

28 dicembre 2000 16:34

ITALIA: Relazione della commissione di studio sull'utilizzo di cellule staminali per finalita' terapeutiche (prima parte) - 28 Dicembre 2000

Questa relazione è il risultato dei lavori della Commissione ministeriale sull'utilizzazione delle cellule staminali, al fine di esaminare le problematiche relative all'uso di cellule staminali a scopi terapeutici e di chiarire il reale potenziale di sviluppo e di applicabilità di questo settore della ricerca in Italia.

La Commissione si è insediata il 20 settembre 2000, alla presenza del Ministro, professor Umberto Veronesi, come da Decreto Ministeriale del 6 settembre 2000. La Commissione si è successivamente riunita nelle date del 13 ottobre e del 14 e 19 dicembre, sotto la direzione del Presidente, professor Renato Dulbecco, per rispondere in modo articolato alle domande presentate sul tema dal Ministro della Sanità. L'atto conclusivo dei lavori della Commissione avrà luogo il 28 dicembre 2000 con la presentazione del documento finale in un incontro tra la Commissione riunita ed il Ministro.

Il presente documento è diviso in tre parti che rispecchiano il lavoro svolto dalla commissione stessa:

Cap. 1 - Relazione della sottocommissione tecnica, che ha affrontato gli aspetti scientifici del tema

1a - Prefazione

1b - Definizioni ed elementi tecnici

1c - Diversi tipi di cellule staminali

1d - Trasferimento nucleare per produrre cellule staminali autologhe (TNSA)

1e - Applicazioni terapeutiche attuali delle cellule staminali

1f - Prospettive terapeutiche potenziali

1g - Conclusioni sugli aspetti scientifici

Cap. 2 - I quesiti etici emersi dal lavoro della sottocommissione tecnica

Cap. 3 - Dibattito sugli aspetti etici

Cap. 4 - Raccomandazioni

Nel suo insieme la relazione è organizzata per dare risposte concrete alle domande poste dal Ministro della Sanità sul tema. Va sottolineato che tutte le tematiche hanno avuto un'ampia discussione collettiva e che il lavoro delle sottocommissioni è stato sistematicamente rivisto dalla Commissione nel suo insieme.

Capitolo 1

RELAZIONE DELLA SOTTOCOMMISSIONE TECNICA

Questa relazione viene stilata su richiesta del Ministro della Sanità, professor Umberto Veronesi, al fine di esaminare le problematiche relative all'utilizzo di cellule staminali ai fini terapeutici e di chiarire il reale potenziale di sviluppo e di applicabilità di questo settore della ricerca in Italia.

1A PRAFAZIONE

La distruzione dell'architettura tissutale di un organo, legata alla morte delle cellule che lo costituiscono, è alla base della maggioranza delle patologie che affliggono la popolazione dei paesi industrializzati. Un approccio terapeutico risolutivo mira alla ricostruzione del tessuto alterato tramite trapianto di nuove cellule che possano sostituire quelle distrutte o alterate dalla malattia. A livello clinico questa strategia terapeutica si fonda nella maggior parte dei casi sul trapianto di organi da donatore cadaverico, o più raramente da donatore vivente. Purtroppo, questa tecnologia salvavita ha due limiti fondamentali che ne precludono l'estensione alla maggior parte dei pazienti che potrebbero beneficiarne. Questi limiti sono rappresentati dalla scarsità di organi da trapiantare e dalla necessità di immunosoppressione cronica per prevenire il rigetto dell'organo.

Le cellule staminali, siano esse embrionali, fetali, da cordone ombelicale o adulte rappresentano un'importante prospettiva per la rigenerazione di organi danneggiati. Infatti, la possibilità di espandere in vitro queste cellule fino a quantità elevatissime, se non proprio illimitate, risolverebbe il problema legato alla disponibilità di materiale biologico da utilizzare in fase di trapianto. Quanto al problema della compatibilità con il sistema immune del ricevente, soltanto cellule staminali derivate dal paziente stesso risolverebbero completamente anche questo problema.

Mentre questo è possibile nel caso degli epitelii, in altri casi l'organo affetto potrebbe contenere cellule staminali già compromesse dalla patologia in atto o addirittura non possedere alcuna cellula staminale (ad esempio, non esistono, al momento, solide evidenze che il tessuto cardiaco e quello pancreatico contengano cellule staminali).

In questi casi si rende necessario esplorare tutte le possibili alternative sperimentali teoricamente e praticamente perseguibili quali la trans-determinazione di cellule staminali di diversi tessuti - grazie alla quale cellule di un tessuto possono venire "riconvertite" in cellule di un altro tessuto, anche di diversa origine embriologica - o l'uso di cellule totipotenti staminali embrionali, a partire dal nucleo di cellule somatiche del paziente trasferite in una cellula uovo enucleata.

La notizia riguardante la liberalizzazione dell'utilizzo di cellule staminali embrionali umane per finalità sperimentali e terapeutiche da parte dei governi inglese ed americano ha attratto l'attenzione dei media e ha generato numerose discussioni e polemiche che hanno portato a confondere il concetto di clonazione, anche terapeutica, con quello di cellula staminale in generale. Questi concetti sono quindi chiariti in modo sintetico qui di seguito.

1B DEFINIZIONI ED ELEMENTI TECNICI

Al fine di chiarire la sostanziale differenza tra clonazione, clonazione terapeutica e cellule staminali è necessario introdurre alcuni concetti fondamentali.

- **Clone (cellulare):** una popolazione di cellule che derivano da una singola cellula per duplicazione cellulare.
- **Clonazione cellulare:** è la produzione di un clone cellulare.
- **Clonazione di un organismo:** produzione di un nuovo organismo, geneticamente identico all'organismo donatore della cellula impiegata per la clonazione, in assenza della fusione dei gameti. Nel caso delle

piante questo avviene spesso spontaneamente. Negli organismi superiori che utilizzano la riproduzione sessuale (come nei mammiferi) questo avviene spontaneamente solo nel caso di una divisione embrionale spontanea, che porta alla formazione di gemelli monozigoti (geneticamente identici).

- **Clonazione sperimentale di un organismo superiore:** la clonazione di un organismo superiore si può ottenere separando l'una dall'altra singole cellule derivate da un embrione a stadi di sviluppo precoci (e cioè fino a 8 cellule) le quali, da sole, sono poi in grado di formare un intero nuovo organismo. Da notare che non è necessario "avviare una vita e poi terminarla" per perseguire questo approccio, dal momento che tali cellule potrebbero, in principio, essere prelevate dall'embrione senza, di fatto, danneggiarlo. La tecnica attualmente più in uso per la clonazione di mammiferi si basa sul trasferimento del nucleo da cellule somatiche in un oocita enucleato. Questa tecnica può essere applicata sia per scopi riproduttivi (generazione di un organismo adulto clonato), sia per ottenere cellule staminali embrionali autologhe attraverso la generazione di un organismo clonato allo stadio embrionale. E' però anche possibile ottenere, con un approccio simile, cellule totipotenti senza passare attraverso lo stadio embrionale. Nonostante l'impropria definizione di "clonazione terapeutica" utilizzata in questo contesto nel rapporto Donaldson, questo procedimento ha come fine la produzione di cellule e tessuti somatici con un genoma nucleare identico a quello del donatore, ma non corrisponde automaticamente alla formazione dell'embrione, potendosi interrompere molto prima, per la sola riderivazione di linee cellulari. Per una trattazione più dettagliata si veda il paragrafo 1D: "**Trasferimento nucleare per la produzione di cellule staminali autologhe (TNSA)**".
- **Cellula staminale:** le cellule staminali sono cellule non specializzate in grado di dividersi dando origine contemporaneamente ad una cellula staminale (uguale alla cellula madre) ed una cellula precursore di una progenie cellulare che alla fine darà a sua volta origine a cellule terminalmente differenziate (mature). Si definiscono totipotenti le cellule staminali che possono dar luogo a tutti i tessuti, multi (o pluri) potenti quelle che possono dar luogo ad alcuni tipi cellulari o tessuti ed unipotenti, quelle che possono dar luogo soltanto ad un tipo cellulare.

1C DIVERSI TIPI DI CELLULE STAMINALI

- **Cellule staminali fetali**

Le cellule staminali fetali sono derivate da aborti. Si tratta pertanto di materiale cadaverico ed il suo utilizzo equivale all'utilizzo di organi da cadaveri. Dal punto di vista biologico, le cellule staminali fetali possiedono caratteristiche intermedie tra quelle embrionali e quelle adulte. Sono generalmente pluripotenti e deputate all'accrescimento peri-natale dei tessuti. I pochi studi finora disponibili non permettono di trarre conclusioni definitive sulle loro capacità di crescita, differenziamento ed integrazione funzionale nei vari tessuti. Si rendono pertanto necessari studi addizionali finalizzati a chiarire le potenzialità proliferative e differenziative di queste cellule.

- **Cellule staminali embrionali eterologhe**

Le cellule staminali embrionali (ES) derivano dalla regione interna dell'embrione (embrioblasto o inner cell mass) prima del suo impianto nella parete dell'utero. Dotate di elevata capacità proliferativa, le cellule ES sono in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari presenti nell'organismo e per questo potenzialmente utili per la terapia delle patologie umane. Queste cellule possono essere isolate da blastocisti e cresciute *in vitro* con particolari e costose metodiche che ne mantengono inalterate le proprietà di plasticità e totipotenza per periodi di alcuni anni (Evans e Kaufman, *Nature* 292: 154-6, 1981).

Ciò consente, a partire da poche decine di cellule, di ottenerne centinaia di milioni con le stesse caratteristiche e potenzialità iniziali. Quando aggregate con un embrione precoce possono

integrarsi nell'embrione e successivamente crescere e differenziarsi in tutti i tipi cellulari del nuovo organismo senza causare nessun disturbo alla crescita e sviluppo di quest'ultimo. In più, sono stati messi a punto particolari metodiche "in vitro" che guidano il differenziamento delle cellule ES in specifici tipi cellulari per generare, ad esempio, una grande quantità di neuroni (Okabe et al., *Mech Dev* 59:1 89-102, 1996), cellule della glia (Brustle et al., *Science* 285: 754-756, 1999), cardiomiociti e progenitori ematopoietici (Keller e Snodgrass, *Nat Med* 2 151-2, 1999).

Recentemente, sono state isolate cellule staminali umane a partire da precocissimi embrioni (non più necessari per gli scopi terapeutici prefissati) ottenuti con tecniche di IVF e donati da individui informati e consenzienti (Thomson et al., *Science* 282 1145-7, 1998). Dai primi risultati pubblicati nella letteratura scientifica internazionale, possiamo arguire che queste cellule embrionali staminali (ES) umane dovrebbero comportarsi "in vitro e in vivo" come quelle murine, possedendo una elevatissima plasticità e flessibilità nel generare qualsiasi tipo di cellula matura (Schuldiner et al., *Pnas* 97, 11307-11312, 2000).

Cellule staminali embrionali possono quindi essere prodotte con questa finalità da embrioni congelati, prodotti in eccesso rispetto alle necessità della fecondazione in vitro. In Gran Bretagna il loro numero è di varie decine di migliaia. In Italia non esiste un registro di questi embrioni e di conseguenza se ne ignora il numero esatto ma è plausibile che il numero sia comunque elevato. In pratica esiste una enorme sproporzione tra l'abbondanza di embrioni prodotti e l'assenza di soggetti interessati ad impiantarli nel proprio utero.

Esiste poi un problema biologico importantissimo e totalmente inesplorato: la durata di vitalità di questi embrioni. Nei roditori il congelamento di cellule e di embrioni ne riduce, col tempo la vitalità. Il che significa che dopo un certo numero d'anni, solo una piccola percentuale di embrioni congelati riprende lo sviluppo embrionale con un rischio elevato di aborti e malformazioni. Nell'uomo queste informazioni mancano ma è presumibile che il fenomeno sia generale per i mammiferi.

In ogni caso, cellule ES, così ottenibili in grande numero potrebbero essere particolarmente utili per poter studiare i meccanismi che ne regolano proliferazione e differenziamento in vari tessuti, permettendo quindi di ottenere una conoscenza preziosa. Infine, va considerato un loro diretto impiego terapeutico in quelle forme di terapia in utero o peri-natale dove il sistema immunitario del paziente "imparerebbe" a riconoscere come proprie le cellule trapiantate (tolleranza).

In alternativa all'utilizzo di embrioni sovrannumerari, esiste la possibilità eventuale di isolare cellule embrionali in modo da non provocare la soppressione dell'embrione. Questo sarebbe ottenibile mediante un prelievo selettivo di un numero limitato di cellule ES a stadi precoci di sviluppo quali quello di morula e di blastocisti che, quindi, non implicherebbe la distruzione dell'embrione medesimo. Sebbene ciò sia tecnicamente fattibile, grazie a metodiche di prelievo standardizzate, mutuata dalla diagnostica preimpianto in tecniche IVF, alcune considerazioni di natura tecnica sono d'obbligo. Mentre non si può escludere che in un numero limitato di casi la morula-blastocisti potrebbe non mantenere intatto il proprio potenziale di sviluppo post-prelievo, il problema saliente è rappresentato dalla difficoltà di espandere in coltura il numero limitato di cellule ottenibili dal prelievo, in modo da ottenere la quantità di cellule necessaria per applicazioni terapeutiche. Questa difficoltà sembrerebbe attualmente superata dai risultati ottenuti da Michael Amit e coll. (*Dev.Biol.* 327, 271-278) che hanno recentemente dimostrato la stabilità fenotipica e genotipica di cellule ES umane clonate in vitro per un periodo di otto mesi di coltura. Queste linee ottenute da singole cellule mantengono la capacità replicativa e la pluripotenza a lungo termine, senza modificazioni del cariotipo e dei telomeri.

Quest'ultimo è un punto critico poiché, mentre la stabilità funzionale e fenotipica è prerogativa assoluta della cellula staminale "bona fide" (Potten and Loeffler, *Development* 1990, 110, pp 1001-1020.), non è altrettanto certo che il prelievo permetta di isolare "vere" cellule ES ad ogni

tentativo. Infatti, l'organismo nel suo complesso deriva da sole 3-4 delle circa 100 cellule che compongono la blastocisti (vedi: "Clonal expression in allophenic mice". *Symp. Int. Soc. Cell Biol.* 9:15, 1970 e C.L. Markert e R.M Petters *Science*, 1978, 202:56,) e non è chiaro se questa minoranza di cellule è pre-costituita o se tutte le cellule della blastocisti posseggono un uguale potenziale.

Infine, va ricordato che linee stabili di cellule ES si sviluppano solo dall'epiblasto delle blastocisti (F.A. Brook e R.L. Gardner, *Pnas*, 94:5709-5712, 1997) e che il corredo cromosomico delle cellule prelevate non è necessariamente sempre identico a quello della rimanente morula-blastocisti. Va sottolineato che le colture di cellule ES umane finora prodotte sono state ottenute a partire da cellule isolate mediante immunochirurgia dalla massa cellulare interna della blastocisti umana (rappresentante lo stadio dell'embrione umano corrispondente a circa il 5° giorno di sviluppo): tale tecnica di prelievo ha finora comportato la distruzione della blastocisti (Reubinoff et al, *Nature Biotechnology* 18:399-404, 2000). Risulta quindi evidente come questo approccio rappresenti una linea di ricerca che lascia impregiudicato l'aspetto etico relativo all'impiego di morule-blastocisti crioconservate.

Esiste infine, un tipo particolare di cellule staminali embrionali, le cellule germinali primordiali, ottenute dalle gonadi di feti abortivi, e fatte trasformare "in vitro" in cellule EG (Shamblott et al, *Proc Natl Acad Sci USA* .95:13726-31, 1998). Al momento le cellule EG sembrano essere meno adatte delle cellule ES per un uso clinico, per problemi di imprinting genetico (Tada et al, *Dev Genes Evol* 207: 551-61, 1998). Va tenuto presente, su questo punto specifico, che le cellule ES, nel loro stato indifferenziato, se iniettate per sé o come contaminante di cellule preventivamente sottoposte a procedure di differenziamento, possono dare origine a teratocarcinomi in vivo. Si rende quindi necessario uno studio approfondito degli elementi di sicurezza associati alla procedura di trapianto di cellule staminali differenziate in vitro ed all'identificazione di una, anche minima, residua presenza di cellule ES indifferenziate.

- **Cellule staminali da cordone ombelicale**

Le cellule staminali del cordone ombelicale hanno suscitato grande interesse, soprattutto negli USA, data la possibilità di creare una banca di cellule autologhe per ogni neonato all'atto della nascita (Fasouliotis & Schenker *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000, 90:13-25, 2000). Queste cellule potrebbero in seguito essere utilizzate, anche dopo decenni, per curare patologie insorte nella vita adulta. Si tratta al momento di un'applicazione meramente commerciale, dato il grande sforzo organizzativo ed economico che tale iniziativa comporterebbe, a fronte di ricadute modeste sulla popolazione nel suo complesso.

Sebbene cellule di varia natura, ma tutte derivate da cordone ombelicale, possano venire impiegate per il trattamento di numerose patologie umane, ad oggi le cellule staminali ombelicali "bona fide" sono state considerate capaci di dare origine soltanto a cellule del sangue. Questo ne fa un importante elemento di trattamento di patologie ematologiche nel contesto del trapianto allogenico. La loro potenziale capacità di dare origine ad altri tessuti è fino ad oggi, in gran parte, inesplorata.

- **Cellule staminali adulte**

Le cellule staminali adulte provvedono al mantenimento dei tessuti in condizioni fisiologiche ed alla loro riparazione in seguito a un danno; questa capacità riparativa non è illimitata a giudicare

dalle patologie che compromettono la funzione degli organi, nonostante il tentativo di rigenerazione. Tali cellule erano fino a pochi anni fa considerate tessuto-specifiche poiché si riteneva che fossero specializzate nel generare cellule mature tipiche del tessuto in cui risiedono. In realtà studi recenti hanno mostrato un'inattesa plasticità di delle cellule staminali adulte. Il caso più emblematico è rappresentato dal transdifferenziamento di cellule staminali neurali adulte in cellule mesodermiche ematopoietiche (Bjornson CR et al, *Science* 283:534-7, 1999). Tale "salto" differenziativo tra cellule di foglietti embrionali diversi si osserva con cellule staminali di adulto sia inserite in tessuti embrionali, sia in tessuti adulti (Taylor G et al, *Cell* 102:451-61, 2000, Clarke DL et al, *Science* 288:1660-3, 2000, Galli et al., *Nat. Neurosci*, 3, 986-91, 2000) e riguarda anche le cellule del midollo osseo che possono dare origine a muscolo (Ferrari et al., *Science*, 1998) ed a cellule epatiche (Petersen et al., 1999, 2000), e cellule muscolari che possono colonizzare il sistema ematopoietico (Gussoni et al., *Nature* 1999). Sulla base di quanto appena descritto, si possono trarre alcune considerazioni essenziali sul possibile utilizzo di cellule staminali adulte tessuto specifiche nell' ambito terapeutico.

Primo, tali cellule esistono anche in organismi adulti, ma il loro isolamento e la loro coltivazione estensiva, eccezion fatta per le cellule staminali cutanee e mesenchimali, sono al momento limitati ai roditori. Si rendono quindi necessari forti investimenti nel campo delle cellule umane ematopoietiche, neurali, muscolari, e mesodermiche in generale.

Secondo, il problema dell'utilizzo clinico di tali cellule è strettamente legato alla possibilità pratica di espanderle "in vitro" in modo efficiente. Ad oggi questo è estremamente difficile ed, in concomitanza con possibili fenomeni di senescenza ipotizzabili in queste cellule, potrebbe rappresentare un limite all'effettiva fattibilità di questo approccio. Infatti, tentativi terapeutici con cellule staminali adulte hanno in alcuni casi (es: trapianto di midollo osseo in topi affetti da distrofia muscolare) ottenuto risultati modesti dal punto di vista dell'efficacia clinica (Gussoni et al., *Nature* 1999).

Terzo, ma non ultimo, è possibile che la specificità delle cellule staminali adulte per il proprio tessuto di appartenenza non sia così stringente, ma che sia immaginabile un approccio terapeutico tramite il quale cellule di un tessuto, per esempio la cute, possano venire coltivate ed istruite a produrre cellule di un altro organo, per esempio il cervello, al fine di rendere possibile la ricostruzione tissutale cellulo-mediata di tipo autologo.

1D TRASFERIMENTO NUCLEARE (TNSA)

In questo caso le cellule ES sono isolate da cellule dell'embrioblasto derivato dal trasferimento del nucleo di una cellula somatica adulta del paziente in una cellula uovo enucleata. Queste cellule ES posseggono quindi lo stesso genoma nucleare dell'individuo donatore della cellula somatica il quale, quindi, non le rigetterebbe qualora queste cellule ES clonate venissero trapiantate, dopo differenziamento, in un suo organo. Da queste considerazioni emerge come questo procedimento avrebbe l'enorme vantaggio di stabilire cellule ES immunologicamente compatibili per autotrapianto. Nel caso di malattie genetiche, queste cellule potrebbero essere geneticamente 'curate' in vitro prima del trapianto. Nell'esaminare le tecniche di derivazione di cellule ES autologhe assumiamo quale scopo finale esclusivo quello di sviluppare metodologie per l'ottenimento di cellule per il trattamento di pazienti. In breve, si tratta di riprogrammare il nucleo di cellule somatiche prelevate dal paziente, tramite il contatto con il citoplasma di un oocita.

Nella pubblicistica contemporanea questa procedura è stata chiamata clonazione terapeutica, un termine, di fatto, chiaramente opinabile. Infatti, un oocita ricostituito con il nucleo di una cellula somatica adulta non può considerarsi uno zigote in senso classico, in quanto non deriva dall'unione di due gameti. A riprova di ciò sta il fatto che l'oocita così ricostituito non dà spontaneamente luogo allo sviluppo embrionale, poiché ciò può avvenire solo grazie a stimolazioni artificiali che lo forzano a svilupparsi in blastocisti. Solo poche tra queste blastocisti hanno l'effettiva

capacità di formare un embrione e quindi un feto se trasferite in utero.

Si noti, che l'ocita ricostituito può, invece, essere indotto a proliferare ed incanalarsi verso la formazione delle sfere embrioidi (non di blastocisti) la cui differenziazione può essere indirizzata verso specifici stipiti cellulari.

Quindi, in ultima analisi, l'ocita ricostituito con il nucleo di una cellula somatica del paziente è assai più simile ad una potenziale forma di espansione cellulare (per via asessuata) del paziente stesso, analoga a quella già oggi praticata quando prelievi biotipici di derma vengono amplificati per la produzione di 'cute artificiale', tecnica preziosa nella terapia dei grandi ustionati.

Infatti, il processo per cui il nucleo di una cellula somatica, trovandosi nel citoplasma dell'ocita, riacquista le capacità di cellula staminale non è molto dissimile da quelli che si attuano quando cellule normalmente quiescenti prelevate dal corpo di un paziente adulto vengono indotte a proliferare "in vitro" stimolandole con 'fattori di crescita'.

E' perciò prevedibile ed auspicabile che la attuale dipendenza dagli oociti di donna possa venire rimpiazzata da tecniche che prevedono l'impiego di estratti citoplasmatici di altre specie animali, o citoplasti prodotti artificialmente, così da poter effettuare in provetta la riprogrammazione genetica dei nuclei delle cellule somatiche. Prevenendo possibili pressioni sulla salute della donna (come ricordato dal recente documento europeo *Ethical aspects of human stem cell research and use*), tale approccio risulta particolarmente interessante.

1E APPLICAZIONI ATTUALI DELLE CELLULE STAMINALI

Una analisi critica della letteratura scientifica internazionale sulle cellule staminali porta a definire alcuni criteri utili alla nostra riflessione da cui emerge la grande potenzialità di sviluppo di terapie utili al trattamento di tutto un ampio ventaglio di patologie.

1. Trapianto di cellule ematopoietiche (trapianto di midollo)

- **Applicazioni terapeutiche del trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche.**

Il trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche consente la ripresa dell'emopoiesi dopo la somministrazione di dosi mieloablativi di chemioterapia e radioterapia. Di seguito si riportano, in tabella, le indicazioni cliniche tra i tumori solidi e le neoplasie ematologiche per le quali è riconosciuta un'indicazione a chemioterapia ad alte dosi con autotrapianto di cellule staminali ematopoietiche, accanto ad una proiezione dell'attività prevista per l'anno 2001 in Italia.

Tabella 1	
Carcinomi mammari	130
Neuroblastomi	20

Tumor general	15
Secoma di Esang	10
Melanoma	10
Carcinoma ovario	10
Adi canceri orali	20
Leitoma di Hodgkin	190
Lacoma fibrica ovica	30
Lacoma fibrica acica	70
Lacoma fibrica ovica	

	40
Leucemia mieloide acuta	300
Sindrome mielodisplastica	20
Mieloma multiplo	500
Leucemia non Haggan	650

La somministrazione di alte dosi di chemioterapia ad azione immunosoppressiva con successivo trapianto autologo di cellule staminali, è stata di recente valutata in pazienti affetti da malattie autoimmuni severe, con risultati favorevoli in malattie non responsive ai trattamenti con dosi convenzionali di farmaci immunosoppressori. In un recente Consensus Meeting Europeo (Basel, ottobre 2000), sulla base delle risposte favorevoli ottenute negli studi di fase I-II in più di 250 pazienti, sono stati definiti criteri clinici di arruolamento a protocolli internazionali randomizzati di fase III per pazienti con lupus eritematoso sistemico, sclerosi sistemica, sclerosi multipla, artrite reumatoide, vasculiti sistemiche, citopenia autoimmuni; in tali studi verrà confrontato l'impatto curativo di una profonda immunosoppressione rispetto a trattamenti convenzionali in queste malattie a rilevante incidenza nella popolazione giovane.

• **Applicazioni terapeutiche del trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche**

In aggiunta all'azione antitumorale della chemioterapia e radioterapia somministrate nel regime di condizionamento al trapianto, l'infusione di cellule staminali allogeniche offre il potenziale curativo dell'effetto immuno-mediato del sistema immunitario del donatore nei confronti della neoplasia del paziente (effetto del trapianto verso la leucemia, Graft versus Leukemia effect). Numerose osservazioni cliniche e sperimentali hanno consentito di attribuire il potenziale curativo del trapianto di cellule staminali allogeniche proprio all'azione antitumorale del sistema immune del donatore trapiantato nel paziente. Il riconoscimento del ruolo centrale esercitato dalla

componente immunologica nel contesto del trapianto allogenico, ha di recente consentito lo sviluppo di protocolli di radiochemioterapia a bassa intensità di dose, al fine di estendere a pazienti anziani, a pazienti con malattia avanzata e con tumori solidi, una procedura con un potenziale di cura significativamente superiore a terapie standard.

Di seguito, in tabella, si riportano le indicazioni cliniche tra le neoplasie ematologiche e i tumori solidi per le quali è riconosciuta un'indicazione a chemioterapia ad alte dosi con trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, accanto ad una proiezione dell'attività prevista per l'anno 2001 in Italia.

Tabella 2	
<small>Carcinomi renali</small>	25
<small>Carcinomi mammari</small>	20
<small>Altri tumori solidi</small>	30
<small>Linfomi di Hodgkin</small>	10
<small>Leucemia mieloide cronica</small>	10

Lacrima bianca acuta	200
Lacrima bianca cronica	150
Lacrima bianca acuta	400
Sindrome melastomatosa	50
Sindrome rubra	50
Arenaria splastica	20
Tillemann	110
Littera non Hoaglin	70
Sia respirata ematologica	30

- **Applicazioni terapeutiche del trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche prelevate da sangue di cordone ombelicale.**

In alternativa al midollo osseo e alle cellule staminali da sangue periferico, il sangue da cordone ombelicale prelevato alla nascita è attualmente utilizzato quale sorgente allogenica di cellule staminali ematopoietiche. Le cellule da cordone ombelicale offrono alcuni vantaggi teorici rispetto alle cellule da sangue midollare e periferico di adulto, in ragione della loro immaturità immunologica e dell'elevato potenziale di ripopolamento midollare e immunologico. Principale limitazione è la quantità limitata di cellule staminali presenti in un'unità di cordone, che condiziona l'estensione ad una popolazione adulta di alto peso corporeo. Il trapianto allogenico di cellule da cordone ombelicale ha conosciuto notevole espansione nel corso degli ultimi anni, raggiungendo una quota complessiva di circa 2.000 trapianti nel mondo. Le indicazioni cliniche sono sovrapponibili a quelle previste per il trapianto di cellule staminali da altre sorgenti.

2. Trapianto di cellule staminali cutanee (trapianto di epidermide)

Cellule staminali di epitelio autologo possono essere coltivate ed espanse "in vitro" (Jones and Watt, *Cell*, 73: 713-724) ed utilizzate per coprire permanentemente lesioni estese della cute e della mucosa (Pellegrini et al., *Transplantation*, 68: 868-79, 1999). Sebbene tale approccio venga oggi applicato a lesioni da bruciatura, da fistole diabetiche, o da epidermolisi bollosa (Dellambra et al., *Hum. Gen. Ther.* 9, 1359-70, 1998), l'utilizzo di questa tecnica è prevedibile in altri tipi di patologie cutanee quali terapia genica nelle neoplasie ed infezioni cutanee (Garlick and Fenjves, *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 7, 204-21, 1996) ed in mosaicismi somatici e funzionali.

Infatti, questa strategia terapeutica potrà essere utilizzata per trattare pazienti affetti da nevo epidermico con quadro istologico di ipercheratosi epidermolitica (OMIM 600648), che rappresenta la variante a mosaico dell'eritrodermia ittiosiforme congenita bollosa. Analogamente lo stesso protocollo si potrà applicare a pazienti affetti da piebaldismo (OMIM 172800), una malattia autosomica dominante che si manifesta con lesioni acromiche localizzate e presenti alla nascita, in cui non sono presenti melanociti.

1F PROSPETTIVE TERAPEUTICHE POTENZIALI

Oltre a questi tipi di trapianto, esistono numerose patologie che potranno venire curate utilizzando cellule staminali ES e/o tessuto specifiche. Alcuni esempi vengono discussi di seguito.

A - Rigenerazione di cellule e tessuti.

Come già discusso, la maggiore applicazione delle cellule staminali è quella di sostituire cellule o tessuti danneggiati o non funzionanti e quindi di essere potenzialmente efficaci in un contesto di terapia cellulare/tissutale sostituendo così il trapianto di organo da cadavere.

B - Terapia cellulare per:

- la ricostruzione del midollo spinale danneggiato da traumi fisici mirato a dare quindi una speranza ai tanti paraplegici. Per esempio, questa possibilità è già sperimentata nel ratto, dove è stata sfruttata la trasformazione dei precursori degli oligodendrociti in cellule che producono mielina nel midollo spinale);
- malattie degenerative del sistema nervoso (Alzheimer, morbo di Parkinson, malattia di Huntington, sclerosi laterale amiotrofica, malattie ecotossicologiche, post-traumatiche, da abuso farmacologico, da danno ischemico, ecc.);
- malattie muscolo-scheletriche (displasia ossea, malattie progressive delle giunzioni ossee, osteogenesis imperfecta, miopatie primitive);
- malattie infiammatorie di natura sistemica (sindrome di Sjögren), attraverso la sostituzione delle cellule delle ghiandole salivari atrofiche dei malati;
- malattie degenerative della retina, della cornea e dell'apparato uditivo, i cui tessuti sono stati danneggiati per cause genetiche o traumatiche;
- ricostituzione del tessuto cardiaco dopo un infarto acuto del miocardio e riparazione dei vasi sanguigni da processi patologici progressivi come l'arteriosclerosi e l'ipertensione;
- malattie metaboliche tipo lisosomiali, causate dal blocco di specifici sistemi catabolici e dal conseguente accumulo nei lisosomi delle sostanze non degradate.

C - Terapia genica

Le cellule staminali sono in grado di accettare e tollerare, molto meglio di cellule mature, geni introdotti dall'esterno con tecniche d'ingegneria genetica, mirate a correggere l'effetto patologico di geni difettosi o mutati mediante trasferimento genico; proprio per la loro capacità di trattenere stabilmente tali geni esogeni nel tempo, costituirebbero il substrato ideale per fungere da vettori cellulari per la terapia genica, consentendo quindi il superamento di alcune difficoltà tecniche, attualmente insormontabili, dovute alla perdita progressiva di espressione di geni esogeni inseriti a scopo terapeutico in tessuti di cellule adulte mature.

Un singolo trasferimento di gene in una cellula staminale renderebbe infatti disponibili cellule del sangue, della pelle, del fegato, e perfino del cervello "corrette". Quindi, le cellule staminali, embrionali o adulte, potrebbero rappresentare la soluzione ottimale in terapia genica proprio perché in grado di generare le cellule necessarie in quantità molto rilevanti.

1 G CONCLUSIONI SUGLI ASPETTI SCIENTIFICI

• L'impatto

E' possibile stimare, sebbene in via del tutto preliminare che, su un numero totale di soggetti affetti da patologie croniche di circa 30 milioni nel nostro Paese, l'utilizzo delle cellule staminali di varia origine possa portare a sviluppare metodiche cliniche per il trattamento di un numero di pazienti che, comprendendo le patologie di origine cardiovascolare, si avvicina ai 10 milioni di individui.

Le problematiche relative all'uso dei diversi tipi di cellule staminali (e le possibili differenze nella loro efficacia terapeutica), le ovvie conseguenze sulla qualità della vita sono talmente forti da influenzare pesantemente le attuali scelte strategiche di finanziamento pubblico della ricerca nella maggior parte dei paesi industrializzati. E' chiaro che queste scelte potrebbero modificare

sensibilmente la politica sanitaria dei prossimi decenni, ed è pertanto auspicabile un cospicuo investimento di risorse sia economiche che umane nel settore della biologia delle cellule staminali.

La possibilità di operare scelte strategiche in questo campo, anche in considerazione della preminenza culturale che la ricerca italiana ha fin qui occupato, ma che potrebbe scemare in assenza di iniziative istituzionali di ampio respiro strategico, porterebbe il nostro Paese in una posizione di avanguardia nel settore biomedico.

• I quesiti scientifici

La grande quantità di dati disponibili sulle cellule staminali ha finora prodotto molte risposte a quesiti importanti ed ha aperto nuove prospettive terapeutiche inimmaginabili fino a pochi anni orsono. In realtà, questo ha generato molte più domande che risposte, indicando l'opportunità, se non la necessità, di ampliare i programmi di lavoro sull'argomento, considerando anche i risvolti scientifici di potenziale applicabilità nel contesto sanitario. Come discusso esaustivamente, l'utilizzo delle cellule staminali apre orizzonti terapeutici di notevole portata, per esempio malattie neurodegenerative su base genetica, traumatica, ischemica, o conseguente all'esposizione a farmaci o sostanze tossiche, oltre all'utilizzo delle medesime come vettori cellulari per terapia genica di malattie metaboliche e di tumori.

Allo stato attuale delle conoscenze, non ci sono evidenze conclusive che definiscano quale dei due tipi di cellule staminali considerati in questa relazione - cellule ES e cellule staminali tessuto specifiche - possa essere considerato il più adatto per utilizzi sia sperimentali che clinici (Snyder EY, Vescovi AL, *Nat. Biotech.*, 18: 827-8, 2000). Da quanto emerge da questa relazione, il bivio che si presenta al ricercatore come al legislatore, riguardo all'utilizzo di cellule staminali ES invece di staminali adulte tessuto specifiche non riflette i termini reali del problema.

E' di fatto necessario effettuare ricerche per conoscere se solo una delle due sorgenti, o, come è più probabile, entrambe, possano dare risposta alle esigenze di terapia per le svariate patologie umane di origine e natura spesso incredibilmente diversa, fermo restando il quesito etico che esiste per alcune delle modalità di ottenimento delle cellule staminali embrionali umane.

E' auspicabile che tali problematiche possano venire superate con il progredire delle scoperte e con la messa a punto di tecnologie avanzatissime in questo settore di ricerca, che vede impegnato un numero consistente di gruppi italiani di elevatissima qualità, in grado di contribuire in modo significativo all'avanzamento delle conoscenze nel settore. Esistono inoltre in Italia numerosi gruppi, finora non direttamente coinvolti nel campo specifico, forniti di competenze in grado di dare ulteriori contributi alla ricerca.

E' pertanto fortemente auspicabile la costituzione di un programma nazionale finalizzato alla ricerca sulle cellule staminali. Le aree di ricerca su cui basare, almeno inizialmente, il programma in oggetto dovrebbero essere selezionate basandosi sia su una solida evidenza scientifica sia su un consenso unanime da parte della comunità scientifica riguardo l'opportunità/utilità/fattività del lavoro in quel determinato campo.

• Le scelte della ricerca

Sulla base di questi presupposti, sarebbe possibile individuare tre ambiti privilegiati su cui

concentrare, almeno inizialmente, il lavoro:

- cellule staminali somatiche tessuto-specifiche adulte, fetali abortive ed embrionali (ES) di origine umana ed animale;
- riprogrammazione genetica del nucleo di cellule somatiche per trasferimento nucleare in citoplasti artificiali di origine animale ed umani;
- modelli animali, anche transgenici, di patologie umane per lo studio in vitro e in vivo delle cellule staminali di varia natura.

Vale la pena di sottolineare che ci troviamo di fronte a scelte critiche che, di fatto, decideranno il futuro non solo della ricerca italiana ma anche della medicina d'avanguardia nel nostro Paese. E' auspicabile che si trovino finalmente le risorse per investire in maniera decisiva in questo settore, sfruttando quelle che sono in questo momento competenze esclusive del nostro Paese che, ad oggi, sono emerse grazie alla creatività ed impegno, spesso non finanziato, dei nostri ricercatori. Il rischio che l'Italia oggi all'avanguardia nel settore delle cellule staminali, ne resti di fatto esclusa è, purtroppo, concreto.

Capitolo 2

QUESITI ETICI EMERSI DAGLI ASPETTI TECNICI

2.1 - La Commissione ha riconosciuto esenti da problemi etici irrisolvibili:

- l'uso delle cellule staminali adulte e da cordone ombelicale, fatto salvo che sia stato ottenuto il consenso informato del donatore e che la sua salute non ne venga compromessa.
- l'uso di cellule staminali da materiale abortivo.
- l'uso di cellule staminali da trasferimento nucleare. Queste cellule staminali vengono ottenute mediante riprogrammazione genetica per trasferimento di nuclei di cellule somatiche in citoplasti artificiali umani e/o animali, purchè non comporti lo sviluppo di embrioni umani (TNSA). Nel caso di citoplasti umani, viene previsto esclusivamente lo sviluppo di stipiti cellulari tessuto specifici.

2.2 - La Commissione ha lasciato aperto al dibattito etico i seguenti punti:

- L'uso di materiale da embrioni sovranumerari. Andrà considerato il problema degli embrioni congelati, di quelli non congelati ma che eccedono il numero impiantabile, di quelli che non vengono valutati "idonei per l'impianto" per motivi morfologici o di integrità.
- L'uso di singole cellule ottenute dalla blastocisti, durante la fase diagnostica preimpianto della fecondazione assistita, senza alterarne il potenziale di sviluppo embriogenetico.
- L'uso di embrioni prodotti specificamente per scopi terapeutici.

Capitolo 3

DIBATTITO SUGLI ASPETTI ETICI

Questa parte della relazione della Commissione è organizzata per rispondere in modo puntuale ai quesiti posti dal

Ministro, professor Umberto Veronesi, alla Commissione. Sono così emersi undici punti di riflessione.

1 - Efficacia scientifica

Dalla parte scientifica di questo documento emerge la conferma di un dato già affermato in precedenti documenti di altre istituzioni nazionali e internazionali: il potenziale di applicazione terapeutica della ricerca sulle cellule staminali è effettivamente di notevole interesse e potrebbe condurre a una vera e propria rivoluzione in medicina, superiore persino, nei suoi effetti sulla salute della gente, a quella rappresentata dalla scoperta degli antibiotici.

La risposta alla prima parte della prima domanda rivolta a questa Commissione dal Ministro della Sanità è dunque positiva: c'è ormai una sufficiente mole di dati (e altri se ne stanno accumulando) per sostenere che, grazie a tali ricerche, i sistemi sanitari potranno offrire ai cittadini nuovi ed efficaci trattamenti per una notevole serie di patologie degenerative, che in molti casi potranno restaurare la salute, in altri migliorare sensibilmente la qualità della vita.

A fronte del carattere "fondamentale" che il diritto alla salute riveste nel nostro ordinamento costituzionale, favorire le ricerche dirette a realizzare tali trattamenti, diventa un obbligo morale.

2 - Cautela

Quanto alla seconda parte della domanda (sui tempi e le probabilità), la Commissione non è in grado di fare una previsione sufficientemente certa, anche perché il tempo in cui questi trattamenti potranno essere disponibili per l'uso clinico dipende anche dalle decisioni che oggi vengono assunte circa l'ammontare di risorse intellettuali e finanziarie che verranno destinate allo scopo.

Nei documenti nazionali e internazionali in materia ci si attiene comunque al criterio della massima cautela nel fare previsioni circa il tempo in cui questi trattamenti potranno entrare a far parte della pratica clinica. La Commissione fa suo questo criterio e ne sottolinea la rilevanza al fine di non suscitare attese o speranze ancora non realistiche.

3 - Il problema trapianti

Se l'utilizzazione terapeutica per scopi di trapianto sarà la conseguenza più diretta della ricerca sulle cellule staminali, conviene anche sottolineare che tale ricerca può comportare altri benefici per la salute della gente, benefici conseguenti a:

- la possibilità di utilizzare linee cellulari per testare l'efficacia e la tossicità dei farmaci;
- la possibilità di studiare i meccanismi biologici di base che presiedono allo sviluppo di certe patologie;
- la possibilità di utilizzare le cellule staminali per risolvere alcuni dei problemi che oggi rendono ancora non adeguatamente diffusa l'applicazione della terapia genica.

Resta comunque fermo che - dopo la necessaria sperimentazione sull'animale - l'utilizzazione più diretta e importante è quella per scopi di trapianto. In questo senso, all'inizio della parte scientifica del documento, si afferma che le cellule staminali, di qualunque origine, potranno risolvere i due limiti fondamentali dell'attuale tecnologia dei trapianti: la scarsità di organi e la necessità dell'immunosoppressione cronica. Da ciò derivano due importanti condizioni per l'uso clinico routinario delle cellule staminali: la quantità e la compatibilità col ricevente.

4 - I dati scientifici

La seconda domanda rivolta dal Ministro Veronesi a questa Commissione riguarda quale tra le cinque sorgenti classiche di cellule staminali può avere più possibilità di successo in termini di ricerca terapeutica. Il quadro dello "stato dell'arte" elaborato nella parte scientifica non offre una risposta univoca a questa domanda.

Si tratta del resto di un quadro in rapidissima evoluzione, sia nel settore delle cellule staminali di origine embrionale e germinale, sia nel settore delle cellule staminali di origine adulta.

Rispetto ai dati scientifici attualmente disponibili, tuttavia, si può sostenere che la prima condizione (la quantità) è

certamente soddisfatta dalle linee cellulari di provenienza embrionale, di cui si è ormai dimostrata, nei modelli animali già a partire dal 1981 e recentemente anche nell'uomo, la pressoché illimitata capacità di autorigenerazione, tanto che qualcuno ha avanzato l'ipotesi che le poche linee cellulari già derivate potrebbero in teoria costituire una fonte inesauribile di nuove linee cellulari. Questo stesso tipo di linee cellulari soddisferebbe la seconda condizione (la compatibilità) a patto di utilizzare per la loro produzione la tecnica del trapianto nucleare da cellula somatica del ricevente, come precisato nella parte scientifica.

5 - Il sostegno alla ricerca

Sempre restando ai dati oggi disponibili, le cellule staminali di origine adulta non soddisfano la prima condizione, non, almeno, nella misura in cui già la soddisfano le cellule embrionali. Soddisfano invece la seconda condizione, ovviamente qualora le cellule da coltivare vengano isolate dal paziente stesso che riceverà il trapianto.

C'è tuttavia da aggiungere che, in relazione a certe patologie degenerative a rapido decorso e, soprattutto, alla localizzazione di certi organi, la procedura di isolamento e trattamento ai fini della transdifferenziazione (che è cosa ben diversa dalla semplice utilizzazione, che, ad esempio, già avviene con la procedura di autotrasfusione di cellule staminali ematopoietiche) delle cellule staminali adulte presenta problemi di tempo che la rendono una procedura difficilmente perseguibile sul piano clinico per tutte le patologie.

E' sperabile che il proseguimento della ricerca possa permettere di superare tali problemi, come pure possa permettere, in una prospettiva più lontana, di determinare i meccanismi biologici che presiedono alla riprogrammazione del nucleo delle cellule adulte già differenziate. Per l'uso clinico, infatti, non è sufficiente sapere che tale riprogrammazione di fatto avviene (come è ormai dimostrato dagli esperimenti di clonazione animale); è necessario sapere come avviene, al fine di padroneggiare in modo riproducibile i meccanismi biologici di riprogrammazione. Attualmente, l'unico modo per studiare tali meccanismi è la tecnica del trasferimento nucleare somatico.

Emerge quindi, come è ben chiarito anche alla fine della parte scientifica del documento, la necessità - che trova un vasto (anche se non unanime) riscontro nella comunità scientifica internazionale - di non escludere pregiudizialmente nessun settore di ricerca.

La stessa possibilità di operare scientificamente un confronto, in termini di futura efficacia terapeutica, tra le varie fonti di linee cellulari, richiede che la ricerca venga portata avanti senza pregiudiziali esclusioni, né dirette, né indirette (ad es., attraverso la politica dei finanziamenti). Questa richiesta, che nella parte scientifica del documento emerge come dato di fatto, deve essere tuttavia valutata - sempre per seguire la traccia delle domande formulate dal Ministro - nei suoi aspetti etici.

6 - Le finalità terapeutiche

Nel sottoporre a valutazione etica la ricerca sulle cellule staminali, questa Commissione desidera sottolineare che ciò non può in nessun modo essere interpretato come un mettere in discussione il principio generale della libertà della ricerca scientifica, che in Italia è un principio costituzionalmente protetto. La valutazione etica che si intende intraprendere riguarda le finalità e le metodologie di un tipo specifico di ricerca, in ragione del fatto che tale ricerca avviene in un contesto su cui grava un serio disaccordo morale.

Nel nostro caso, tale disaccordo non riguarda, in verità, la finalità, poiché, come s'è già osservato, c'è un vasto consenso sul carattere benefico degli scopi della ricerca sulle cellule staminali, scopi che coincidono con uno dei fini fondamentali della medicina: guarire gli esseri umani nel modo più efficace possibile. Il disaccordo riguarda la provenienza embrionale di alcune linee cellulari e certi aspetti delle metodologie di derivazione, ma il tema della finalità di questo tipo di ricerca andava ricordato perché la consapevolezza della notevole importanza dei benefici attesi può costituire il terreno più idoneo per ridurre l'ampiezza del disaccordo morale.

7 - Liceità della sperimentazione

La ricerca sulle cellule staminali prelevate da tessuti adulti o dal cordone ombelicale o da feti abortiti in modo

spontaneo o volontario (in quest'ultimo caso, sulla base di una regolamentazione atta ad escludere ogni rapporto di causalità tra prelievo di cellule o tessuti e aborto) non solleva problemi morali insormontabili.

Su questo punto c'è un consenso unanime all'interno della Commissione. Il punto cruciale del disaccordo che grava sulla ricerca sulle cellule staminali ruota attorno alla liceità della sperimentazione sugli embrioni umani. Ancor prima che in relazione alle future applicazioni terapeutiche, il punto emerge già in relazione alla richiesta, sopra ricordata e ben delineata nelle sue ragioni scientifiche, di sostenere attivamente la ricerca sulle cellule staminali sia di origine embrionale, sia di origine adulta.

E' bene, infatti, precisare che qui si sta parlando della fase preliminare della ricerca, quella diretta a studiare le proprietà delle cellule staminali e a dimostrare la possibilità di indirizzarle verso la produzione delle varie linee cellulari o tessuti utilizzabili per trapianti. Molti sperano che quando si arriverà alla fase della vera e propria sperimentazione clinica, non sarà più necessario ricorrere alla derivazione di cellule dalla blastocisti dell'embrione umano. Anche se non è facile prevedere se e quando questa speranza si tradurrà in realtà, resta comunque fermo che oggi un programma di ricerca che contempra la sperimentazione sulle cellule staminali derivate da embrioni umani appare a molti necessario.

vai alla seconda parte

(http://salute.aduc.it/staminali/documento/relazione+della+commissione+studio+sull+utilizzo_2083.php)

28 Dicembre 2000