

Quest/Science Photo Library

Cellule NUOVE sempre

Riprogrammare le funzioni del genoma consente di indirizzare la differenziazione cellulare e schiude nuove opportunità terapeutiche

di Silvia Garagna, Carlo Alberto Redi e Maurizio Zuccotti

LA RETINA, IL TESSUTO SENSORIALE dell'occhio, conserva anche nell'adulto alcune cellule staminali totipotenti.

La biologia dello sviluppo vive oggi un periodo particolarmente felice. La genetica e la biologia cellulare hanno messo a disposizione degli embriologi un bagaglio di conoscenze e tecniche che permettono di affrontare, e molto probabilmente risolvere, quesiti che per decenni sono rimasti senza risposta. Tra questi, il più avvincente riguarda le modalità con cui avviene il processo di differenziamento cellulare durante l'embriogenesi. In particolare: quali sono i meccanismi e le molecole che inducono una cellula indifferenziata verso una via differenziativa piuttosto che un'altra? Il processo di differenziamento è terminale oppure la cellula può tornare allo stato iniziale di totipotenza?

In effetti, il Novecento è stato caratterizzato da grandi scoperte che hanno costituito un momento di svolta per le conoscenze embriologiche. Dopo quasi un secolo di ricerche conosciamo meglio le dinamiche del differenziamento cellulare, anche se ci sfuggono ancora quelle dello sviluppo dell'embrione. Lo zigote, formatosi dalla fusione dello spermatozoo con la cellula uovo, è la prima cellula che costituisce il nuovo individuo. Esso possiede tutte le informazioni, a livello nucleare e citoplasmatico, necessarie a dare inizio allo sviluppo embrionale. Con il procedere di questo processo, le cellule iniziano a differenziarsi, cioè ad assumere caratteristiche e funzioni diverse, e parallelamente l'organizzazione dell'embrione diventa sempre più complessa.

Il cambiamento nel numero e nella tipologia dei geni che si esprimono in ogni fase temporale dello sviluppo porta dapprima alla determinazione del destino differenziativo delle cellule e, in momenti successivi, alla loro effettiva differenziazione nei diversi tipi cellulari che costituiscono i tessuti dell'adulto. In alcuni di questi, però, permarranno alcune cellule che non andranno mai incontro al processo di determinazione e differenziamento, mantenendo capacità di rinnovo di tipo embrionale. Si tratta delle cellule staminali, in grado di sostituire quelle dei tessuti caratterizzati da un alto ricambio causato da processi di continuo differenziamento, come le cellule germinali maschili dell'epitelio seminifero o le cellule del tessuto ematopoietico, o da processi di continua morte cellulare, come le cellule dell'epidermide.

Le cellule staminali sono pluripotenti, mantengono cioè capacità proliferative durante tutta la vita dell'individuo, e si dividono asimmetricamente, con una delle due cellule figlie che rimane di tipo staminale e l'altra che inizia il processo differenziativo. Nei mammiferi, le cellule staminali pluripotenti sono presenti nella massa di cellule del nodo embrionale della blastocisti nelle fasi preimpianto, nell'embrione e nel feto durante lo sviluppo e si ritrovano persino nell'individuo adulto, anche se solo in alcuni precisi distretti dell'organismo.

Le fonti di cellule staminali

Dall'embrione preimpianto allo stadio di blastocisti si possono isolare le cellule del nodo embrionale e coltivarle fino a ottenerne migliaia: le cosiddette cellule embrionali staminali (in sigla ES da *Embryonic Stem cell*), la cui caratteristica principale è l'elevata capacità di differenziarsi in qualsiasi altro tipo cellulare. Cellule ES di topo sono state differenziate *in vitro* in cellule epiteliali, muscolari, nervose o pancreatiche. Di recente, un gruppo di ricercatori dell'Università di Bonn e del National Institute of Neurological Disorders and Stroke negli Stati Uniti è riuscito a differenziare cellule ES in cellule della glia che producono lo strato di mielina che riveste le fibre nervose. Trasferite nel cervello di topi carenti per la produzione di mielina, queste cellule hanno sintetizzato normalmente tale proteina.

Un altro gruppo di ricercatori della Washington University School of Medicine a St. Louis ha prodotto, sempre a partire da cellule ES, cellule nervose immature che, se trasferite nella spina dorsale danneggiata di ratti, ne ristabiliscono le normali funzioni. Analoghi tentativi sulle scimmie e su alcuni pazienti (compiuti a Harvard dal neurobiologo Evans Snyder) fanno ritenere non lontana nel tempo la possibilità di riparare motoneuroni con la riacquisizione delle funzioni deambulatorie.

Recentemente sono state isolate e coltivate cellule ES ottenute da blastocisti umane al quattordicesimo giorno di sviluppo. Le blastocisti provengono dalle cliniche dove si effettua la fecondazione *in vitro* e sono embrioni in eccesso che non sono stati trasferiti nell'utero della madre, ma che, con il consenso dei genitori, sono utilizzati per la ricerca. Uno studio successivo ha anche dimostrato le potenzialità delle cellule ES umane di differenziarsi, come quelle di topo, in altri tipi cellulari.

Nell'embrione postimpianto e poi nel feto sono ancora molte le cellule staminali presenti, anche se il loro isolamento è difficile. Tra le più studiate vi sono sicuramente le cellule germinali primordiali (PGC, da *Primordial Germ Cell*) che rappresentano lo stadio di differenziamento che precede la formazione delle gonadi. Le PGC fanno la loro comparsa, nell'embrione di topo e in quello umano, rispettivamente alla prima e terza settimana di sviluppo. Se isolate dall'embrione, queste cellule possono moltiplicarsi e produrre cellule pluripotenti dette EG (da *Embryonic Germ cell*), in grado, come le ES, di differenziarsi in quasi tutti i tipi cellulari presenti nell'adulto. La loro difficile reperibilità ne ostacola però l'impiego nel trattamento delle patologie.

Nell'individuo adulto si trovano cellule staminali in diversi distretti tissutali differenziati: nel midollo spinale, nell'epitelio seminifero della gonade maschile, nella retina, negli epitelii, nel cervello. Se le cellule staminali di ciascuno di questi distretti vengono isolate e opportunamente coltivate, è possibile aumentarne il numero e differenziarle nel tipo cellulare specifico del

distretto tissutale da cui derivano, o anche transdifferenziarle ottenendo così, per esempio, cellule del sangue a partire da cellule staminali del tessuto nervoso. Pochi mesi fa, il gruppo diretto da Angelo Vescovi ha differenziato cellule muscolari a partire da cellule staminali neuronali. È chiaro che disporre di un reagente biologico quale le cellule staminali, da differenziare nei diversi tipi cellulari, apre nuovi scenari terapeutici: patologie ora poco trattabili, quali l'Alzheimer, il Parkinson, l'infarto, il diabete e molte altre, potrebbero essere affrontate con maggior successo grazie alla sostituzione dei tessuti danneggiati.

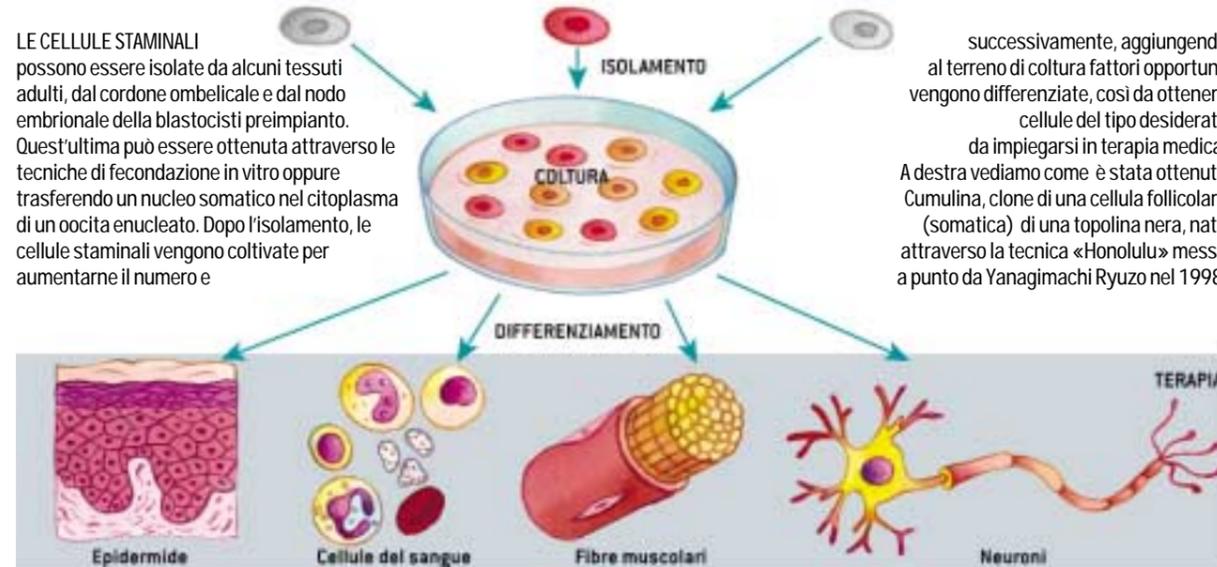
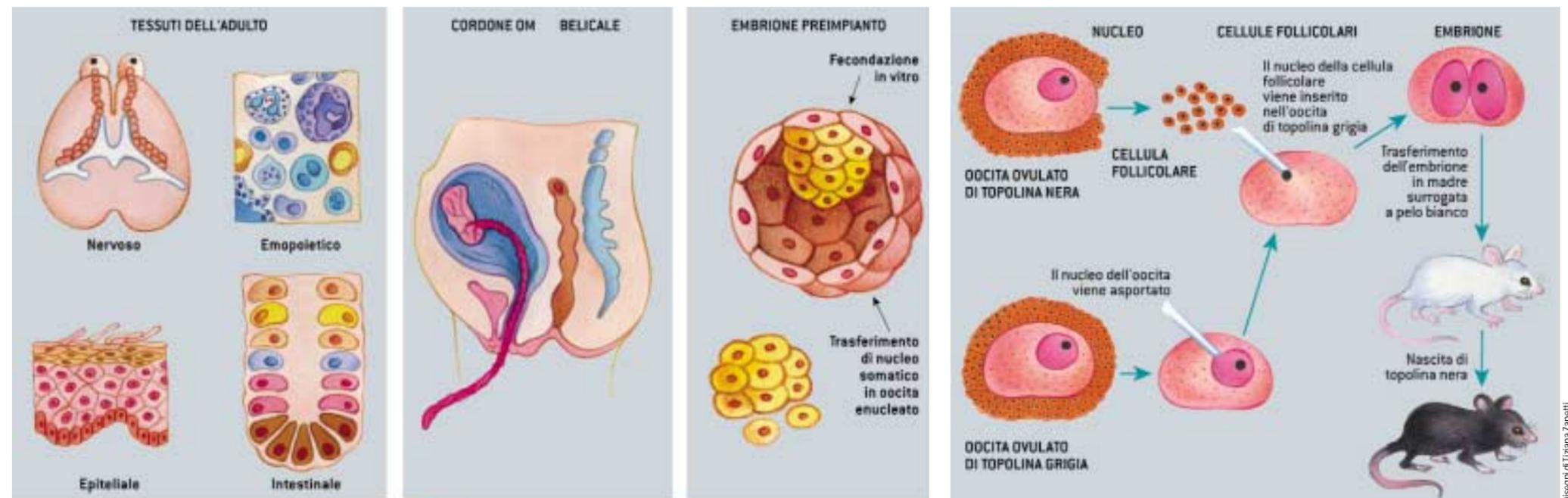
Le cellule staminali adulte sono purtroppo di difficile reperibilità, poiché numericamente molto scarse; inoltre non possono essere coltivate a lungo poiché, dopo alcune divisioni cellulari, tendono a perdere le caratteristiche di pluripotenzialità. Le cellule staminali embrionali, invece, possono essere mantenute in coltura per moltissimi cicli di divisione, addirittura per più di dieci anni, senza perdere di pluripotenzialità.

Una via alternativa per ottenere cellule staminali è il loro iso-

lamento dal cordone ombelicale. Va comunque ricordato che le limitazioni numerica e fisiologica si presentano anche in questo caso, sebbene in minor misura.

La possibilità di cambiare programma

Accanto a queste sorgenti fisiologiche di cellule staminali, negli ultimi tre anni se ne è aggiunta un'altra molto promettente, basata sulla possibilità di modificare il programma genetico delle cellule differenziate. Questa nuova possibilità si è sviluppata a partire dal 1997, quando sono stati pubblicati i risultati di alcune ricerche che dimostrano come il programma genetico di nuclei di cellule del tutto differenziate può essere completamente modificato. Questi esperimenti, ampiamente descritti in un nostro precedente articolo pubblicato su «Le Scienze» (n. 337, gennaio 2000), impiegano tecniche di trasferimento nucleare. I ricercatori Willmut e Campbell, nella pecora, e successivamente Yanagimachi e collaboratori, nel topo, hanno stabilito con chia-



IN PILLOLE

- Lo zigote, che si forma dalla fusione dello spermatozoo con la cellula uovo, è la prima cellula da cui si formerà l'individuo. Essa possiede tutte le informazioni per dare inizio allo sviluppo embrionale, e le cellule a cui dà origine possono differenziarsi nei tessuti più diversi. Per questa loro caratteristica vengono chiamate cellule staminali totipotenti.
- Anche nell'adulto alcuni tessuti caratterizzati da un elevato ricambio conservano cellule che non si differenziano e quindi come le cellule staminali embrionali possono, in determinate condizioni, trasformarsi in altri tipi cellulari.
- Questa proprietà delle cellule staminali può essere sfruttata per produrre nuove cellule da trapiantare in pazienti che soffrono di malattie sinora poco trattabili come l'Alzheimer, il Parkinson, l'infarto e il diabete. Il problema però è identificare la fonte più adatta di questo tipo di cellule.
- Le cellule staminali ricavate dall'embrione o dal feto creano problemi etici e quelle ottenibili dall'adulto sono scarse. Una procedura potrebbe risolvere entrambi i problemi: prelevare cellule già differenziate e riprogrammare il genoma in citoplasti artificiali così da ottenere nuove cellule adatte a sostituire i tessuti malfunzionanti.

Per le leucemie autotrapianto di cellule staminali

Cala in Europa la mortalità nei malati di leucemie, linfomi e mielomi, nonostante l'incidenza crescente di questi tumori del sangue: 7000 decessi all'anno in meno rispetto agli anni ottanta, grazie alla disponibilità di trattamenti più efficaci per malattie che colpiscono sino a 30 adulti su 100 000. Un contributo decisivo, soprattutto per i pazienti più anziani e per quelli recidivi, viene dall'autotrapianto di cellule staminali prelevate dal sangue stesso del malato, una soluzione all'avanguardia che non solo prolunga la vita, ma ne migliora in modo drastico la qualità. Ce ne parla Enrica Morra, della Divisione di ematologia e Centro trapianti di midollo dell'Ospedale Niguarda di Milano: «Il trapianto di cellule progenitrici favorisce la ricrescita delle cellule ematiche normali nei pazienti sottoposti a chemioterapia. Il trapianto allogenico del midollo è fattibile solo in una minoranza dei casi per la difficoltà di trovare donatori compatibili: anche tra fratelli solo 1 su 4 può essere idoneo. Inoltre, per gli alti rischi che comporta, l'intervento è limitato ai malati al di sotto dei 55 anni, che sono meno del 50 per cento dei pazienti con tumori del sangue».

Un'alternativa è il trapianto autologo, dove le cellule sono riconosciute come proprie dall'organismo. Da pochi anni la tecnica è stata perfezionata col prelievo delle cellule staminali dal sangue invece che dal midollo osseo, senza necessità di anestesia. Congelate, conservate e reinfuse dopo la chemioterapia, anche molto intensa se necessario, le cellule immature hanno la formidabile capacità di migrare nel midollo osseo in poche ore e rigenerare tutto il repertorio di cellule ematiche.

Gli aspetti tecnici riguardano mobilitazione, conteggio e purificazione delle cellule. Per la mobilitazione, sono stati identificati i farmaci chemioterapici più idonei e tollerati per stimolare produzione e immissione in circolo delle cellule, abitualmente scarse e insufficienti per un trapianto. Per il conteggio, è stato messo a punto proprio all'Ospedale Niguarda un metodo citometrico affidabile e accurato, allineato agli standard a livello europeo; per la purificazione del sangue dalle cellule tumorali, nonostante raffinate tecnologie molecolari di decontaminazione in vitro, non è ancora emerso un beneficio terapeutico univoco.

Rispetto alle patologie, il trapianto autologo viene considerato una terapia adeguata nei casi di mieloma multiplo, più frequente negli anziani non altrimenti trattabili.

Per le leucemie mieloidi acute una sperimentazione clinica, coordinata dal Medical Research Council su 4000 pazienti, ha messo in evidenza che la metà delle ricadute, che si verificano nel 60 per cento dei casi, può essere prevenuta mediante autotrapianto. I pazienti a rischio sono stati selezionati in base all'analisi delle alterazioni cromosomiche.

Nei casi difficilmente curabili dei linfomi non-Hodgkin si possono associare: la chemioterapia, per una prima aggressione non selettiva; l'immunoterapia con anticorpi monoclonali, per attaccare in modo specifico le cellule tumorali; l'autotrapianto per stimolare la rigenerazione delle cellule ematiche. Con questo trattamento combinato si è osservata una remissione nel 70 per cento dei casi.

Infine, per il linfoma granuloso di Hodgkin, il trapianto autologo è stato usato come terapia di salvataggio nei pazienti - un terzo dei malati - con ricaduta entro l'anno dal primo ciclo di chemioterapia e in quelli refrattari; in più della metà dei casi si è ottenuta remissione completa anche a distanza di alcuni anni dal trapianto.

CLAUDIA HAIMANN



National Cancer Institute/Science Photo Library

CELLULE EMATICHE al microscopio elettronico a scansione. L'autotrapianto con cellule staminali ottenute dal sangue è una valida alternativa al trapianto di midollo osseo, non sempre realizzabile.

rezza che il nucleo di cellule somatiche del tutto differenziate può essere riprogrammato quando è trasferito nel citoplasma di una cellula uovo, dando così il via allo sviluppo embrionale e alla nascita di un nuovo individuo, esatta «copia genomica» del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare.

Resta da scoprire quali siano i meccanismi e le molecole coinvolte in questo processo di deprogrammazione e riprogrammazione del genoma della cellula somatica dopo il suo trasferimento nel citoplasma della cellula uovo. È però chiaro che durante la riprogrammazione la cromatina si decondensa, la struttura a nucleosomi si destabilizza e le proteine regolatrici si dissociano dalla fibra di DNA influenzando così sull'espressione genica.

Come si attiva il genoma embrionale

Un aspetto importante che ci aiuta a definire i tempi in cui avvengono le modificazioni delle funzioni del genoma della cellula somatica, successivamente al suo trasferimento nel citoplasma della cellula uovo, riguarda le modalità di attivazione dei geni embrionali. In tutti i mammiferi le prime fasi dello sviluppo embrionale a partire dallo zigote avvengono grazie agli RNA messaggeri (mRNA) e alle proteine di origine materna presenti nel citoplasma dell'ovocita. Mentre col procedere dello sviluppo embrionale questi elementi si esauriscono, inizia parallelamente la sintesi di mRNA da parte dell'embrione.

L'attivazione del genoma embrionale avviene durante lo sviluppo preimpianto in momenti diversi nelle varie specie di mammifero. Nel topo si verifica a partire dall'embrione a due cellule, nell'uomo a partire da quattro cellule, nel coniglio e nella pecora da 16/32 cellule. Se l'embrione non esprime correttamente i geni embrionali entro questi tempi non potrà proseguire lo sviluppo. Ne consegue che, per la comprensione dei meccanismi e delle molecole coinvolti nel processo di de-differenziazione e riprogrammazione del genoma dei nuclei somatici, gli studi devono essere effettuati nelle primissime fasi dello sviluppo embrionale preimpianto, ossia nei momenti immediatamente successivi al trasferimento dei nuclei somatici negli oociti enucleati.

GLI AUTORI

SILVIA GARAGNA, biologa, è ricercatrice presso l'Università di Pavia, dove tiene il corso di biologia dello sviluppo. Ha soggiornato presso le Università di Würzburg (Germania), di Oxford e di York (UK). Si occupa dello studio dei processi gametogenetici maschili e femminili e delle prime fasi dello sviluppo in diversi modelli animali, in particolare nei mammiferi. Ha ricevuto un finanziamento da Telethon per lo studio del differenziamento cellulare in embrioni ottenuti da trasferimento nucleare.

CARLO ALBERTO REDI, biologo, è ordinario di zoologia all'Università di Pavia. Si è occupato di citochimica del DNA e della valutazione delle aneuploidie gametiche anche nel corso di soggiorni ai Sylvius Laboratories di Leida e presso le Università di Lubeca e Düsseldorf. Attualmente studia lo sviluppo e la differenziazione delle cellule germinali in diversi modelli animali di variabilità cariotipica e la riprogrammazione genetica di nuclei somatici in citoplasti artificiali.

MAURIZIO ZUCCOTTI, biologo, è associato di istologia ed embriologia all'Università di Parma. Ha lavorato nel laboratorio di Ryuzo Yanagimachi all'Università di Hawaii con il quale ha studiato la riprogrammazione del nucleo di cellule somatiche differenziate clonando per la prima volta un topo. Inoltre è stato presso la Molecular Embryology Unit diretta da Anne McLaren all'University College of London, dove si è dedicato allo studio dei meccanismi molecolari che regolano lo sviluppo embrionale dei mammiferi. Coordina un progetto finanziato da Telethon per lo studio del differenziamento cellulare in embrioni ottenuti da trasferimento nucleare.

Malattie	Cellule da trapiantare
Alzheimer	nervose
Aterosclerosi	endoteliali
Ustioni	epiteliali
Dolori cronici	cromaffini
Diabete	di Langerhans
Epilessia	nervose
Cardiache	cardiomiociti
Huntington	nervose
Ipcalcemia	paratiroidi
Ipcolesterolemia	epatociti
Renali	renali
Leucemie	ematopoietiche
Epatiche	epatociti
Degenerazione della retina	della retina
Sclerosi multipla	gliali
Osteoartrite	condrociti
Parkinson	neuroni dopaminergici
Artriti reumatoidi	condrociti
Danni alla spina dorsale	nervose
Infarti	cardiociti

Tra i fattori coinvolti nelle fasi immediatamente successive al trasferimento del nucleo somatico nell'ooplasma, sono rilevanti il contenuto in DNA del genoma e il momento del ciclo cellulare in cui si trova il nucleo trasferito. Si è notato, per esempio, che il trasferimento di nuclei in fase non proliferativa del ciclo facilita lo sviluppo e aumenta il numero di blastocisti ottenibili.

Vediamo ora i meccanismi molecolari che regolano l'espressione del genoma negli embrioni preimpianto di mammifero.

Le modificazioni epigenetiche

Sebbene nella maggior parte delle cellule il contenuto e le sequenze del DNA rimangono invariati col procedere dello svilup-

Malattie	Numero di malati (milioni)	
	Stati Uniti	Italia
Cardiovascolari	58	9,5
Diabete	16	2,1
Osteoporosi	10	2,2
Tumori	8,2	0,5
Alzheimer	4	0,5
Parkinson	1,5	0,033
Congenite	0,15 (per anno)	0,016 (per anno)
Totale	97,85	14,85

po embrionale, il repertorio di geni espresso in un dato tipo cellulare e in un dato momento del ciclo cellulare è limitato e specifico. L'espressione del genoma embrionale viene regolata da una serie di meccanismi di tipo epigenetico quali la metilazione del DNA, l'organizzazione della cromatina e l'architettura nucleare. Questi meccanismi, attivi nella gametogenesi e nelle fasi dello sviluppo embrionale preimpianto, sono coinvolti nel modellare e modulare le funzioni del genoma. Cambiamenti in uno o più di questi regolatori epigenetici determinano modificazioni nell'espressione genica, ossia nelle proteine prodotte dai geni.

● La metilazione del DNA

La regolazione dell'espressione di molti geni è dipendente dalla presenza/assenza di citosine metilate lungo la sequenza del

DNA genico. La metilazione è associata a importanti eventi nello sviluppo embrionale quali l'inattivazione del cromosoma X nelle femmine di mammifero e il fenomeno dell'*imprinting*, un processo che consiste in una marcatura differenziale dei genomi paterno e materno durante la produzione dei gameti così che l'espressione di alcuni geni dipende dalla loro origine parentale.

I gameti maschile e femminile hanno una differente organizzazione della cromatina. I geni costitutivi (quelli che si esprimono in tutti i tessuti) sono demetilati in entrambi i gameti e si mantengono tali durante tutte le fasi dello sviluppo preimpianto; al contrario, i geni tessuto-specifici sono fortemente metilati nello spermatozoo e meno metilati nell'ovocita e vanno incontro a una generale demetilazione durante lo sviluppo preimpianto, per venire di nuovo metilati successivamente. Questo processo di demetilazione pare necessario per ristabilire uno stato di pluripotenzialità prima dell'inizio della determinazione e differenziazione cellulare che prende il via con la gastrulazione, subito dopo l'impianto, ed è contemporaneo a una estesa rimetilazione. La presenza di citosine metilate è in grado di modificare la conformazione della cromatina così da facilitare o impedire il legame con fattori o inibitori della trascrizione.

● L'organizzazione della cromatina

Nel gamete maschile gli istoni vengono sostituiti dalle protammine (necessarie a garantire l'alta condensazione della cromatina nella testa dello spermatozoo) fino a quando lo spermatozoo penetra nella cellula uovo. A questo punto, e durante la decondensazione della cromatina e la formazione del pronucleo, le protammine sono a loro volta sostituite da proteine istoniche.

Durante l'oogenesi, la cromatina si organizza secondo un'architettura ben precisa che identifica due tipi di oociti denominati SN (*Surrounded Nucleolus*) e NSN (*Not Surrounded Nucleolus*) per la presenza o assenza di un anello di cromatina attorno al nucleolo e per una cromatina fortemente condensata o dispersa nel nucleo. La differenza tra i due tipi di oociti non è solo morfologica, ma anche funzionale poiché è correlata a una diversa attività genica e alla possibilità di proseguire nello sviluppo embrionale dopo la fecondazione (solo il tipo SN lo completa).

Dopo la fecondazione, l'organizzazione della cromatina dei gameti va incontro a importanti fenomeni di rimodellamento. Nell'embrione preimpianto la cromatina regola l'espressione genica, consentendo una prima ondata di attivazione di geni embrionali a partire dalla fase terminale del primo ciclo cellulare e una espressione genica qualitativamente e quantitativamente più consistente quando l'embrione è a due cellule.

● L'architettura del genoma.

I cromosomi all'interno del nucleo occupano precise regioni che variano con il ciclo cellulare in un contesto dinamico che si ripete a ogni ciclo. Ciò è stato dimostrato utilizzando una tecnica di ibridazione *in situ* che permette di evidenziare un singolo cromosoma con sonde fluorescenti (si vedano le immagini nella pagina a fronte). Se un cromosoma o una sua porzione viene a essere spostato dal proprio dominio spaziale (per esempio in presenza di traslocazioni cromosomiche), allora anche l'espressione dei geni di quella porzione può cambiare.

Che cosa accade a un nucleo di una cellula somatica quando viene trasferito all'interno del citoplasma della cellula uovo? Le caratteristiche particolari di metilazione, organizzazione della cromatina e architettura del genoma sono mantenute o variate? Il confronto tra come si organizza il genoma di uno zigote ottenuto dalla normale fecondazione tra uno spermatozoo e un oocita e quello di uno zigote ottenuto in seguito al trasferimento nucleare permette di stabilire quali siano i requisiti di metilazione, organizzazione della cromatina e architettura nucleare ne-

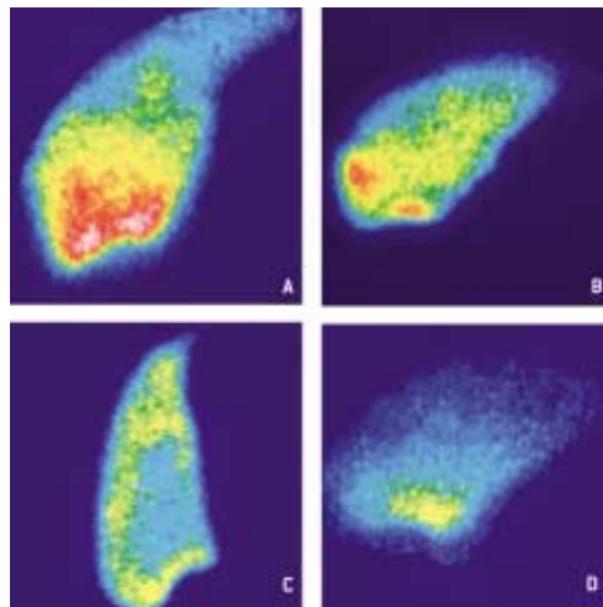
cessari al corretto sviluppo dell'embrione e anche quali siano le modificazioni «tollerate» o «tollerabili». Sarà proprio la comprensione di questi «confini» entro cui il genoma si esprime correttamente a definire i possibili interventi sperimentali e terapeutici.

Riprogrammare il genoma per curare le malattie

In futuro sarà forse possibile prelevare da un adulto una cellula somatica e coltivarla in modo da farla tornare indifferenziata, per poi ottenere un tipo cellulare nuovo ritrasferibile nel corpo dell'individuo in grande quantità, oppure coltivabile fino alla produzione di nuovi tessuti o addirittura organi. O ancora, si potranno indurre cellule quiescenti a riacquistare funzioni utili in un organismo differenziato o modificare i meccanismi della progressione neoplastica fino alla completa reversione del tumore e alla riprogrammazione delle normali attività cellulari.

La più promettente applicazione in ambito biomedico di queste tecniche è certamente quella della produzione di popolazioni cellulari o di veri e propri tessuti da trapianto. Per le diverse patologie si può prevedere di differenziare *in vitro* i tipi cellulari necessari per la terapia da attuare. Questa via, sebbene non ancora del tutto praticabile, offre sicuramente una prospettiva per milioni di pazienti affetti da patologie degenerative o croniche.

Le cellule staminali embrionali e quelle embrionali pluripo-

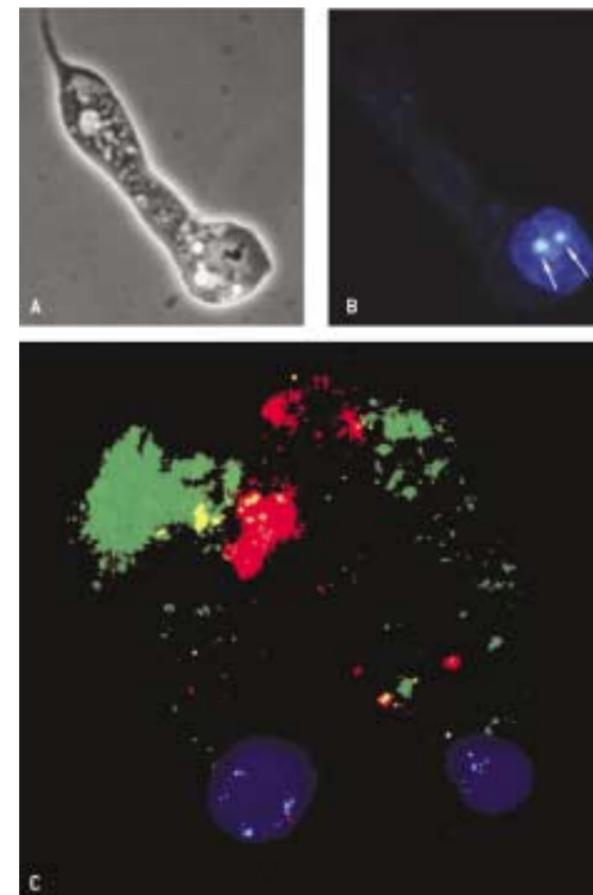
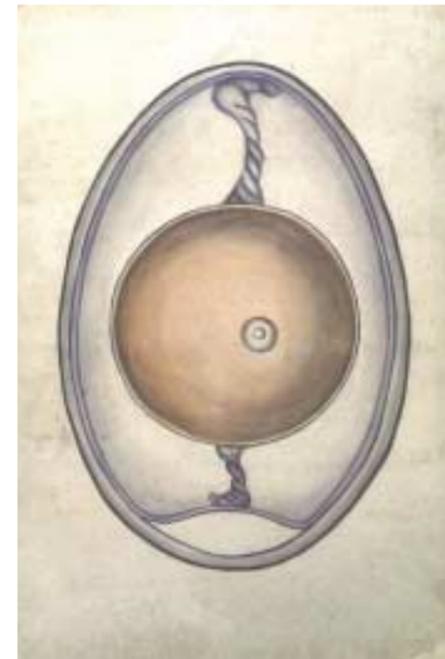


tenti sono in grado, in specifiche condizioni di coltura, di generare nuovi tipi cellulari differenziati. L'impiego terapeutico di questi tipi cellulari è però ostacolato da almeno due grandi difficoltà. La prima è costituita dalla difficile reperibilità di cellule staminali nell'adulto e dal fatto che quindi possono essere isolate solo da embrioni, con conseguenti problemi di natura etica. La seconda è legata a eventuali incompatibilità immunologiche nei confronti di questi nuovi tessuti. Questo secondo problema può essere risolto impiegando cellule staminali del paziente da curare, quando si riescano a ottenere, oppure utilizzando le sue stesse cellule del cordone ombelicale congelate alla nascita.

Una strategia completamente diversa è quella di associare le tecniche del trasferimento nucleare con le metodiche impiegate per il differenziamento delle cellule staminali. Poiché questa strategia richiede l'uso di oociti, solleva problemi di natura etica legati sia all'impiego e alla donazione di gameti sia alla salute

CELLULA UOVO in un acquarello del 1890 (da *Imago Animalium* a cura di C. A. Redi, M. Zuccotti e S. Garagna, Ibis Editore, Como, 2000). Lo studio dettagliato del citoplasma dell'ovocita permetterà di riprodurre in citoplasti artificiali i meccanismi della riprogrammazione genica.

UNO SPERMATOZOO (a fronte) ripreso prima (A) e nei momenti successivi alla fecondazione (B, 30 minuti; C, 1 ora; D, 2 ore) con la tecnica del trasferimento di energia per evidenziare l'organizzazione della cromatina. Le aree più condensate (*in rosso*) si trovano nella porzione caudale della testa dello spermatozoo, quelle meno condensate (*in giallo e azzurro*) nella zona equatoriale e apicale. La cromatina più condensata scompare per ultima dopo la fecondazione.



CELLULA DEL SERTOLI (regola la spermatogenesi nella gonade maschile) osservata in contrasto di fase (A) e in fluorescenza (B) dopo trattamento con un fluorocromo. La tecnica dell'ibridazione *in situ* consente di localizzare (C) alcuni cromosomi all'interno del nucleo (*in blu*). In questo caso sono stati evidenziati i cromosomi 5 (*in verde*) e 15 (*in rosso*).

della donatrice. L'impiego di cellule uovo di altre specie è risultato incoraggiante; Tanja Dominko ha dimostrato che il citoplasma dell'ovocita di bovino è in grado di determinare la proliferazione cellulare del nucleo di cellule somatiche di ratto, maiale, ariete e scimmia sino alla formazione della cavità del blastocite. In questa prospettiva è quindi prioritario il proseguimento della ricerca in modelli animali. Lo scopo di queste ricerche è quello di giungere a riprogrammare *in vitro* i nuclei delle cellule somatiche in assenza del gamete femminile impiegando citoplasti artificiali.

Questa strategia di ricerca è fortemente auspicata nel rapporto della Commissione di studio sull'uso delle cellule staminali per finalità terapeutiche, presieduta dal Nobel Renato Dulbecco, di recente istituita dal ministro della Sanità Umberto Veronesi. La Commissione, recepiti i più recenti avanzamenti delle conoscenze scientifiche nel settore della biologia delle cellule staminali e dopo aver valutato le proposte del Rapporto Donaldson del Governo inglese (www.doh.gov.uk), ha sottolineato il fatto che il sostegno alla ricerca sul differenziamento cellulare al fine di ottenere cellule e tessuti è

centrale per lo sviluppo delle politiche sanitarie basate sulla medicina rigenerativa. Si pensi che solo negli Stati Uniti circa 60 milioni di persone presentano patologie del sistema cardiovascolare (9,5 milioni in Italia), più di 15 sono affette da diabete (2,1), 10 da osteoporosi (2,2), più di 4 dalla malattia di Alzheimer (0,5) e circa 2 dal Parkinson (0,04).

La ricerca sulle vie di produzione delle cellule staminali e in particolare sul loro impiego per la sostituzione di cellule o tessuti danneggiati o non funzionanti consentirà forse di superare il tradizionale trapianto da cadavere. Si pensi alla ricostruzione del midollo spinale danneggiato da traumi fisici o del tessuto cardiaco dopo infarto, alle malattie infiammatorie di natura sistemica o a quelle muscolo-scheletriche (displasia ossea, malattie progressive delle giunture, osteogenesi imperfetta, miopatie primitive) e ancora alle malattie degenerative della retina, della cornea e dell'apparato uditivo, i cui tessuti siano danneggiati per cause genetiche o traumatiche, e infine alle malattie degenerative del sistema nervoso (Alzheimer, Parkinson, malattia di Huntington, sclerosi laterale amiotrofica). Fattore cruciale per il successo di tutte queste terapie è la quantità di cellule necessarie: il materiale di 5-6 aborti fornisce un numero di cellule staminali utili al recupero funzionale di un solo paziente parkinsoniano. Questi numeri dicono chiaramente che sono necessarie altre fonti di cellule staminali; la messa a punto di citoplasti artificiali è una via promettente per raggiungere tale obiettivo.

BIBLIOGRAFIA

- KIKYO N. e WOLFFE A. P., *Reprogramming Nuclei: Insights from Cloning, Nuclear Transfer and Heterokaryons* in «Journal of Cell Science», 113, pp. 11-20, 2000.
LAKE J.-A. e altri., *Reversible Programming of Pluripotent Cell Differentiation* in «Journal of Cell Science», 113, pp. 555-566, 2000.
THOMSON J. A. e ODORICO J. S., *Human Embryonic Stem Cell and Embryonic Germ Cell Lines* in «Trends in Biotechnology», 18, pp. 53-57, 2000.
Stem Cell Research and Ethics in «Science», 287, pp. 1417-1446, 2000.