi anni dopo la scoperta la embrionali umane e



ancora meno dalla rivoluzione delle cellule iPS, le vele della ricerca sulle cellule staminali siano ancora completamente spiegate.

### **Staminali di frontiera tra scienza, società e politica**

Torniamo alle cellule staminali embrionali umane e ad una scoperta rivoluzionaria. E' il 1998. Con mille parole pubblicate su Science, James Thomson e collaboratori descrivono un risultato che rivoluziona la scienza e espone la società a nuovi e importanti interrogativi. Non è la prima volta. Per chi scrive, questo è tra i compiti più importanti della scienza: offrire elementi per evolvere i propri pensieri, le condizioni di salute e anche le opportunità decisionali. L'interrogativo in questo caso è delicato: cosa è quella blastocisti (sovrannumeraria), dalla quale Thomson e collaboratori isolarono per la prima volta le cellule staminali embrionali umane? Si tratta di un procedimento che ancora oggi implica la disgregazione e la distruzione della blastocisti. Per chi considera quella blastocisti una persona tale e quale chi, in questo momento, legge, quell'atto equivale dunque ad un omicidio. Per coloro - come chi scrive - che nelle blastocisti sovrannumerarie non vedono degli individui, ma delle strutture più piccole di un millimetro formate da 200 cellule, presenti in un piattino di coltura, che degenererebbero se conservate congelate per lungo tempo ma dalle quali si possono ottenere importanti informazioni per capire e aumentare le speranze si tratta, diversamente, di un atto eticamente legittimo. Si tratta di un dibattito non chiuso, e di una possibilità di interrogarsi sugli obiettivi della ricerca e sul futuro delle blastocisti sovrannumerarie (anche di quelle conservate in Italia e destinate al congelamento distruttivo), oltre che sulle conseguenze morali del "fare". Ma anche del "non fare", un atto che non è eticamente neutro. Si tratta anche di pensieri e posizioni che saranno sempre importanti ogni volta che permetteranno di esprimere i rispettivi punti di vista in relazione a obiettivi e procedure concrete fornendo, ovunque si possa, le riflessioni morali, filosofiche e religiose, gli argomenti e gli elementi su cui ciascun cittadino possa poi costruire la propria opinione.

Anche dal punto di vista strettamente legislativo, il panorama mondiale è stato specchio di questa varietà di posizioni dei diversi stati e dei loro cittadini. Fu il presidente degli Stati Uniti George W. Bush il primo a dare disposizioni in materia. Con un discorso pronunciato il 9 agosto 2001, stabiliva che l'ente federale americano, l'NIH, avrebbe concesso il finanziamento pubblico solo alle ricerche sulle cellule ES umane ottenute (da blastocisti sovrannumerarie) prima dell'inizio di quello stesso suo discorso, alle ore 9:00. Le cellule prodotte dopo quell'ora e quel giorno non avrebbero potuto beneficiare del fondo federale pubblico. Ma le linee di ES disponibili erano poche e generate con metodi che si voleva migliorare. Del resto, il decreto di Bush non vietava lo svolgimento di ricerche sul suolo americano. Queste potevano quindi continuare con fondi privati (per esempio ottenuti dalle numerose fondazioni no profit o da altri enti non pubblici e cittadini) e i risultati messi a disposizione dell'intera comunità scientifica e del mondo intero. Così, negli anni del divieto di Bush, la ricerca americana sulle ES ha potuto procedere liberamente (e con successo) senza il cappio federale. Un cappio che comunque introduceva nel dibattito etico-sociale una serie di contraddizioni che ritroveremo in altre politiche nazionali, inclusa quella italiana. Risultava infatti difficile comprendere a quale principio morale si

ispirasse la posizione dell'amministrazione Bush che vietava con il pubblico ciò che consentiva (e da cui poi beneficiava) con il finanziamento privato.

Dopo alcuni anni il fronte americano cominciò a sfaldarsi. La California, con il suo governatore, andava al voto referendario per dissociarsi dalla politica di Bush in tema di ricerca sulle cellule ES, finendo con l'approvare nel 2004 la Proposition 71 che varava uno stanziamento ciclopico di 3 miliardi di dollari per la ricerca californiana sulle cellule staminali, incluso le embrionali. Iniziava così un conflitto con il governo federale che non impedì agli altri stati americani di seguire l'esempio della California. Nel frattempo, il Congresso americano approvava a maggioranza il cambio della rotta Bush ma, nel 2006, per la prima volta dalla sua presidenza, il presidente americano decise di esercitare il suo potere di veto rimandando al Congresso (quindi bocciando) una legge che ripristinava i finanziamenti federali alla ricerca sulle cellule ES umane.

E l'Europa? Nel 2002 si apriva il 6° programma quadro della Ricerca Europea che mirava ad aumentare la competitività della ricerca del continente. Creato con l'idea di rafforzare la coalizione tra ricercatori europei, il programma prevedeva la partecipazione in uno stesso network (consorzio) anche di 20-25 gruppi di ricerca da nazioni europee diverse. E a seguito del parere favorevole del Parlamento Europeo, negli stessi anni, la Commissione Europea si trovava a dovere decidere come regolare la possibilità del finanziamento alle ricerche sulle cellule ES. Seguì quindi un anno di moratoria - chiesta da alcuni dei ministri degli allora 15 paesi europei - al fine di stabilire se queste ricerche potevano essere contemplate e quindi competere per il finanziamento e con quali procedure. Un compito arduo sul tavolo dei ministri in Europa, visto che ai fondi della Commissione Europea per la ricerca contribuivano paesi come l'Inghilterra, notoriamente su posizioni liberali e che chiedeva, avendone avuto il mandato dai propri cittadini e dal proprio governo, il pieno utilizzo di quelle risorse. Di posizione opposta paesi come l'Italia, l'Austria e la Germania. Si trattò di un primo importante confronto che, partendo dalle tre pagine su Science del 1998, metteva sul terreno europeo uno scontro difficile e probabilmente complesso da affrontare per lo stesso concetto di "Unione Europea". Anche perché in uno stesso network potevano coesistere ricercatori inglesi (con una legge nazionale permissiva) con ricercatori tedeschi (allora con una legge più simile a quella americana che impediva l'uso di staminali prodotte dopo il 2002) o spagnoli (ma anche israeliani) per i quali la ricerca sulle ES non solo è scientificamente necessaria e lecita ma anche moralmente importante. L'anno di moratoria chiesto dai ministri che si opponevano terminò però con un nulla di fatto. Il 5 dicembre 2003, al termine dell'anno di moratoria, sotto la presidenza italiana, l'allora Ministro L. Moratti comunicava il nulla di fatto. Una beffa per quei ricercatori che per un anno avevano atteso che i ministri in carica si consultassero e elaborassero strategie per regolare questo ambito del sapere e del fare. Forse, si potrebbe dire poi, una fortuna, visto che nel gennaio 2004, a seguito del mandato già da tempo ricevuto dal parlamento europeo, la Commissione Europea fu forzata ad aprire alla ricerca sulle ES umane. Lo fece con una serie di cautele e regolamentazioni tutt'ora vigenti che mirano a dare a tutti strumenti per decidere. Oltre alla ovvia rigorosa valutazione scientifica, i progetti che includono cellule ES prevedono infatti la necessità di una valutazione etica indipendente, ma anche di un parere etico nazionale, oltre all'ovvio riconoscimento e adeguamento alla legge nazionale. La quinta regola prevede anche che tali progetti vengano infine "votati" dalle delegazioni nazionali, uno ad uno. I progetti europei di ricerca sulle cellule ES

umane sono numericamente molto pochi a fronte di decine di progetti finanziati sulle staminali adulte.

Guardando all'Italia, dopo pareri opposti dei Comitati Nazionali di Bioetica che si sono succeduti, la legge 40/2004 introdusse il divieto, sanzionandolo penalmente, alla derivazione di nuove linee ES da blastocisti umane sovranumerarie (comunque destinate alla distruzione). E' però possibile importare linee già derivate (anche generate domani) da ricercatori che le abbiano prodotte per le loro ricerche. Solitamente questi reagenti vengono scambiati nell'ambito di progetti europei collaborativi. Non si tratta di un aggirio della legge ma del seguire banalmente le indicazioni espresse dalla legge 40. Sebbene (parzialmente) permissiva, il cappio a questa ricerca in Italia viene tuttavia dal finanziamento. Nel luglio 2009 il Ministero della Salute emanava un bando per la ricerca sulle cellule staminali dal quale venivano escluse le ricerche sulle cellule ES. Tre ricercatori, tra i quali la scrivente, hanno presentato ricorso contro il Ministero.

Nel frattempo, il nuovo Presidente degli USA, con il suo primo discorso alla nazione il 9 marzo 2009 azzerava il provvedimento messo in atto da Bush che proibiva lo stanziamento di fondi federali alla ricerca sulle cellule staminali embrionali. Presto si creò un contenzioso. Due ricercatori si appellano contro l'amministrazione Obama sostenendo che l'apertura andava contro il decreto Dichey-Warren del 1996. Il loro primo ricorso non viene accettato non essendo stato evidenziato il danno ricevuto. Il secondo ricorso viene invece improntato sulla discriminazione che le ricerche (sulle staminali adulte) dei due ricercatori subiscono nel momento in cui ai fondi possono competere anche ricerche sulle ES. Il 23 agosto 2010 un tribunale distrettuale Usa accoglie questa curiosa istanza e ammette il divieto dell'utilizzo dei fondi pubblici per la ricerca se gli embrioni sono distrutti, confondendo cellule (non citate dal decreto Dichey-Warren) e embrioni. Il finanziamento federale alla ricerca sulle cellule staminali provenienti da embrioni umani viene istantaneamente bloccato e i ricercatori, con applicazione immediata, sono costretti ad interrompere il lavoro e congelare tutti gli sforzi progettuali in atto. L'amministrazione Obama si appella contro la decisione del giudice e ne sospende il giudizio permettendo il riavviarsi delle ricerche già finanziate. Lo scorso maggio la corte americana dà ragione al governo ma la non unanimità del giudizio rende possibile un ulteriore ricorso da parte dei due ricercatori (40, 41).

Tornando in Europa, la Germania è in procinto di passare una legge che estende i limiti temporali a linee prodotte entro il 2007. La Svizzera ha autorizzato l'uso di blastocisti sovranumerarie per un periodo di tempo. La Francia sta discutendo un allargamento. La Spagna permette la derivazione di linee, così il Belgio e lo stato di Israele.

### **Medicina Rigenerativa**

Il termine "medicina rigenerativa" identifica quella branca della medicina il cui obiettivo è portare al recupero permanente dei tessuti e degli organi danneggiati sfruttando le potenzialità rigenerative delle cellule staminali. Gli avanzamenti della medicina rigenerativa sono quindi strettamente correlati ai progressi delle conoscenze sulla biologia delle cellule staminali in quanto le cellule staminali ed i loro derivati specializzati, naturali o ingegnerizzati, forniscono le componenti funzionali di un regime terapeutico rigenerativo.

Due sono le strategie di intervento della medicina rigenerativa. Il primo prevede l'approccio *in vivo* che si basa sulla stimolazione farmacologica delle cellule staminali residenti nei tessuti endogeni di interesse al fine di stimolarne il potenziale riparativo. Il secondo approccio, *ex vivo*, mira al trapianto di cellule staminali, o progenitrici, espanse e/o modificate geneticamente *in vitro* che vadano a colonizzare il distretto di interesse e ne sostengano l'aspetto rigenerativo-riparativo. In questa sezione ci focalizzeremo principalmente sugli aspetti di terapia cellulare in medicina rigenerativa, tralasciando le strategie *in vivo* in quanto ancora difficili da immaginare a scopo terapeutico per la maggior parte delle malattie. Le applicazioni di terapia cellulare basate sul trapianto allogenico di midollo osseo o di cellule ematopoietiche per la cura di diverse malattie del sangue, sono già state ampiamente trattate dalla rivista e quindi non verranno incluse. In questa sezione sono riassunte alcune sperimentazioni innovative e un caso di successo, la cura delle lesioni alla cornea, basate su cellule staminali.

*Approcci di medicina rigenerativa per il trattamento delle lesioni degli epitelii di rivestimento.* Uno degli ambiti con sicure applicazioni cliniche oggi è quello della riparazione degli epitelii squamosi. Questi includono l'epidermide e la cornea. In questi casi, già da diversi anni è possibile effettuare dei trapianti di pelle autologa. Il nuovo tessuto cutaneo viene generato *in vitro* su matrici di collagene e matrigel, a partire da progenitori e staminali cutanee derivanti da piccole biopsie della cute del paziente. Pioniere di questo filone di ricerca è stato Howard Green. Fu proprio Green, a Boston nel 1983, a eseguire il primo trapianto di pelle coltivata su tre bambini ustionati gravi (10). Da allora centinaia di pazienti hanno beneficiato di questo trattamento salvavita che viene applicato ai pazienti con ustioni di terzo grado. Tuttavia la letteratura è priva di informazioni circa i meccanismi alla base dell'integrazione del nuovo tessuto. Ancora oggi, quindi, predire l'efficacia di un trapianto è impossibile e le linee guida per il trapianto non si sono evolute in modo significativo negli ultimi 25 anni.

Ciononostante nel 1987 uno studio di Yann Barrandon ha proposto una metodologia efficiente per la crescita di cellule staminali della pelle *in vitro* e la produzione di cheratinociti a partire da esse, anche se i costi elevati e la necessità di diversi mesi per ricostruire lembi di pelle estesi, di fatto ne limitano la piena diffusione in clinica. In aggiunta, sebbene questo oggi rappresenti uno straordinario trattamento salvavita, i malati trapiantati chiedono una vita migliore. La pelle così rigenerata, infatti, non è ottimale in quanto priva di ghiandole sudoripare e di bulbi piliferi. La pelle inoltre è secca, provocando anomalie nella termoregolazione e nella fisiologia di questo importante tessuto. Ecco quindi che è necessario capire la normale fisiologia di sviluppo e rigenerazione della pelle e capire la biologia delle staminali della pelle. Oggi sappiamo che le staminali cheratinocitiche sono localizzate in diverse zone dell'epidermide. Queste cellule si propagano generando olocloni che possono sostenere anche 200 divisioni e che quando trapiantati riescono a rigenerare pelle o cornea. Altre staminali sono presenti nel bulbo pilifero e nelle ghiandole sudoripare. Quelle del bulbo pilifero sembra partecipino attivamente anche alla riparazione dell'epidermide in seguito a danno.

Un altro epitelio che è possibile rigenerare completamente *in vitro* è l'epitelio corneale (12). In caso di lesioni alla cornea, l'epitelio congiuntivale, che costituisce la parte visibile bianca dell'occhio, prende il sopravvento portando alla

formazione di quello che in termini clinici si chiama "pannus" e che copre tutto il bulbo, causando cecità. In molti casi, è possibile ricostruire la cornea partendo da staminali presenti a livello del limbus dell'occhio, una striscia di cellule, di cui circa il 10% con caratteristiche staminali, che circonda la cornea. Sebbene il prelievo non possa essere mirato al prelievo delle sole staminali limbari, è presumibile che il sistema di espansione in vitro selezioni per le staminali corrette le quali, una volta messe in coltura, sono in grado di ricostruire in circa 3-4 settimane un lembo di epitelio corneale che viene impiantato al posto di quello compromesso. Tra i pionieri di questa tecnologia vi sono Graziella Pellegrini e Michele De Luca ora all'Università di Modena che nel 1997 pubblicarono il primo studio sulla coltivazione della cornea a partire da staminali. Più di recente, questi ricercatori, insieme a Paolo Rama, del San Raffaele di Milano hanno perfezionato la tecnica arrivando a confermare il recupero totale della vista anche 6 anni dopo il trapianto (42, 43).

*Approcci di medicina rigenerativa per il trattamento delle disfunzioni cardiache.* Il cuore è uno degli organi che si pensava dispensato da processi rigenerativi. In realtà, alcuni studi hanno suggerito che nel miocardio umano potrebbero risiedere dei progenitori, evidenziabili grazie all'espressione di marcatori quali ad esempio c-kit o sca-1, i quali potrebbero rigenerare, in condizioni normali, l'intero gruppo di cardiomiociti di un cuore adulto in circa 4-5 anni. Tuttavia questi risultati sono molto dibattuti, sia per quel che riguarda l'effettiva capacità rigenerativa per la presenza concreta di progenitori nel cuore adulto (44-46). Nonostante ciò, l'utilizzo delle cellule staminali per riparare il tessuto cardiaco rappresenta uno degli ambiti applicativi che ha attratto i maggiori interessi anche se non è ancora chiaro come ottenere cellule del miocardio che siano il più possibile simili a quelle della sede cardiaca lesionata.

Le cellule cardiomiocitiche differiscono infatti tra loro a seconda della zona del cuore da esse popolata e della specifica funzione. Per esempio, le cellule cardiache che conducono lo stimolo elettrico e sono responsabili del battito cardiaco sono diverse da quelle che si contraggono. Ad oggi, l'unico tipo di cellule da cui si possono ottenere i cardiomiociti sono le cellule staminali embrionali (e le loro omologhe surrogate, le iPS). Altre tipologie, quali le staminali adulte, non sono in grado di formare cardiomiociti ma, se trapiantate, si pensa possano aiutare la ripresa della funzionalità cardiaca con un'azione comunque molto limitata nel tempo e attraverso meccanismi ancora incompresi e comunque diversi dall'ipotesi originale della riparazione sostitutiva.

Fu uno studio del 1992, firmato dal gruppo di Piero Anversa a stimolare l'interesse verso il trapianto di staminali come terapia per l'infarto al cuore. Quello studio proponeva infatti che le cellule del midollo osseo erano in grado trasformarsi in cellule cardiache. Subito iniziarono le prime sperimentazioni sull'uomo. Tuttavia, studi successivi smentirono il dato originale. Oggi, e in assenza di solide evidenze precliniche, molti ospedali offrono trapianti di staminali (di diverso tipo) post-infarto. Guardando ai più recenti risultati di sperimentazioni controllate sembra che l'effetto, se presente, sia modesto, specialmente a lungo termine. Si presume inoltre che le staminali trapiantate possano limitare il danno ischemico successivo all'infarto miocardico o stimolare l'angiogenesi e quindi aumentare l'afflusso di sangue al muscolo cardiaco (14). Tutto ciò non sminuisce il concetto e l'importanza di investire su strategie che stimolino la rigenerazione intrinseca o estrinseca del cuore. Al contrario, può

essere molto importante costruire scientificamente su quei risultati di migliorata performance all'esercizio fisico dopo trapianto, evidente fino a 4-6 mesi, soprattutto per i pazienti con una maggior area infartuata. Alcuni benefici sono stati descritti anche dopo trapianto di un piccolo gruppo di pazienti affetti da angina pectoris.

In questo panorama, le ES umane (o le iPS) offrirebbero una marcata capacità di trasformarsi nel tipo cellulare corretto. Tuttavia, una volta differenziate in vivo, potrebbero contrarsi spontaneamente, producendo aritmie. A queste problematiche si aggiunge la necessità di eliminare ogni rischio che una quota di cellule donatrici rimaste indifferenziate produca teratomi. Infine, non essendo autologhe, queste cellule verrebbero eliminate, rendendo necessaria una terapia immunosoppressiva. Le cellule iPS potrebbero risolvere quest'ultimo aspetto. Tuttavia è bene ricordare che l'impiego delle iPS prevede modalità di terapia cellulare personalizzata, la quale, anche laddove si riveli efficace, resterebbe probabilmente per lungo tempo inaccessibile ai più.

Il successo delle ES (o delle iPS) a livello preclinico sembra comunque passare da protocolli che permettano l'isolamento prospettico delle tipologie di progenitori cardiaci desiderati e in grado di crescere e differenziare in modo omogeneo. Il primo trapianto di cardiomiociti ottenuti da ES fu effettuato nel cuore del maiale. In questo studio si dimostrò che le cellule donatrici potevano funzionare da pacemakers biologici e quindi da veri cardiomiociti in grado di "battere" dopo trapianto. Tuttavia evidenziò anche il potenziale rischio di aritmie locali. I successivi studi, estesi al tentativo di riparare l'intero miocardio infartuato, dimostrarono la capacità di sopravvivenza delle cellule donatrici ma anche la formazione di sincizi tra le cellule umane donatrici che non si connettevano con quelle dell'ospite roditore.

In conclusione, diverse tipologie cellulari sono in studio per la terapia del cuore infartuato (47). Uno dei primi obiettivi sarà garantire la sopravvivenza delle cellule donatrici al fine di ottenere un effetto rilevante e a lungo termine. L'efficacia potrebbe derivare dall'inserimento delle nuove cellule nel circuito cardiaco ma anche dalla formazione di nuovi vasi e da effetti paracrini. Sarà necessario studiare il meccanismo al fine di migliorarne l'eventuale beneficio. Potrebbe inoltre essere interessante concepire strategie combinate con le staminali disposte in matrici cellulari al fine di "preallineare" i cardiomiociti in modo da garantire una corretta contrazione dopo il trapianto. L'effetto della terapia cellulare potrebbe anche essere prolungato attraverso l'impiego di cocktails composti da fattori di sopravvivenza oppure effettuando il trapianto dopo la fase postinfiammatoria iniziale. Tutti questi studi e l'interpretazione dei risultati dipendono comunque dalla risposta ad una semplice domanda: i roditori sono modelli utili per le patologie del cuore? Il cuore del roditore batte 400-600 volte al minuto mentre quello dell'uomo presenta 60-100 battiti. E' quindi probabile che cellule umane trapiantate degenerino o muoiano per tachicardia locale, anche qualora riescano a creare sincizi con le cellule endogene. Del resto, è importante che sperimentazioni cliniche controllate possano procedere sulla base delle evidenze sperimentali che si renderanno disponibili.

*Approcci di medicina rigenerativa nel diabete.* L'interesse sulle staminali si estende al diabete e l'idea di sostituire le cellule producenti insulina per trattare il diabete di tipo 2 è addirittura del 1894. Tuttavia il primo trapianto efficace di

cellule delle isole pancreatiche nel ratto è del 1972. Ma furono Shapiro e collaboratori nel 2000 a pubblicare il primo dato di successo sull'uomo usando isole da tre donatori. I risultati, buoni inizialmente, tornavano però allo stato di insulina dipendenza dopo 5 anni, anche se si stima che l'80% dei pazienti conservava una funzione residua del trapianto. Ancora più rimarchevoli sono gli esempi di pazienti in cui la sopravvivenza e funzione permaneva a lungo termine (> 10 anni), dimostrata con la capacità di mantenere una normale glicemia. Nonostante le ragioni di questa efficacia sia ignota, questi esempi dimostrano che è possibile ottenere indipendenza dell'insulina a lungo termine attraverso il trapianto allogenico di isole di Langherans. Tuttavia, il maggior problema di questa strategia risiede nella scarsa disponibilità del tessuto donatore essendo derivato da cadaveri.

In ambito di staminali in grado di produrre cellule beta pancreatiche insulina producenti, esistono alcune possibilità ma nessuna completata ad oggi (48). Alcuni studi iniziali dimostrarono la capacità di cellule staminali adulte di generare cellule beta. Tuttavia queste dimostrazioni non includevano prove di funzionalità convincenti così come non discutevano l'espandibilità delle cellule, requisito necessario al fine di una applicazione clinica. Ma la speranza risiede nella possibilità di ricapitolare in vitro lo sviluppo normale delle cellule beta a partire dall'endoderma, utilizzando le ES. Alcuni studi recenti mostrano che è possibile ottenere endoderma a partire da ES. Questo viene poi convertito in progenitori pancreatici e cellule simili alle beta pancreatiche che si dimostrano responsive ai livelli di glucosio dopo trapianto (48). Altre strategie, per ora sperimentali, dimostrano che è possibile convertire cellule esocrine acinari in cellule endocrine beta pancreatiche attraverso l'espressione forzata di tre fattori di trascrizione. E con un solo fattore di trascrizione sembra possibile trasformare in vitro cellule alfa che producono glucagone in cellule beta insulina secernenti.

*Approcci di medicina rigenerativa per il trattamento del muscolo scheletrico.* Il muscolo scheletrico è il tessuto preponderante del corpo umano e contiene una popolazione di progenitori muscolari, le cosiddette "cellule satellite" che sono in grado di provvedere al riparo fisiologico di questo tessuto mediante l'aggiunta di nuove fibre muscolari. Per il trattamento delle patologie degenerative del muscolo sono state analizzate diverse cellule staminali con attività miogenica. Tra queste vanno annoverate le cellule satellite, ma anche le cellule CD133+ estratte dal muscolo scheletrico o dal midollo osseo, oltre ai progenitori endoteliali e ai "mesangioblasti". Tutte queste popolazioni mostrano capacità miogenica *in vitro*; tuttavia una vera e consistente capacità miogenica *in vivo* in seguito a trapianto è stata evidenziata solo per le cellule satellite ed i mesangioblasti, anche se le prime sono caratterizzate da una limitata sopravvivenza. I mesangioblasti, isolati dal topo nel 2003 dal gruppo di Giulio Cossu, sono cellule capaci di differenziare in diversi tipi cellulari del mesoderma, incluso il muscolo scheletrico. Il loro trapianto, per via endovenosa, in topi distrofici produce un recupero funzionale dei muscoli iniettati e un miglioramento clinico nel cane. E' stata di recente avviata una sperimentazione clinica su un ristretto numero di pazienti distrofici.

*Approcci di medicina rigenerativa per il trattamento del sistema nervoso centrale (SNC).* Le malattie del SNC sono un'eterogenea famiglia di malattie con caratteristiche eziopatologiche e sintomatologiche ben distinte tra loro e prive di

cura. Gli approcci saranno quindi diversi e le staminali più o meno indicate a seconda della malattia. Detto questo, è importante sottolineare come negli ultimi vent'anni, l'approccio trapiantologico in clinica, mediante l'utilizzo di tessuto nervoso fetale umano, sia stato sperimentato per il Morbo di Parkinson e per la Corea di Huntington ottenendo risultati eterogenei in termini di sopravvivenza del materiale e di recupero funzionale per il paziente. Questo anche come conseguenza della limitata standardizzazione della procedura che, come nel caso del trapianto di isole nel diabete, poteva produrre risultati ottimi in alcuni limitati casi di pazienti ai quali fu addirittura sospesa la terapia farmacologica. Negli ultimi anni, grazie alla possibilità di isolare ed espandere *in vitro* cellule staminali neurali umane ottenute da cervello fetale o adulto o da cellule pluripotenti (ES ed iPS), le speranze di raggiungere risultati più soddisfacenti si sono moltiplicate. Probabilmente la malattia candidata al trapianto di staminali è il Parkinson. Questo per la selettività della lesione e per il numero relativamente limitato e circoscritto di neuroni dopaminergici da sostituire. Diverse staminali sono state proposte, a partire dalle mesenchimali o dalle cordonali, ma le evidenze disponibili in ambito preclinico sono limitate e il meccanismo ignoto (49, 50). Gli unici risultati consolidati e via via migliorati nel tempo nel modello animale sono stati ottenuti con i progenitori dopaminergici ottenuti da ES dalle quali è stato possibile ottenere neuroni dopaminergici funzionalmente attivi. Alcune applicazioni tuttavia sono già in sperimentazione sull'uomo. Tra queste, alcune sono probabilmente state portate in clinica troppo precocemente e molte, se non tutte, sotto la guida di ditte biotecnologiche. Ad esempio la ReNeuron ([http://www.reneuron.com/company\\_info/reno01\\_for\\_stroke/](http://www.reneuron.com/company_info/reno01_for_stroke/)), sta vagliando l'uso di cellule staminali neurali immortalizzate (ottenute da feti umani alla 12ma settimana) in pazienti colpiti da ischemia cerebrale. I primi dati a proposito sembrano indicare una scarsa sopravvivenza delle cellule trapiantate e non mostrare beneficio per i pazienti. Questi studi si basano su linee cellulari fetali prodotte anni fa attraverso una procedura (l'immortalizzazione) che oggi risulterebbe obsoleta. La StemCells (<http://www.stemcellsinc.com/Therapeutic-Programs/Clinical-Trials.htm>) e la Neuralstem (<http://www.neuralstem.com/index.asp?pgid=1>) sta invece effettuando studi che prevedono l'impianto di cellule staminali neurali umane non immortalizzate per il trattamento della Sindrome di Batten, della Sclerosi Laterale Amiotrofica e delle lesioni midollari croniche. Infine, la Geron (<http://www.geron.com/GRNOPC1Trial/>) ha ottenuto l'autorizzazione dall'FDA americano per un trial clinico in fase I utilizzando precursori oligodendrogliali derivati da cellule ES umane per il trattamento di lesioni midollari acute. Anche la Advanced Cell Technology ha avuto l'autorizzazione a procedere con staminali embrionali umane per la degenerazione maculare. Nell'insieme, questi studi forniranno dei dati iniziali sull'utilizzo clinico delle cellule staminali per il trattamento di patologie degenerative cerebrali, soprattutto per quel che concerne gli aspetti di sicurezza. Quest'ultimo rappresenta un aspetto fondamentale, soprattutto in relazione alle sempre più numerose ditte nel mondo che offrono trattamenti basati su staminali per trattare diverse patologie, tra le quali anche quelle relative al cervello (51, 52). La ISSCR ha già espresso le preoccupazioni della comunità scientifica relativamente ad un apparente eccesso di ottimismo nelle informazioni che spesso si rendono disponibili attraverso web e si è organizzata per fornire tutte le informazioni disponibili, anche sui rischi relativi per il paziente che intende avvicinarsi a una di queste strategie. Emblematico è il



caso, riportato recentemente, di un bambino israeliano di 9 anni con una malattia rara del cervello (atassia telangectasica) trattato con (presunte) cellule staminali fetali in una clinica russa. Quattro anni dopo i ripetuti trapianti, in seguito all'insorgenza di una sintomatologia neurologica grave, una TAC evidenziava lo sviluppo di un tumore al cervello e al midollo spinale provocato dall'eccessiva proliferazione delle cellule trapiantate (53, 54).

In conclusione, i riflettori puntati sulle staminali devono anche portare scienziati, medici, enti regolatori e bioeticisti ad agire in modo coordinato, per potere procedere verso una responsabile traslazione della ricerca sulle cellule staminali in applicazioni cliniche appropriate e basate sull'evidenza.

### **Conclusioni**

Le terapie cellulari e la medicina rigenerativa, sempre più basate sui progressi della biologia delle cellule staminali, hanno iniziato a porre le basi della pratica clinica del futuro. Le sfide ancora aperte al fine di sfruttare appieno le potenzialità delle cellule staminali sono tuttavia molteplici e richiedono un approccio multidisciplinare integrato. Nonostante l'entusiasmo degli studi sulle staminali, non vi è probabilmente nulla di più sbagliato del procedere al trapianto nell'uomo prima del tempo e senza prove consolidate e pubbliche. L'utilità clinica delle staminali potrà essere certa solo se in grado di fornire al paziente strategie sicure, a lungo termine e sostanzialmente più efficaci di qualsiasi altro trattamento disponibile.

E' inoltre necessario che gli aspetti etici, legali e commerciali riguardanti la ricerca sulle cellule staminali e alle relative sperimentazioni cliniche continuino ad essere discussi su obiettivi concreti e attraverso strategie che si presentino sempre come medicalmente obiettive, scientificamente oneste e socialmente utili.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282:1145-7.
2. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126:663-76.
3. Okita K., Yamanaka S. Induction of pluripotency by defined factors. *Exp Cell Res*. 2010; 316:2565-70.
4. Smith A. Cell therapy: in search of pluripotency. *Curr Biol*. 1998; 8:R802-4.
5. Lodi D., Iannitti T., Palmieri B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011; 30:9-21
6. Smith A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2001, 17:435-462
7. Conti L., Cattaneo E., Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nature Rev Neurosci*, 2010; 11, 176-187
8. Celebrating 10 years of hESC lines: an interview with James Thomson. *Stem Cells*. 2008; 26:2747-8.
9. Snippert HJ, Clevers H. Tracking adult stem cells. *EMBO Rep*. 2011;12:113-22. Epub 2011 Jan 21. Review.
10. Rochat A., Claudinot S., Nicolas M. et al. Stem cells and skin engineering. *Swiss Med Wkly*. 2007; 155:49S-54S.

11. Barrandon Y. Crossing boundaries: stem cells, holoclones, and the fundamentals of squamous epithelial renewal. *Cornea*. 2007; 26:S10-2.
12. Pellegrini G., Rama P., De Luca M. Vision from the right stem. *Trends Mol Med*. 2010 Nov 11. PMID: 21075055
13. Quattrocchi M., Cassano M., Crippa S. et al. Cell therapy strategies and improvements for muscular dystrophy. *Cell Death Differ*. 2010; 17:1222-9.
14. Passier R., van Laake L.W., Mummery CL. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*. 2008; 453:322-9.
15. Deng W., Aimone J.B., Gage F.H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*. 2010; 11:339-50.
16. Reynolds B.A., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255:1707-10.
17. Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells *Annu Rev Neurosci*. 2009; 32:149-84.
18. Lledo P.M., Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci*. 2008; 31:392-400.
19. Broxmeyer HE. Insights into the biology of cord blood stem/progenitor cells. *Cell Prolif*. 2011; 1:55-9.
20. Rebutta P., Lecchi L. Towards responsible cord blood banking models. *Cell Prolif*. 2011; 1:30-4.
21. Shaw S.W., David A.L., De Coppi P. Clinical applications of prenatal and postnatal therapy using stem cells retrieved from amniotic fluid. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2011; 23:109-16.
22. Jopling C., Boue S., Izpisua Belmonte J.C. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12:79-89.
23. Barrero M.J., Izpisua Belmonte J.C. iPSC cells forgive but do not forget. *Nat Cell Biol*. 2011; 13:523-5.
24. González F., Boué S., Izpisua Belmonte J.C. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet*. 2011; 12:231-42.
25. Laustriat D., Gide J., Peschanski M. Human pluripotent stem cells in drug discovery and predictive toxicology. *Biochem Soc Trans*. 2010; 38:1051-7.
26. Park IH, Arora N, Huo H, *et al*. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008; 134:877-86.
27. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K., *et al*. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008; 321:1218-21.
28. Ebert A.D., Yu J., Rose F.F., Jr., *et al*. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 2009; 457:277-80.
29. Zhang N, An MC, Montoro D, *et al*. Characterization of Human Huntington's Disease Cell Model from Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS Curr*. 2010; 2:RRN1193.

30. Urbach A., Bar-Nur O, Daley G.Q., *et al.* Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010; 6:407-11.
31. Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell.* 2009; 136:964-77.
32. Moretti A, Bellin M, Welling A, *et al.*, Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med.* 2010; 363:1397-409.
33. Kim, K. *et al.* Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; 467, 285–290
34. Pera MF. Stem cells: The dark side of induced pluripotency. *Nature* 2011; 471:46-7.
35. Martins-Taylor K., Nisler BS, Taapken SM *et al.* Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2011; 29:488-91.
36. Lister R., Pelizzola M., Kida YS, *et al.* Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471:68-73.
37. Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, *et al.* Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7:521-31.
38. Apostolou E., Hochedlinger K. Stem cells: iPS under attack. *Nature.* 2011; 474:165-6.
39. Mummery C., Induced pluripotent stem cells--a cautionary note. *N Engl J Med.* 2011;364:2160-2.
40. Pang ZP, Yang N., Vierbuchen T. *et al.* Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature.* 2011 May 26. [Epub ahead of print]
40. Cattaneo E., Corbellini G. Science under politics. An Italian nightmare. *EMBO Rep.* 2011;12:19-22.
41. Cattaneo E. Science and politics. An interview with Elena Cattaneo, Director of the Centre for Stem Cell Research at the University of Milano, Italy. Interview by Marta Paterlini. *EMBO Rep.* 2011;12:23-6.
42. Pellegrini G., Rama P., Mavilio F. *et al.* Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy. *J Pathol.* 2009;217:217-28.
43. Rama P., Matuska S., Paganoni G. *et al.* Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med.* 2010; 363:147-55.
44. Chien KR. Lost and found: cardiac stem cell therapy revisited. *J Clin Invest.* 2006;116:1838-40.
45. Xu H, Yi BA, Chien KR. Shortcuts to making cardiomyocytes. *Nat Cell Biol.* 2011;13:191-3.
46. Chien KR. Regenerative medicine and human models of human disease. *Nature.* 2008;453:302-5.
47. Menasche P. Cardiac cell therapy: lessons from clinical trials. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50:258-65.
48. Borowiak M, Melton DA. How to make beta cells? *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21:727-32.
49. Dyson SC, Barker RA. Cell-based therapies for Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother.* 2011;11:831-44.

50. Brundin P, Barker RA, Parmar M. Neural grafting in parkinson's Disease: Problems and Possibilities. *Prog.Brain Res* 2010; 184: 265-294.
51. Taylor PL, Barker RA, Blume KG et al. Patients beware: commercialized stem cell treatments on the web. *Cell Stem Cell*. 2010;7:43-9.
52. Sipp D. Hope alone is not an outcome: why regulations makes sense for the global stem cell industry. *Am J Bioeth*. 2010;10:33-4.
53. Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med*. 2009;6(2):e1000029.
54. Goldring CE, Duffy PA, Benvenisty N et al. Assessing the safety of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell*. 2011;8:618-28.

# 5

## STAMINALI E TRAPIANTI

di Michele De Luca

Centro di Medicina Rigenerativa 'Stefano Ferrari', Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia

La prima applicazione clinica di cellule staminali fu l'infusione di cellule staminali ematopoietiche, cioè del sangue, meglio nota come trapianto di midollo.

La tecnica prende le mosse da una delle pagine più drammatiche della storia: le bombe atomiche fatte esplodere ad Hiroshima e Nagasaki nell'agosto del 1945. In seguito a quel tragico evento, infatti, si registrò in Giappone, tra la popolazione delle zone colpite dalle esplosioni, un numero notevole di morti dovute, tra gli altri, all'effetto devastante delle radiazioni che, colpendo il midollo osseo, impedivano il corretto ricambio cellulare del sangue nei pazienti.

Studiando questo fenomeno, gli scienziati compresero che irradiando il midollo di malati leucemici e ripopolandolo con cellule staminali ematopoietiche sane, i pazienti erano in grado di produrre nuove cellule del sangue. Il primo lavoro scientifico sull'argomento è un paper pubblicato nel 1957 sul *New England Journal of Medicine*<sup>16</sup> da un team di ricercatori del Fred Hutchinson Cancer Research Center di Seattle, guidati da Edward Donnall Thomas, vincitore del Premio Nobel per la Medicina nel 1990 proprio per questi studi.

Da quei primi esperimenti, sempre nuovi progressi sono stati fatti nel campo ed oggi il trapianto di midollo è una terapia diffusa su tutto il pianeta in grado di sconfiggere tumori del sangue e del midollo stesso, come la leucemia o il mieloma. Solo per dare un ordine di grandezza della diffusione della terapia, da un'indagine globale condotta su 1327 centri in 71 paesi<sup>17</sup> nel solo anno 2006 sono stati riportati un totale di 50.417 trapianti nel mondo. Nel corso degli ultimi anni si è anche arrivati a sostituire il trapianto di midollo con infusioni di cellule staminali emopoietiche isolate dal sangue periferico o dal cordone ombelicale.

Il successo clinico ottenuto con le staminali emopoietiche ha costituito un modello importante per migliaia di ricerche successive nel campo della medicina rigenerativa in tutto il mondo. Ma le speranze ingenerate da questo primo successo si sono scontrate, nella maggioranza dei casi, con insuccessi di vario genere, dovuti soprattutto alla difficoltà di isolare e/o di mantenere in coltura le cellule staminali o alla complessità degli organi che i ricercatori si proponevano di rigenerare.

---

<sup>16</sup> Thomas ED et al., *Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy*, *N Engl J Med*, 1957, vol. 157, n. 11, pp. 491-496.

<sup>17</sup> Gratwohl A et al., *Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective*, *JAMA*, 2010, vol. 303, n. 16, pp. 1617-24.

Il sangue ha una struttura molto semplice: è un liquido, entro cui circolano, in sospensione, le varie cellule che lo compongono, e per il trapianto di midollo è sufficiente infondere le cellule staminali emopoietiche nel paziente per via endovenosa, senza bisogno di coltivarle in laboratorio.

Non è un caso che la seconda tipologia di cellule staminali applicate con successo in clinica sia quella delle cellule staminali epiteliali, che rigenerano gli epiteli di rivestimento, come l'epidermide e le mucose. Si tratta di cellule organizzate in un'architettura laminare, quasi bidimensionale, più semplice da riprodurre in vitro di altri organi dalla struttura più complessa.

Padre delle cellule staminali epiteliali è un altro scienziato americano, Howard Green, professore prima al Massachusetts Institute of Technology poi alla Harvard Medical School, che riuscì, negli anni Settanta, ad isolare e coltivare le cellule staminali epidermiche e a trapiantare lembi di epidermide autologa (cioè ottenuti dalle cellule dello stesso paziente) coltivata in laboratorio in pazienti con gravissime ustioni di terzo grado sulla quasi totalità del corpo<sup>18</sup>. Si tratta della prima cellula staminale coltivata e applicata in clinica.

Il percorso fatto per arrivare a questa terapia salva-vita per le ustioni permise di conoscere a fondo la biologia delle cellule staminali epiteliali e i meccanismi molecolari che ne regolano l'auto-rinnovamento, la proliferazione e il differenziamento e aprì la strada a nuovi studi clinici, tutti sviluppati in Italia, su altre tipologie di cellule staminali epiteliali, come quelle uretrali, per la rigenerazione dell'uretra in pazienti affetti da ipospadia posteriore, e quelle limbari, responsabili della rigenerazione dell'epitelio corneale.

Di particolare rilevanza è la terapia cellulare per la ricostruzione della superficie corneale danneggiata da ustioni chimiche, basata su colture di cellule staminali limbari autologhe, applicata con successo sin dagli anni Novanta su centinaia di pazienti<sup>19</sup>, con pieno recupero della capacità visiva nel 75% dei pazienti trattati, che si è dimostrata stabile nel tempo, anche dopo molti anni di follow-up<sup>20</sup>.

Queste tre tipologie di cellule (emopoietiche, epidermiche e limbari) possono essere considerate ancora oggi le uniche cellule staminali effettivamente impiegate come terapie consolidate, insieme naturalmente ad altre cellule non staminali, come, ad esempio, quelle della cartilagine.

Naturalmente accanto ad esse, le varie tipologie di cellule staminali (somatiche o "adulte", embrionali e iPS o pluripotenti indotte) sono oggetto di numerosissime ricerche e di studi preclinici in tutto il mondo e non mancano anche sperimentazioni cliniche (quasi tutte di fase I o al massimo II), come quelle di terapie cellulari a base di cellule staminali embrionali, iPS, mesenchimali midollari, staminali cerebrali fetali e mesangioblasti del muscolo.

---

<sup>18</sup> O'Connor N et al., *Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells*, Lancet, 1981, vol. 317, pp. 75-78 e Gallico GG III et al., *Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium*, N Engl J Med, 1984, vol. 311, pp. 448-51.

<sup>19</sup> Pellegrini G et al., *Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium*, Lancet, 1997, vol. 349, pp. 990-3.

<sup>20</sup> Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G, *Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration*, N Engl J Med, 2010, vol. 363, pp. 147-55.

Un altro filone di ricerca molto promettente, ma al momento ancora lontano dall'impiego come terapia consolidata, è quello della terapia genica, che non a caso, ha dato risultati positivi in sperimentazione sull'uomo proprio sulle stesse tipologie di cellule staminali oggi impiegate routinariamente in terapia cellulare: ematopoietiche (come i pionieristici studi di Alessandro Aiuti, Claudio Bordignon, Alessandra Biffi e Luigi Naldini sull'ADA-SCID<sup>21</sup>, sulla Leucodistrofia Metacromatica<sup>22</sup> e sulla Sindrome di Wiskott-Aldrich<sup>23</sup>) ed epidermiche (come la sperimentazione clinica sull'Epidermolisi Bollosa condotta nel 2005 dal nostro gruppo<sup>24</sup>).

Se da un lato è innegabile l'importanza sempre più strategica attribuita alla medicina rigenerativa, che si pone concretamente come nuova frontiera terapeutica, in grado di affrontare sfide sempre più complesse, soprattutto nel campo delle patologie rare e genetiche, dall'altro è indispensabile porre l'accento su alcuni caveat irrinunciabili.

C'è ancora bisogno di pazienza e di molta cautela nel passaggio dal laboratorio al paziente, perché è indispensabile che a monte di questo passaggio, cui spesso ci si riferisce come medicina "traslazionale", ci sia una solida e approfondita conoscenza della biologia delle cellule staminali e dei meccanismi molecolari e funzionali che le caratterizzano. Conoscenza che si ottiene soltanto attraverso una solida ricerca di base e una rigorosa ricerca pre-clinica, cui devono necessariamente seguire sperimentazioni cliniche ancora più rigorose, che siano in grado di garantire sia la sicurezza sia l'efficacia delle terapie proposte.

Se è infatti legittimo riporre ragionevoli aspettative sui risultati ottenibili attraverso l'impiego clinico delle cellule staminali, o di alcune di esse, è scorretto e deprecabile investire queste affascinanti cellule di promesse irrealistiche come quelle alimentate dalla falsa credenza che possano costituire una sorta di panacea per tutti i mali, in grado di rigenerare qualsiasi tessuto del corpo umano.

Spesso i pazienti, a volte purtroppo abilmente manovrati da sedicenti scienziati senza scrupoli, sono portati a credere che un trial clinico che sembra promettente in vitro o sul topo possa essere disponibile in tempi brevissimi come terapia sicura ed efficace. In realtà questo passaggio è estremamente lungo e complesso e spesso non dà i risultati sperati, soprattutto se non vengono scrupolosamente eseguite tutte le fasi di ricerca e sperimentazione cui si è accennato.

---

<sup>21</sup> Aiuti A et al., Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency, *N Engl J Med*, 2009, vol. 360, pp. 447-458.

<sup>22</sup> Biffi A et al., *Therapeutic Benefit in Metachromatic Leukodystrophy by Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy*, 2013, *Science*, vol. 341, 1233158.

<sup>23</sup> Aiuti A et al., *Lentivirus-based Gene Therapy of Hematopoietic Stem Cells in Wiskott-Aldrich Syndrome*, 2013, *Science*, n. 341, vol. 341, 1233151.

<sup>24</sup> Mavilio F et al., *Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells*, *Nat Med*, 2006, vol. 12, pp. 1397-402.





# 6

## **DON'T MARKET STEM-CELL PRODUCTS AHEAD OF PROOF**

di Paolo Bianco  
Dipartimento di Medicina Molecolare, Sapienza Università di Roma  
Nature 499, 255 (18 July 2013)

Translational medicine is said to reflect a need to harness the huge wealth of scientific knowledge in biomedicine. In fact, it is a direct consequence of the globalized outsourcing of research and development by the pharmaceutical industry, resting on the creation of commercial enterprises within academia. A commercial drive in academia can, however, significantly alter scientific concepts in biology and medicine.

Mesenchymal stem cells (MSCs) provide a prime example of this. Decades of research on these cells, found in the bone marrow, show that they go on to form skeletal tissues such as bone, fat and cartilage, which they can also help to regrow and repair in the clinic. Yet companies have already emerged that market MSCs for a much broader range of applications. Against mainstream scientific evidence, these firms argue that the cells are veritable injectable drug stores.

This commercial creep has reached the pages of authoritative scientific journals, with articles suggesting that intravenously infused MSCs can be used as a single agent to mute or cure a long list of unrelated diseases in multiple organs, regardless of their cause and nature. Notably, these include terminal neurodegenerative diseases, strokes and heart attacks. These are extraordinary claims that would require extraordinary evidence, which, in my view, does not yet exist. The very concept of MSCs has become divorced from that of a stem cell found in bone marrow. The scientific literature now contains two conflicting descriptions of these cells — one based on science, another on commerce.

Industry has not yet generated conclusively proven medicinal products or major novel technologies to better harness the biology of MSCs. However, commercial interest has profoundly influenced the definition of these cells (and of their clinical potential) within the scientific community. This is translational medicine in reverse. Commercial products have been converted into scientific concepts. It highlights an important dark side of the commercialization of science.

The marketing of MSCs as a cure-all is no coincidence — they have long been credited with potential performances that are beyond their biological limits. A decade or so ago, they were promoted as an ethical alternative to pluripotent stem cells derived from human embryos. They lost that unique selling point with the

arrival of a technique to genetically reprogram adult cells into pluripotent cells. Suddenly, MSCs became ‘pluri-effective’ through intravenous infusions and release of chemical factors. Yet intravenously infused MSCs die rapidly and are quickly cleared from the body. As shown by 50 years of in vivo experiments, locally transplanted MSCs form bone. They do so, data show, even if transplanted into the heart or brain.

How MSCs would mute or cure unrelated diseases has never been fully explained, in my view. Proponents say that the cells would restore brain function by nurturing cells with chemical factors. This remains unproven. With no reliable preclinical rationale, trials of MSCs can never be anything other than inconclusive. The only winners are the firms wishing to sell the therapies, which add the trial details — if not the results — to their marketing brochures.

Some 300 clinical trials on MSC infusions have been, or are being, conducted worldwide. Their mere initiation, paradoxically, is used to suggest that intravenously infused MSCs can cure multiple unrelated diseases, which (to my knowledge) is not proven at this time. These statements, and the trials that fuel them, represent a new kind of advertisement within science. They can distort science and medicine, mislead the public, create illusions for patients, sabotage health-care systems and, above all, obstruct rather than accelerate the growth of science and the development of medicine from it.

This is a worldwide problem, highlighted by current events in Italy. A Brescia-based organization called the Stamina Foundation is promoting an unproven MSC therapy to vulnerable patients, including children with lethal neurological diseases. This has in effect forced the Italian government to test the therapy in a government-funded clinical trial, to cope with a media-generated social crisis and the risk of infringing European regulations on stem-cell therapies. Last week, Nature called for the trial to be scrapped (see Nature 499, 125; 2013) as evidence emerged of terminal flaws in the biology behind the purported cure. Stamina is backed by companies and a lobbying organization called the Cure Alliance, which has offices in Milan and Rome.

Central to the agenda of those who promote unproven therapies is an attack on the regulations surrounding such treatments, as well as the regulatory bodies that enforce them. Bone-marrow transplantation, some say, would never have been developed under today’s stringent regulations. But bone-marrow transplantation was never a commercial product, and it developed when no one was out to sell stem cells directly to patients and ahead of proof.

Translating science into effective medicine cannot be based on indiscriminate development of commercial products. The push to fund commercial science and the seep of commercial descriptions of natural objects within academia can severely affect science, medicine and the economy. Claiming the right to market products ahead of proof of efficacy can only bring ineffective products to market, degrade medicine and impoverish all except, perhaps, the fortunate sellers.

# 7

## **REGOLE PER LE TERAPIE AVANZATE A BASE DI STAMINALI. QUALI TUTELE PER I PAZIENTI?**

di Luca Pani  
Agenzia Italia del Farmaco (AIFA)

Per capire in quale contesto (sia nazionale che internazionale) sono inquadrati le regole che governano le Terapie Avanzate a base di cellule staminali è utile fornire alcuni elementi di riferimento in modo da comprendere in che modo si tenta di garantire la tutela dei pazienti.

Il Decreto Legislativo n. 219/2006, cosiddetto codice del farmaco, definisce anche i medicinali per terapia avanzata (nell'ambito dei quali rientrano i medicinali a base di cellule staminali). La produzione e la commercializzazione di tali prodotti ad uso industriale deve essere autorizzata dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). Un discorso a parte va fatto per i medicinali per terapia avanzata ad uso non ripetitivo (quindi non prodotti industrialmente). Tali prodotti a livello europeo sono previsti nell'art. 28 del Regolamento n. 1394/2007/CE, che – in pratica – rinvia la disciplina alla normativa dei singoli Stati, dettando comunque alcuni principi che devono essere rispettati dagli Stati membri.

In Italia, tale disciplina non è stata ancora del tutto attuata, essendo stata individuata solo l'AIFA quale istituzione pubblica che autorizza la produzione di medicinali per terapia avanzata per uso non ripetitivo (art. 3, comma 1, lett. f-bis, D.Lgs. n. 219/2006, lettera aggiunta dalla legge comunitaria 2008). Per tale ragione si continua ad applicare il DM 5 dicembre 2006 recante disciplina sulla "utilizzo di medicinali per terapia genica e per terapia cellulare somatica al di fuori di sperimentazioni cliniche e norme transitorie per la produzione di detti medicinali". Si tratta dunque di una disciplina transitoria e al di fuori delle sperimentazioni cliniche (e di tutte le garanzie che ne conseguono) che dovrebbe trovare applicazione solo:

- Su singoli pazienti;
- In mancanza di valida alternativa terapeutica;
- Nei casi di urgenza e di emergenza che pongono il paziente in pericolo di vita o di grave danno alla salute nonché nei casi di patologie a rapida progressione;
- Sotto la responsabilità del medico prescrittore.
- In presenza di numerosi requisiti;

Si ribadisce che tali farmaci possono essere utilizzati al di fuori di ogni sperimentazione, purché siano disponibili dati scientifici, che ne descrivano specificamente metodiche, preparazioni e uso, pubblicati su accreditate riviste internazionali.

Tale normativa non va poi confusa con il cosiddetto uso compassionevole – che invece viene impropriamente utilizzato comunemente - che è disciplinato dal DM 8 maggio 2003 e che riguarda l'uso “compassionevole” di un farmaco già sottoposto a sperimentazione clinica e che l'azienda produttrice lo fornisce gratuitamente per uso diverso da quello per cui la sperimentazione è in fase già avanzata, ma che la gravità del paziente e la mancanza di valida alternativa terapeutica ne giustificano l'utilizzo non sperimentato.

Come abbiamo scritto recentemente con Paolo Bianco non esiste una categoria a se stante di terapie che si possano chiamare “compassionevoli”. Il termine “uso compassionevole” origina dal *Compassionate Investigational New Drug Program* che la *Food and Drug Administration* (FDA) degli Stati Uniti varò dopo la vittoria legale di Robert C. Randall in *Randall vs. United States*. Randall coltivava e assumeva illegalmente marijuana perché sofferente di glaucoma, una malattia che silenziosamente rende ciechi attraverso l'aumento stabile della pressione interna dell'occhio (tono oculare). I cannabinoidi abbassano il tono oculare, e Randall convinse la Corte di non essere quindi penalmente perseguibile. Il programma della FDA fu varato a seguito di quella sentenza, per consentire in via eccezionale a un limitatissimo numero di pazienti, e sotto la vigilanza di organi tecnici del Governo, l'uso di una sostanza altrimenti considerata illegale. Il medesimo programma fu chiuso dal Presidente George HW Bush quando l'esplosione dell'AIDS (la marijuana ha effetti antiemetici e analgesici) negli anni '80 portò a un numero di richieste di trattamento che avrebbe trasformato il ricorso eccezionale in uso legale di massa di marijuana. L'effetto dei cannabinoidi sul tono oculare è ragionevolmente comprovato, ma esistono farmaci diversi che producono effetti analoghi con maggiore efficacia e con minore tossicità; l'uso medico non regolamentato dei derivati della cannabis presenta quindi notevoli criticità. La storia però serve a illustrare che *ab ovo*, il termine *compassionevole* non implica solo l'uso di un farmaco *non approvato per il commercio*, ma anche e soprattutto il suo uso in circostanze eccezionali. L'uso ristretto e limitato, e non di massa, è la prima caratteristica che definisce l'uso detto “compassionevole” di un farmaco, che non è generalmente percepita in ambito mediatico.

La seconda caratteristica generalmente ignorata è che perché un farmaco si possa usare in modo “compassionevole”, il farmaco deve essere comunque approvato, e l'uso “compassionevole” autorizzato. Le caratteristiche tecniche del farmaco devono essere note, precise e dettagliate proprio come nel caso in cui lo si voglia sottoporre a formale sperimentazione clinica. Senza comprendere come si svolge il processo di sviluppo di un farmaco non si può comprendere cosa sia il suo uso compassionevole. In America chi ritiene (tipicamente un'industria) di aver possibilmente identificato un farmaco potenzialmente efficace, deve per prima cosa ottenere dalla FDA, per quel prodotto, lo status di *Investigational New Drug* (IND), che significa *nuovo farmaco sperimentabile*. Questo significa presentare un dettagliato dossier che comprende la completa e puntuale descrizione di

caratteristiche chimiche o biologiche, le modalità di produzione, i dati nell'animale, e quant'altro necessario a rendere plausibile l'innocuità ed efficacia del nuovo prodotto. Solo avendo ottenuto dalla FDA lo status di IND, un prodotto può essere oggetto di sperimentazione clinica. E solo avendo ottenuto lo status di IND, un farmaco può essere usato in modo "compassionevole". L'industria che produce il farmaco sperimentabile, ne promuove la sperimentazione per stabilirne innocuità ed efficacia, assumendosene i costi, in collaborazione con esperti clinici delle malattie che costituiscono indicazione per il farmaco. Durante la sperimentazione, un medico che abbia in cura pazienti con le stesse malattie, può richiedere l'autorizzazione a usare quel farmaco per un caso *singolo*, per il quale si ravvedano necessità e urgenza ("uso compassionevole"). Chi concede l'autorizzazione all'uso singolo è sempre e solo la FDA (ovvero l'AIFA in Italia), e lo fa in base al dossier tecnico (IND) che il *produttore* del farmaco ha precedentemente presentato alla FDA e che la FDA ha approvato. Lì si trovano le caratteristiche tecniche che giustificano sia la sperimentazione del farmaco, sia il suo uso in via "compassionevole". Senza quel "passaporto" che rende un farmaco *sperimentabile*, non è legale nessuna sperimentazione clinica, e nessun uso singolo del farmaco.

Il D.M. 8 maggio 2003, che regola l'uso "compassionevole" in Italia, si riferisce esattamente alle circostanze previste dall'*Expanded Access Program* della FDA, ovvero a medicinali già sperimentati o in corso di sperimentazione. Il D.M. Turco-Fazio 5 dicembre 2006, di recente interpretato, violato e distorto a piacimento, si riferisce invece a "medicinali" *cellulari* per i quali *non* siano in corso sperimentazioni cliniche. Nessun medicinale è mai usato in modo compassionevole senza che si sappia cosa è e che proprietà ha, e lo si sappia da un dossier dettagliato e approvato dall'Agenzia Regolatoria del Farmaco. Nel caso di cellule, la situazione non è diversa. L'uso nel caso *singolo* ("compassionevole") non può essere autorizzato in assenza di quei dati che identificano il medicinale cellulare e le sue proprietà, e ne dimostrano purezza, potenza, qualità, profilo di sicurezza ed efficacia plausibile, senza che esista un razionale per invocarne l'uso nell'uomo, *anche se nel caso singolo*. Non si può dunque trattare direttamente un paziente senza autorizzazione e senza aver prima mai presentato un protocollo o un dossier di questo tipo e tanto meno procedere all'uso indiscriminato di massa di un preparato cellulare rivendicandone una immaginaria natura intrinseca di "terapia compassionevole". Secondo la legge europea (Regolamento (CE) n. 1394/2007) un preparato cellulare è un medicinale, e non esiste un "medicinale compassionevole". Chi produce cellule in laboratorio, non produce "medicinali compassionevoli". Produce un medicinale, che può essere usato nel caso singolo ("compassionevole") solo se ammissibile a essere sperimentato. Le competenze in materia di produzione dei farmaci cellulari per uso singolo ("compassionevole") sono assegnate dalla legge europea all'autorità regolatoria nazionale in materia di farmaci, che in Italia è l'AIFA. Non esiste "uso compassionevole" in casi singoli se non l'uso autorizzato nel caso singolo di un farmaco *sperimentato* o, quanto meno, *sperimentabile*, e con un preciso razionale clinico. Il resto non è medicina, è attività illecita.

Il Premio Nobel Shinya Yamanaka a questo proposito ha affermato: «Non dobbiamo ignorare le leggi e le regole che esistono per proteggere i pazienti» sottoposti a nuove terapie a base di staminali e ha invitato a non farsi prendere

dall'entusiasmo» di bruciare le tappe nel progresso delle terapie avanzate. «È successo – ha aggiunto - che pazienti siano stati danneggiati quando i trattamenti hanno *bypassato* le procedure mediche e regolatorie». Il Nobel ha invitato il mondo politico e la società tutta ad ascoltare le preoccupazioni degli scienziati internazionali riguardo alla somministrazione prematura di trattamenti non provati a base di staminali, e a riconoscere l'importanza della supervisione delle autorità regolatorie nella tutela dei pazienti quando si sviluppano nuovi farmaci a base di cellule staminali. Si ribadisce la necessità di sperimentare questi trattamenti «in studi clinici controllati per produrre conoscenza in grado di aiutare tutti i pazienti».

Proprio per proteggere i pazienti, anche le linee guida della Società internazionale per la ricerca sulle cellule staminali (ISSCR) per il trasferimento in clinica delle terapie con staminali «enfaticizzano il concetto che - sottolinea la stessa società scientifica - la manipolazione e la produzione di qualunque prodotto cellulare dovrebbero essere condotte sotto un controllo competente e indipendente, per assicurare il più possibile la qualità e la sicurezza delle cellule». Le Linee guida - prosegue l'ISSCR - raccomandano il rispetto degli standard GMP (di buona produzione) per la manipolazione estensiva di staminali finalizzata all'applicazione clinica. In molti Paesi i prodotti cellulari profondamente manipolati al di fuori dal corpo prima di essere somministrati ai pazienti sono soggetti al controllo di agenzie del farmaco come l'americana FDA, l'EMA Europea e l'omologa giapponese PMDA. Tutti gli scienziati ribadiscono «il valore di un solido razionale biologico per gli interventi clinici con prodotti a base di cellule staminali, basati su una rigorosa evidenza ottenuta in studi preclinici e su un'ipotesi plausibile riguardo alle potenzialità dei trattamenti cellulari per combattere una determinata malattia».

In conclusione la posizione delle Agenzie Regolatorie e/o Ministeri della Salute della Comunità Europea conferma che metodiche con staminali non controllate non sono approvabili. Altre realtà simili a quelle di Stamina in Italia, come Xcell in Germania o CellTex in USA, sono state chiuse dai rispettivi governi. L'AIFA ha assunto e difeso una dura posizione opponendosi al mercato dei miracoli (*medical tourism*) che illude i pazienti gravi e affetti da malattie rare e/o degenerative offendendone la dignità sulla base della disperazione loro e delle loro famiglie.

# 8

## **INTERVENTI DELLA GIORNATA**

## 8.1

### **Come portare sul banco del laboratorio i quesiti della clinica? Le cellule staminali come modello di malattia**

Elisabetta Cerbai

Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Firenze

La nostra capacità di comprendere i primi passi del differenziamento di cellule “incompetenti” a cellule “specializzate” si è enormemente accresciuto con lo studio delle cellule staminali embrionali. La possibilità di osservare giorno dopo giorno l'evoluzione di una cellula indifferenziata e pluripotente in neurone, muscolo, cuore, pelle, e anzi di poterne indirizzare il cammino cambiando poche, selettive condizioni di coltura ha aperto un mondo fino a qualche anno fa inimmaginabile.

Questo è stato il primo passo, poter costruire cellule e quindi tessuti specializzati su un banco di laboratorio, soprattutto quei tessuti che non avevamo la possibilità di ottenere da cellule adulte.

Da questo primo passo, e dalla comprensione dei messaggeri fondamentali che trasformano una cellula “pluripotente” in una cellula “altamente specializzata”, è scaturita la geniale intuizione di ripercorrere questa strada all'indietro, rendendo virtualmente possibile ottenere in laboratorio cellule pluripotenti “indotte” (iPS) da quelle adulte, specializzate.

Si sono aperte così altre inaspettate possibilità e nuove frontiere per problemi clinici tuttora irrisolti. È possibile infatti osservare in una semplice “capsula di Petri” l'evolversi di alcune malattie, ripercorrendole attraverso i processi di crescita e differenziamento, anzi, mal-differenziamento di cellule iPS. Faremo alcuni esempi di malattie cardiache su base genetica, che determinano più o meno precocemente lo sviluppo di alterazioni morfologiche o funzionali del cuore tali da causare, spesso inaspettatamente, aritmie e morte improvvisa in persone di giovane età.

La seconda rilevante opportunità è quella di testare sui tessuti umani ottenuti in vitro l'effetto terapeutico (o tossico) di farmaci, allo scopo di saggiarne la capacità di prevenire il maladattamento o alleviare il malfunzionamento delle cellule adulte, o viceversa conoscere ed evitare principi attivi potenzialmente pericolosi nell'uomo.



## 8.2 Staminali e neuro-immuno-infiammazione

Francesca Rossi <sup>1</sup>, Sabatino Maione <sup>2</sup>

1 Dipartimento della Donna, del Bambino e di Chirurgia Generale e Specialistica, Seconda Università di Napoli, 2 Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli

Le Cellule Mesenchimali Stromali (MSCs) sono cellule multipotenti, in grado di differenziare in diversi citotipi (osteoblasti, adipociti, condrociti, miociti, cellule epiteliali). Possono essere isolate dal midollo osseo dell'adulto e - grazie alla loro capacità di aderire alla plastica - essere espanse *in vitro* in quantità potenzialmente utili per le applicazioni terapeutiche.

Peculiarità delle MSCs sono l'assenza sulla loro superficie degli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I e delle molecole costimolatorie CD40, CD80 e CD86 e la moderata espressione degli antigeni MHC di classe II. Per tali caratteristiche, le MSCs riescono a sfuggire al riconoscimento da parte dei linfociti T alloreattivi e delle cellule *natural killer* (NK). Oltre a essere non immunogene, le MSCs hanno un'attività immuno-regolatoria ed anti-infiammatoria anche se la comprensione dell'entità e della persistenza di tale effetto necessita ulteriori studi. Alcuni studi *in vitro* hanno dimostrato, infatti, che le MSCs inibiscono diverse vie dell'immunità cellulo-mediata: prevenendo la risposta T-cellulare nella reazione mista linfocitaria allogenica, bloccano la differenziazione e la maturazione delle cellule dendritiche indotte da alloantigeni, inibiscono la proliferazione di linfociti e cellule NK, inducono la differenziazione in cellule T regolatorie e, infine, favoriscono la risposta mediata dai linfociti *T helper 2* rispetto ai *T helper 1*. Inoltre, le MSCs deprimono l'immunità umorale, sopprimendo la proliferazione, la chemiotassi e la produzione di anticorpi da parte delle cellule B. L'effetto immunosoppressivo delle MSCs è stato dimostrato anche *in vivo* in alcuni modelli animali sperimentali di trapianto solido e nell'uomo in alcune malattie autoimmuni, prima fra tutte la *Graft versus Host Disease*.

In altri studi si parla di effetto neuroprotettivo delle MSCs che potrebbe essere mediato dalla loro capacità di produrre diversi fattori trofici che contribuiscono al recupero funzionale, alla sopravvivenza delle cellule neuronali ed alla stimolazione della rigenerazione endogena. Sembrerebbe che l'applicazione di MSCs in patologie neurodegenerative esercita un effetto neuroprotettivo attraverso un'azione diretta verso la attivazione delle cellule della microglia, inibendo il rilascio di fattori pro-infiammatori o *shiftando* il fenotipo di tali cellule verso quello anti-infiammatorio/neuroprotettivo.

Tra i diversi fattori che regolano gli orientamenti dei fenotipi delle cellule microgliali, i cannabinoidi sembrano rappresentare un *target* di elezione. In particolare, il recettore maggiormente coinvolto è il recettore cannabinoide di tipo 2 (CB2), presente soprattutto in cellule del sistema immunitario. In un recente studio, condotto presso i laboratori della Seconda Università degli Studi di Napoli, abbiamo dimostrato la presenza del sistema endocannabinoide in MSCs umane e il potenziale ruolo del CB2 nell'effetto immuno-regolatorio delle MSCs umane.

Alla luce di queste osservazioni, la modulazione della risposta infiammatoria/immunitaria operata dalle cellule MSCs mediante il complesso sistema degli endocannabinoidi, rappresenta una potenziale strategia terapeutica per lo sviluppo di strategie volte a ridurre il danno in patologie neurologiche croniche a carattere degenerativo.

## 8.3 Cellule staminali e malattie del cervello

Gianvito Martino

Divisione di Neuroscienze, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Ormai da qualche anno assistiamo, più o meno impotenti, ad annunci quotidiani che propagandano cure miracolistiche a base di cellule staminali per qualsivoglia malattia. Questa situazione aumenta lo sconcerto tra le persone malate che, se da un lato hanno l'impellente necessità di conoscere le speranze concrete di poter accedere a terapie realmente efficaci, dall'altro percepiscono la mancanza di adeguati canali d'informazione che le aiutino a scegliere in modo consapevole e informato.

È bene sapere, anzitutto, che non ci sono staminali per tutto e per tutti, generalizzare è sbagliato. In alcuni casi le cellule staminali sono già una realtà. Solo in Italia, si eseguono più di quattromila trapianti all'anno di cellule staminali del sangue (il cosiddetto trapianto di midollo osseo) per curare i tumori del sangue. Negli ultimi vent'anni, le staminali della pelle hanno curato migliaia di gravi ustionati in tutto il mondo, così come molte persone con problemi di vista determinati da danni alla cornea. In questi ambiti si tratta di dati reali ed affidabili, ma le evidenze di un potere curativo delle staminali in altri contesti - ed in particolare nelle malattie neurologiche - sono tutt'altro che chiare: i risultati fino ad ora ottenuti non sono né solidi né di univoca interpretazione, e necessitano di ulteriori sperimentazioni e conferme.

Non basta aver identificato ed essere riusciti a crescere in laboratorio i vari tipi di staminali, per riuscire a curare le persone bisognose di cura. Né si può parlare dell'argomento in modo generico, senza soffermarsi sul fatto che ci sono profonde differenze tra le varie staminali, così come tra le varie malattie, e che ogni approccio terapeutico deve essere malattia-specifico. Se le staminali servono per curare i tumori del sangue, non è detto che siano altrettanto efficaci nel curare i tumori del cervello. Abbiamo ancora una scarsa conoscenza dei meccanismi di base che regolano il funzionamento di queste cellule, conoscenza necessaria per poter sviluppare terapie a base di staminali efficaci e prive di rischi.

Tante sono le domande a cui dobbiamo ancora rispondere. Quali cellule staminali utilizzare? Dove prelevarle e come trapiantarle? Embrionali, adulte, fetali? Del cuore, del sangue, del grasso?

Le cellule embrionali danno meno problemi di rigetto, ma possono dare origine a tumori. Le cellule adulte sono prive di tossicità ma in certi casi, come per il cervello, se ne possono ottenere solo quantità minime, e comunemente funzionano solo in modo parziale e transitorio. Esiste, infine, la possibilità di utilizzare cellule embrionali "ringiovanite" - le cellule staminali indotte pluripotenti - simili a quelle embrionali, ma ottenute da cellule adulte trasformate in laboratorio.

Se anche avessimo la cellula "giusta", come trapiantarla? In caso di infarto, la somministrazione diretta nella zona danneggiata del cuore rappresenta senz'altro la via migliore, ma in malattie come la sclerosi multipla, la sclerosi laterale amiotrofica, la malattia di Alzheimer, dove il danno è diffuso ed un intervento neurochirurgico multiplo sarebbe troppo rischioso e complicato, come possiamo intervenire? Evidenze recenti ci suggeriscono che potremmo utilizzare il sangue o

il liquido cefalorachidiano per veicolare le cellule lì dove servono, ma si tratta di ipotesi ancora da verificare.

E, se anche riuscissimo a trapiantare la cellula giusta, come funzionerebbe, una volta immessa nel corpo? È invalsa l'opinione, alquanto sbrigativa, che le staminali sono in grado di ricostruire i tessuti grazie alla loro capacità di sostituirsi alle cellule danneggiate. Ma questo non è tutto. Studi recenti hanno, infatti, evidenziato come le cellule staminali del cervello, una volta trapiantate, possono anche prevenire un ulteriore danno del tessuto malato poiché sono in grado di secernere sostanze neuroprotettive (effetto bystander). Questo nuovo *modus operandi* delle staminali ha certamente ampliato le loro possibili applicazioni terapeutiche ma contestualmente ha anche aumentato la loro potenziale pericolosità. Infatti, sono già diversi gli studi disponibili che sottolineano come cellule staminali iniettate nel posto sbagliato al momento sbagliato possono determinare danni spesso irreversibili.

In sostanza, per trasformare esperienze aneddotiche o promettenti risultati preclinici in terapie sicure ed efficaci, non servono notizie gridate né viaggi della speranza, così come non serve che l'opinione pubblica si schieri a favore o contro qualcosa o qualcuno. Serve invece pianificare oculatamente la ricerca, favorire un dialogo sempre più stretto tra ricerca di base e ricerca clinica, utilizzare protocolli d'indagine internazionalmente validati e confrontabili, analizzare attentamente i risultati già ottenuti e, non ultimo, divulgare "sottovoce", con misura e rispetto.

## 8.4 Cellule staminali commerciali: sfide amministrative e di governo

Paolo Bianco

Dipartimento di Medicina Molecolare, Sapienza Università di Roma

Ogni anno nel mondo, 50,000 persone ricevono una terapia con cellule staminali che salva la loro vita e neanche richiama le cellule staminali nel suo nome routinario (trapianto di progenitori ematopoietici o trapianto di midollo). Per ognuna di quelle 50,000 persone, almeno altre 3 ricevono invece un trattamento che è detto essere a base di staminali e il piu' delle volte non lo è; che è detto essere una terapia e non lo è mai; che non è detto essere un business commerciale spesso illecito e dannoso per i pazienti, e lo è sempre. Quei trattamenti sono "applicazioni", ma applicazioni del nulla. Sono trattamenti, e sono commercio, ma non sono terapie. Questo problema esiste negli Stati Uniti, in Germania, in Israele, in India, in Giappone, in Korea, in Turchia, in Kazakistan, in Messico, a Panama, in Argentina, in Russia, in Cina, solo per citare i paesi nei quali il fenomeno è socialmente cospicuo a sufficienza per guadagnare le pagine del New York Times, o l'attenzione della National Academy of Sciences degli USA, che ha varato una indagine conoscitiva tesa a quantificare il fenomeno in modo accurato. Si tratta di un canone di marketing ricorrente, alimentato da una rete di precisi interessi economici (e politici) internazionali, e che poggia, per ottenere penetrazione sociale, su un sistema di triangolazioni: tra scienza, medicina ed etica, ovvero tra esperimento, terapia e compassione. La "terapia" permette di giustificare la parcella; l'"innovazione", giustifica l'inefficacia e l'insuccesso della "terapia"; e la "compassione" giustifica che si pratici una terapia inutile, a pagamento, a un malato senza speranza. Così un atto inutile e dannoso diventa medicina; un atto stupido diviene scienza; e un atto abietto diviene etica; e la triangolazione diventa business. La penetrazione sociale si basa anche su modi specifici di intervento sulla politica da parte di reti e lobby commerciali, su guerre contro le Agenzie regolatorie, e sulla creazione di infrastrutture e investimenti locali; la storia recente delle scelte legislative e amministrative del Messico e delle loro conseguenze sociali oltre che sanitarie lo dimostra, ed evoca somiglianze con specifici scenari italiani.

La medicina non è solo terapia. E', prima ancora, diagnosi e patogenesi, comprensione del meccanismo fisiologico alterato, e identificazione del punto di intervento terapeutico e delle sue variabili modalita' (cellule, ma anche farmaci; scenari, tempi, vie di somministrazione, dosi). La scienza non è solo innovazione tecnologica autosufficiente e commerciabile. E' comprensione del mondo naturale attraverso l'esperimento, e nel mondo naturale ricadono per intero la fisiologia umana e la patologia. L'etica infine, non è solo compassione, e la compassione non è solo del medico, e non è solo diretta al singolo individuo che la chiede. Le cellule staminali sono oggi da un lato la fonte di strumenti tecnologici e concettuali che permettono di comprendere i meccanismi di malattia e i possibili punti di intervento terapeutici; dall'altro, per alcuni, uno strumento di propaganda commerciale impropria, demagogica, o francamente fraudolenta.

Verrà discusso un esempio di come lo stesso oggetto del mondo naturale, le cellule staminali dello scheletro, possano essere usate in un modo o nell'altro, e quali siano le implicazioni mediche e scientifiche, ma anche economiche, sociali e politiche, della confusione dei due piani. L'esempio cercherà di mostrare dove possa portare, in una specifica malattia genetica e rara, devastante quanto mai conosciuta e senza rimedio, l'intreccio di ricerca clinica e biologica (ivi compresa la sperimentazione sull'animale) se ancorato al senso e alla razionalità; e quali catastrofi generi invece la confusione tra interessi commerciali e interessi della scienza e della medicina e il cattivo uso degli stessi oggetti biologici. Emerge da qui la necessità urgente di proteggere l'uomo da sperimentazioni senza senso medico, in uno scenario in cui l'uomo è oggi la specie meno protetta dall'abuso di sperimentazioni inutili o dannose. Infine, verrà discusso quali anticorpi la scienza e la medicina stia efficacemente producendo contro queste deviazioni commerciali socialmente destruenti, quali siano le sfide con cui chi amministra la cosa pubblica si deve confrontare in questo nuovo scenario planetario, e come sia centrale in questo quadro tanto il dialogo tra medicina scientifica e politica, quanto la precisa definizione dei loro distinti ambiti di competenza.

## 8.5

### **Terapia genica con cellule staminali ematopoietiche**

Luigi Naldini

Istituto San Raffaele Telethon per la Terapia Genica, Tiget, Milano

Questa terapia consiste nel sostituire geni difettosi o disregolati prelevando dai pazienti cellule staminali ematopoietiche (quelle cioè da cui originano tutte le cellule del sangue), inserendovi il gene sano tramite speciali virus (lentivirus) usati come vettori, per poi reinfonderle nel paziente che si troverà, grazie alle peculiari proprietà della staminali, nuove linee cellulari sane che rimpiazzeranno nel tempo quelle col gene alterato. Questa complessa procedura di ingegneria biomedica, che utilizza sia la terapia genica (sostituzione, disattivazione o attivazione dei geni) sia la terapia della rigenerazione cellulare (sostituzione di linee cellulari difettose o di tessuti degenerati), sta offrendo prospettive di cura per diverse malattie. Il nostro laboratorio sta svolgendo con successo ricerche sulla leucodistrofia globoide cellulare (GLD, nota anche come malattia di Krabbe) e sulla leucodistrofia metacromatica (MLD). Nella GLD con la terapia menzionata normalizziamo l'alterazione di una struttura cellulare deputata alla degradazione di materiale da espellere grazie alla regolazione del gene mutato GALC (galattocerebrosidasi). Nella MLD, che è anche essa una malattia ereditaria dovuta all'accumulo di scarti cellulari in cui i pazienti mostrano progressivo deterioramento motorio-cognitivo e muoiono nel giro di pochi anni dall'insorgenza dei sintomi, la terapia consiste nella sostituzione del gene ARSA in età pre-sintomatica. Con la sostituzione del gene permessa dalla strategia terapeutica sviluppata nel nostro laboratorio la malattia nei tre pazienti trattati non si è manifestata né è progredita nei 7-21 mesi oltre l'età prevista dei sintomi.

## 8.6

### Le staminali che curano le malattie lisosomiali

Alessandra Biffi

Istituto San Raffaele Telethon di Terapia Genica e Unità di Immunoematologia Pediatrica e Trapianto di Midollo, Ospedale San Raffaele, Milano

Le malattie da accumulo lisosomiale sono un'eterogenea famiglia di patologie, circa 50, dovute a diversi tipi di difetti genetici, accomunate dalla caratteristica di determinare un accumulo di metaboliti o sostanze tossiche nei lisosomi (organuli deputati alla degradazione e al riciclo dei materiali di scarto prodotti dal metabolismo cellulare) con conseguente perdita di funzionalità cellulare e danno d'organo. L'incidenza di ciascuna patologia, presa singolarmente, è inferiore a 1:100.000; complessivamente, però, questo gruppo di malattie ha un'incidenza di 1:5000 - 1:10.000 nati vivi.

Queste patologie hanno per lo più un esordio infantile che va da pochi mesi a pochi anni dalla nascita. Molti bambini affetti muoiono dopo pochi anni dalla presentazione della sintomatologia, con sintomi ingravescenti e spesso devastanti. I sintomi delle varie patologie variano tra loro a seconda dello specifico disturbo, e di variabili come l'età di insorgenza; la gravità delle manifestazioni è variabile. Fra i segni clinici più comuni vi sono ritardo dello sviluppo, disturbi del movimento, convulsioni, demenza, sordità e/o cecità. In alcune persone affette si riscontrano inoltre un aumento delle dimensioni del fegato e della milza, problemi polmonari e cardiaci, e un anormale sviluppo delle ossa.

Al momento non esiste una terapia risolutiva per il trattamento della maggior parte di queste patologie; sono disponibili alcune opzioni terapeutiche sperimentali tra le quali la terapia enzimatica sostitutiva, efficace solo per le forme in cui il sistema nervoso centrale non è colpito dai sintomi, il trapianto di midollo da donatore sano, con efficacia spesso solo parziale ed elevate morbilità e mortalità, e la terapia genica.

Sulla base di promettenti dati preclinici, nell'aprile del 2010 ha preso il via presso l'Istituto San Raffaele Telethon di Milano (TIGET) una sperimentazione clinica di terapia genica con cellule staminali ematopoietiche (deputate cioè a produrre le cellule del sangue) su pazienti affetti da una grave malattia lisosomiale nota come Leucodistrofia Metacromatica, caratterizzata da un danno ingravescente e rapidamente progressivo a carico del sistema nervoso (cervello e nervi periferici) dei piccoli pazienti. I bambini vengono sottoposti al trattamento quando ancora asintomatici o all'esordio delle manifestazioni cliniche. La procedura terapeutica consiste nel prelievo dal midollo osseo dei piccoli delle cellule staminali ematopoietiche e la loro correzione in laboratorio tramite un vettore derivato dal virus HIV contenente la versione normale del gene *ARSA* (responsabile della malattia quando mutato). Così corrette, queste cellule staminali vengono restituite al paziente, in modo che possano attraverso il sangue "colonizzare" il sistema nervoso e distribuire l'enzima *ARSA* alle cellule nervose circostanti, che ne sono prive. I risultati ottenuti ad oggi sui primi pazienti trattati in fase pre-sintomatica sono incoraggianti: i piccoli non hanno mostrato una evoluzione sostanziale della malattia e sono liberi da sintomi invalidanti. I loro fratelli maggiori affetti dalla stessa malattia ma che non hanno potuto accedere alla cura, a quella stessa età, se ancora in vita, erano purtroppo in condizioni terminali. Il TIGET ha avviato un percorso volto a rendere questa cura accessibile a molti pazienti. Intanto, la ricerca va avanti e nel giro di un anno partirà una nuova sperimentazione clinica per la cura di un'altra malattia lisosomiale, la mucopolisaccaridosi di Tipo I.

## 8.7

### Cellule staminali della pelle in terapia cellulare e genica

Michele De Luca

Centro di Medicina Rigenerativa 'Stefano Ferrari', Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia

La Medicina Rigenerativa si occupa dello sviluppo di terapie innovative ed avanzate mirate alla ricostruzione di tessuti ed organi irrimediabilmente danneggiati. La integrità e la riparazione dei tessuti dipendono da una popolazione di cellule staminali adulte presente nei tessuti stessi ed in grado di autorinnovarsi (self-renewal). La Medicina Rigenerativa richiede quindi una profonda conoscenza della biologia delle cellule staminali e lo sviluppo di tecnologie che consentano il loro mantenimento in coltura e la loro applicazione clinica (terapia cellulare). Nel caso di malattie genetiche, le cellule staminali richiedono la correzione del difetto genetico prima della loro applicazione clinica (terapia genica).

Le cellule staminali, essenziali in quei tessuti soggetti a rinnovamento rapido e costante, generano una popolazione di cellule che proliferano in maniera transiente (cellule TA o progenitori), che generano a loro volta cellule terminalmente differenziate. Negli epitelii stratificati umani sono stati identificati e isolati tre tipi di cheratinociti con differente capacità proliferativa: olocloni, merocloni e paracloni. Gli olocloni sono generati dalle cellule staminali e sono stati studiati e caratterizzati con marcatori molecolari. Nel corso degli ultimi anni, la conoscenza della biologia degli olocloni ha consentito la loro applicazione in clinica, sia in terapia cellulare sia in sperimentazioni di terapia genica.

L'impiego in clinica delle cellule staminali degli epitelii di rivestimento è quindi una realtà terapeutica, elemento significativo se si pensa che la maggior parte dei trattamenti basati sull'impiego di cellule staminali è, nelle situazioni più avanzate, in fase di sperimentazione clinica e, ben più spesso, in fase pre-clinica.

In particolare, le prime cellule staminali epidermiche autologhe coltivate in vitro furono applicate negli anni Ottanta nella terapia salva-vita delle grandi ustioni. A questa pionieristica applicazione seguirono poi i nostri studi clinici, oltre che per le ustioni di terzo grado, per la repigmentazione della vitiligine stabile e del piebaldismo e per la rigenerazione dell'uretra in pazienti con ipospadia posteriore e oggi le cellule staminali dell'epitelio corneale, di cui parlerà in modo più approfondito Graziella Pellegrini, sono routinariamente utilizzate per la terapia cellulare mirata alla rigenerazione della superficie oculare e al recupero della capacità visiva in pazienti non altrimenti curabili.

Le cellule staminali epidermiche sono state utilizzate con successo anche per la prima sperimentazione clinica di terapia genica nella forma giunzionale della Epidermolisi Bollosa (EB). Il termine indica un gruppo di difetti genetici di adesione caratterizzati da un'estrema fragilità degli epitelii di rivestimento, tra cui pelle e mucose, che sono soggetti alla formazione di bolle e lesioni che costringono i pazienti a lunghe e dolorose medicazioni quotidiane.

Nel 2006, la nostra équipe ha pubblicato su *Nature Medicine* una prova di principio della fattibilità della terapia genica ex-vivo per la forma Laminina 5-



dipendente dell'Epidermolisi Bollosa Giunzionale (JEB) mediante trapianto autologo di lembi di pelle ottenuti da cellule staminali epidermiche geneticamente corrette.

Tale sperimentazione clinica dimostra che la terapie genica ex-vivo della JEB è fattibile e consente la piena correzione funzionale della malattia anche a lungo termine: abbiamo infatti recentemente pubblicato uno studio su Stem Cell Reports che riporta i dati di sette anni si follow-up sul paziente trattato.

Grazie a numerose collaborazioni internazionali avviate in questi anni, stiamo ora lavorando su nuovi vettori virali per la terapia genica di altre forme di EB, come la Giunzionale Collagene 17-dipendente e la distrofica.

## **8.8**

### **Ricostruzione della cornea da cellule staminali: esempio di adeguamento alle nuove normative sulle terapie avanzate**

Graziella Pellegrini

Centro di Medicina Rigenerativa 'Stefano Ferrari', Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia

Recenti scoperte nell'ambito della medicina rigenerativa hanno generato entusiasmo e molti sforzi volti a esplorare nuove potenzialità terapeutiche nel campo delle cellule staminali sia somatiche che pluripotenti.

Sono trascorsi circa 30 anni dalla scoperta di un metodo di produzione di un numero rilevante di cheratinociti epidermici umani attraverso la coltura di una piccola biopsia di pelle; oggi si configurano molteplici possibilità di applicazione terapeutica di diversi tipi di cellule coltivate.

L'importanza delle cellule staminali è stata dimostrata per molteplici tessuti ed organi in svariate patologie.

Le ustioni oculari comportano una deplezione delle cellule staminali limbari, con conseguenze quali opacizzazione della cornea e perdita della vista.

La maggior parte dei trattamenti disponibili risultando palliativi e miranti per lo più ad alleviare un quadro clinico devastante. I recenti sviluppi intervenuti nell'ambito della terapia cellulare per il trattamento del deficit di cellule staminali limbari possono fornire un valido supporto nell'ottica del miglioramento e la standardizzazione della cura di questa malattia invalidante.

## 8.9 Le sfide culturali della medicina rigenerativa

Gilberto Corbellini  
Dipartimento di Medicina Molecolare, Sapienza Università di Roma

Quali sono i fattori che influenzano la percezione e i giudizi sociali relativamente alla ricerca sulle staminali e alla medicina rigenerativa? In che misura questi fattori concorrono a costruire le attese, troppo spesso eccessive, e quindi anche le opportunità/rischi di abusi ai danni dei pazienti e dei sistemi sanitari? Quali strategie si potrebbero adottare per prevenire gli inconvenienti di diversa natura che per il momento stanno caratterizzando l'uso delle cellule staminali e più in generale gli sviluppi della medicina rigenerativa?

L'innovazione in medicina è normalmente un processo lento, che deve seguire le strade consentite dalle conoscenze e tecnologie disponibili, nonché le forme e i modi ammessi dalle norme etiche e dalle leggi che in un dato periodo governano la sperimentazione e l'uso dei trattamenti. Di conseguenza l'innovazione non può o non dovrebbe percorrere scorciatoie, che di fatto non esistono, allo scopo di rispondere o cavalcare domande di cure o di salute imposte direttamente dalle malattie e dai problemi sanitari. Anche perché, da quando la medicina è diventata scientifica, ciò ha sempre avuto conseguenze negative sull'affidabilità della ricerca e della pratica medica nell'insieme.

Purtroppo le cellule staminali e la medicina rigenerativa sono uno degli esempi più eclatanti del fenomeno chiamato da Timothy Caulfield "sciencexploitation", cioè di uso strumentale dell'aura allo stesso tempo di eccellenza scientifica e di proprietà taumaturgiche di cui sono circondate talune tecnologie di frontiera; in altre parole il fenomeno include l'abuso della vulnerabilità e credulità che colpisce le persone in difficoltà per malattie. Il meccanismo di funzionamento della *sciencexploitation* prevede che la scienza o almeno quel che si crede sia lo stato della scienza venga usato in chiave retorica o propagandistica per far passare pratiche che con la scienza non hanno niente a che fare, ma che funzionano soprattutto attraverso bias cognitivi e ricatti emotivi. L'espansione mondiale del turismo da staminali, i casi Stamina-like, ma anche le pressioni politiche ed economiche per sottrarre il controllo delle terapie cellulari alle agenzie regolatorie per i farmaci fanno parte di un complesso gioco che tenta di piegare la scienza e i fatti a logiche che sono estranee ai metodi di controllo oggettivi o che introducono fattori confondenti.

Cosa si può fare per evitare i danni prodotti dal fenomeno della *sciencexploitation* in generale, e per quanto riguarda lo studio e l'uso clinico delle staminali in particolare? Probabilmente il problema non sarà ridotto o contenuto lavorando solo sulla comunicazione o l'educazione sanitaria. Ci sono prove solide del fatto che va potenziata l'istruzione scolastica per garantire l'acquisizione di concetti chiave ben definiti, utili a capire i limiti e le potenzialità autentiche della ricerca di base e i metodi di valutazione e controllo validabili intersoggettivamente.

## 8.10

### **Prodotti Medicinali per Terapie Avanzate: quali regole tutelano i pazienti?**

Luca Pani  
Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA)

Con l'entrata in vigore del Regolamento (CE) 1394/2007, i prodotti di terapia genica, terapia cellulare somatica e ingegneria tissutale - le cosiddette terapie avanzate - sono classificati a tutti gli effetti come medicinali e, come tali, i requisiti di qualità, di sicurezza e di efficacia, a tutela del paziente, devono essere garantiti al pari di ogni altro medicinale immesso in commercio.

Poiché cellule e tessuti possono anche essere utilizzati come trapianti, il Parlamento Europeo e il Consiglio, con il citato Regolamento, hanno chiaramente definito le caratteristiche in base alle quali distinguere queste due tipologie di prodotti, classificandoli come trapianti o come medicinali.

I prodotti medicinali cellulari o genici per terapie avanzate pur potendo seguire, in alcuni casi, le fasi di donazione, approvvigionamento e controllo previsti dalla Direttiva 2004/23/CE per i trapianti, nel momento in cui le cellule vengono "estesamente lavorate in vitro" (quindi manipolate, espanse, ingegnerizzate) esse vengono assoggettati alla normativa sui medicinali sotto la regolamentazione dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA).

I prodotti biologici possono essere classificati come trapianti o come medicinali per terapie avanzate a seconda del grado di manipolazione e/o della tipologia di utilizzo (uso omologo o eterologo). In base a tale classificazione le due diverse tipologie di prodotti seguono irreversibilmente percorsi normativi distinti; ove tale distinzione dovesse risultare di complessa valutazione, il Regolamento (CE) 1394/2007 prevede la possibilità di ricorrere al Committee for Advanced Therapies (CAT), istituito in seno all'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA), per un parere preventivo sulla classificazione prima del loro impiego.

Specificatamente per i medicinali per terapie avanzate (quindi cellule o geni che hanno subito estensive fasi di lavorazione in laboratorio), le successive fasi di produzione, controllo di qualità, conservazione, stoccaggio e distribuzione assumono una valenza critica sia per la qualità che per la sicurezza del prodotto, richiedendo una rigorosa osservanza delle regole stabilite per tutti i medicinali e definite nelle Norme di Buona Fabbricazione Europee (European Good Manufacturing Practice - EU GMP), pubblicate nel Volume 4 di Eudralex. In Italia risultano attualmente operative 12 strutture, in cui vengono prodotti medicinali per terapie avanzate, che sono state autorizzate dall'AIFA a fronte di una verifica sia documentale che ispettiva e la cui compliance alle GMP viene costantemente monitorata attraverso visite ispettive su base periodica.

L'utilizzo delle cellule staminali come medicinali per terapie avanzate viene regolamentato, in Italia, a seconda dei casi, dal DM 8 maggio 2003, qualora siano disponibili dati di sperimentazione clinica, e dal DM 5 dicembre 2006 qualora, pur in assenza di alcun dato di sperimentazione clinica, si ravvisino casi di urgenza ed emergenza che pongano il paziente in pericolo di grave danno alla

salute o in pericolo di vita, vi siano pubblicazioni scientifiche in merito oltre ad una serie ulteriore di requisiti essenziali. Questo è il complesso, ma chiaro, panorama attuale in cui l'AIFA esercita le proprie competenze regolatorie sul farmaco, a tutela della salute pubblica.

Le applicazioni delle cellule staminali in medicina rigenerativa  
III incontro del ciclo "Scienza, Innovazione e Salute"  
Roma, 15 aprile 2014 – Sala Zuccari – Palazzo Giustiniani – Senato della Repubblica  
Materiali a cura dell'ufficio della Sen. Prof. Elena Cattaneo



















Fascicolo realizzato e stampato  
dalla Senatrice Professoressa Elena Cattaneo, direttrice di UniStem,  
Centro di Ricerca sulle Cellule Staminali,  
Università degli Studi di Milano  
Realizzazione grafica ad opera di Gianni Munizza,  
Università degli Studi di Milano