

# Cellule staminali: sicurezza nella rigenerazione ossea

di Danilo A. Di Stefano

Il dibattito scientifico sulle potenzialità delle cellule staminali nella rigenerazione tissutale si fa sempre più interessante. Per quanto si tratti di metodi sperimentali, non bisogna dimenticare che attualmente l'applicazione clinica segue spesso da vicino la ricerca e non è escluso che in un prossimo futuro queste tecniche possano essere applicate nei nostri studi. Abbiamo ritenuto utile affrontare questo argomento dal punto di vista della ricerca di base, per comprendere se vi siano dei rischi reali o potenziali in queste metodologie e quale sia la normativa che le regola. Ne abbiamo parlato con **Estella Musacchio**, responsabile dell'attività di ricerca dell'unità operativa semplice di Diagnosi della patologia minerale e metabolica dell'osso dell'Università degli Studi di Padova (Clinica medica I - dipartimento di Medicina-Dimed), che si occupa in

particolare dei meccanismi cellulari e molecolari alla base dell'attività di farmaci e fattori locali implicati nei processi di rimodellamento scheletrico.

## Dal punto di vista biologico, qual è il significato delle cellule staminali e quali sono le loro caratteristiche principali?

Le cellule staminali sono le cellule grazie alle quali un organismo superiore realizza lo sviluppo ontogenetico e il mantenimento dell'omeostasi dei propri tessuti adulti. Si tratta di elementi indifferenziati in grado di mantenere la caratteristica di staminalità acquisendo al tempo stesso capacità differenziative, grazie alla proprietà unica di dividersi in modo asimmetrico.

Secondo la terminologia tradizionale, possono essere classificate in base alla loro origine in **staminali embrionali** e **staminali somatiche o adulte** (se deri-

vano dalla blastocisti o siano invece presenti nei tessuti differenziati) e/o, in base al loro potenziale differenziativo, cioè alla capacità di dare luogo a un intero organismo o a un particolare tessuto o gruppo di tessuti, in **totipotenti** (lo zigote), **pluripotenti**, **multipotenti** e **unipotenti**. La ricerca scientifica ha dimostrato che le restrizioni poste dalla classificazione sono in gran parte superabili in condizioni adeguate. Le cellule staminali hanno infatti la capacità di differenziarsi non solo in cellule del tessuto di appartenenza, ma anche in altri tipi cellulari. Grazie a questa caratteristica è possibile ottenere cellule ossee a partire per esempio da staminali del tessuto adiposo. Cellule staminali mesenchimali (Msc) isolate da midollo osseo, da cartilagine, e da tessuto adiposo mostrano caratteristiche morfologiche e fenotipiche simili e possiedono analoghe potenzialità differenziative. Questo non è difficile da comprendere in quanto si tratta di tessuti con un'origine embrionale comune.

È sicuramente più sorprendente che siano in grado di transdifferenziarsi, dando luogo a cellule che hanno una derivazione embrionale completamente diversa. È infatti possibile ottenere da Msc anche neuroni o cellule epiteliali. Negli ultimi anni la ricerca si è focalizzata inoltre sulla riprogrammazione nucleare, cioè sulla possibilità di cancellazione e di rimodellamento di tratti epigenetici (si veda box).

Questo argomento può sembrare non attinente al campo strettamente odontoiatrico, ma non dobbiamo dimenticare che oggi molto più che in passato l'applicazione clinica segue da vicino la ricerca di base e, per quanto al momento attuale si tratti solo di metodiche sperimentali, non è escluso che in un prossimo futuro possano essere

utilizzate anche a livello ambulatoriale.

## Esiste una normativa che regola l'impiego delle cellule staminali?

Le problematiche associate all'uso e soprattutto all'ottenimento di cellule staminali embrionali da blastocisti sono state e sono tuttora oggetto di discussioni a sfondo prevalentemente etico ed è noto che tali cellule non possono essere utilizzate in molti Paesi tra cui l'Italia, mentre ne è concesso il prelievo da cordone ombelicale.

Sotto questo aspetto, l'avvento delle iPS potrà consentire una maggiore libertà di azione sia in termini di disponibilità di materiale sia di durata, essendo le staminali adulte più limitate dal punto di vista della potenzialità replicativa.

La regolamentazione dell'uso delle cellule staminali adulte, pure oggetto di normativa rigorosa e in continuo aggiornamento, di pari passo con la ricerca scientifica, è certamente meno conosciuta. Nel 2007 l'Emea (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), ha emesso alcune direttive, in cui sono stati definiti Advanced Therapy Medicinal Products (Atmp), cioè prodotti medicinali per terapie avanzate: la **Terapia genica** (uso di acidi nucleici per regolare, aggiungere o eliminare una sequenza genica), la **Terapia cellulare somatica** (cellule e tessuti manipolati per alterarne le caratteristiche biologiche, la funzione fisiologica o usati nel ricevente per funzioni diverse da quelle che hanno nel donatore) e l'**Ingegneria tissutale** (cellule e tessuti ingegnerizzati usati per rigenerare, riparare, o rimpiazzare normale tessuto umano).

In seguito al recepimento di tali direttive da parte degli stati membri, il 30 dicembre 2008, le cellule staminali adulte sono state riconosciute "prodotto medicinale" a tutti gli effetti. In quanto tali, il loro impiego è soggetto a regole e controlli estremamente rigidi e attenti, in modo esattamente sovrapponibile a quanto è previsto per i farmaci.

In particolare, viene dato grande rilievo alle tecniche di produzione e sicurezza tra cui vanno inclusi in modo prioritario:

- la modalità di replicazione e differenziamento delle cellule staminali;
- l'attivazione o soppres-

sione di antigeni;

- i cambiamenti fenotipici, di mobilità, adesione, secrezione, degradazione, risposta biologica, valutati sia nell'organismo ricevente che in coltura.

## Si parla molto delle potenzialità delle cellule staminali nella rigenerazione tissutale, ma poco dei rischi associati al loro impiego.

Premetto che considero l'ingegneria tissutale un campo affascinante e molto promettente per le molteplici e importantissime opportunità applicative. Molte di queste sono già realtà: basti pensare alla possibilità di rigenerare la pelle di un grande ustionato; altre, come la rigenerazione del tessuto cardiaco di un infartuato, o dei neuroni dopaminergici di un parkinsoniano sono allo studio e saranno possibili in un futuro.

Nel caso del tessuto osseo, le applicazioni dell'ingegneria tissutale spaziano dal campo ortopedico e traumatologico alla chirurgia maxillo-facciale/orale e anche in questo ambito molti obiettivi sono già stati raggiunti.

**Sicuramente la medicina del nuovo millennio farà ampio uso di cellule staminali e di fattori stimolanti e differenziativi** e, grazie anche agli enormi progressi compiuti in campo tecnologico sia in termini di tecniche operatorie sia di disponibilità di biomateriali, sarà possibile la risoluzione di problemi che fino a pochi anni prima sembravano inavvicinabili. In tutto questo c'è un "però" di fondamentale rilevanza, dato dal rischio assolutamente concreto e scientificamente provato che può accompagnare l'uso di queste procedure. **Qualsiasi processo avenga nel nostro organismo è il risultato di un equilibrio regolato in modo delicato.**

In particolare, i sistemi che regolano il differenziamento e la proliferazione cellulare sono pressoché ubiquitari e le stesse molecole di segnale sono utilizzate dall'organismo in tessuti e contesti diversi sia in condizioni fisiologiche che nella trasformazione e progressione oncogenica. In questo caso si viene a sbilanciare proprio l'equilibrio tra differenziamento/quiescenza da una parte e proliferazione/trasformazione dall'altra.

Una vastissima produzione scientifica dimostra l'attivazione del sistema Wnt/



Su **OdontoConsult** puoi accedere all'archivio delle riviste scientifiche di Elsevier. Segui **OdontoConsult** anche su facebook ([www.facebook.com/Odontoconsult](http://www.facebook.com/Odontoconsult))

## L'epigenetica

### Estella Musacchio ci spiega in che cosa consiste l'Epigenetica

L'epigenetica concerne lo studio dei cambiamenti ereditabili del fenotipo e dell'espressione genica non legati a variazioni della sequenza del Dna, ma realizzati tramite metilazione del Dna, modifiche degli istoni, rimodellatori della cromatina e altri meccanismi molecolari. In pratica, l'ambiente in cui un nucleo si trova è in grado di modificare l'attività dei geni senza però alterarne la sequenza delle basi. All'atto del concepimento, dopo la formazione dello zigote, l'oocita rimodella la cromatina nucleare dando avvio al programma di sviluppo embrionale. Analogamente, il nucleo di una cellula somatica può essere riprogrammato verso uno stato embrionale all'interno di un oocita. In modelli sperimentali è possibile trasferire il nucleo di una cellula somatica in un oocita privato del proprio nucleo e dare avvio a uno sviluppo embrionale vero e proprio, come è stato dimostrato con la "creazione" della pecora Dolly. Questa tecnica, un tempo chiamata clonaggio, è indicata oggi con

l'acronimo Scnt (Somatic cell nuclear transfer) e sono allo studio formulazioni di attivatori genici per la realizzazione di un citoplasto artificiale cioè di una miscela di sostanze che mimino il citoplasma dell'oocita. Sebbene i meccanismi molecolari non siano noti in dettaglio, sono stati identificati quattro fattori di trascrizione indispensabili per la regressione fenotipica di una cellula adulta (Oct4/SOX2/Klf/c-Myc).

La riprogrammazione può essere realizzata anche mediante la fusione nucleare con la creazione di un ibrido tra cellula embrionale e cellula somatica. Il risultato finale è, in entrambi i casi, la reintegrazione/ripristinamento di potenzialità di pluripotenza a un nucleo somatico adulto di una cellula differenziata in modo terminale. Le cellule così prodotte sono indicate con la sigla iPS (induced pluripotent stem cells). Vorrei sottolineare che il loro impiego è attualmente limitato alla sola area sperimentale, non è mai stato effettuato con successo in cellule umane e che in modelli murini sono stati evidenziati molti aspetti controversi e problematici.

$\beta$ catenina, principale induttore del differenziamento osteoblastico, nelle fasi iniziali di molti tipi di cancro, e anche le vie di segnalazione delle Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) interessano fattori coinvolti altresì nelle attivazioni oncogeniche.

Durante lo sviluppo embrionale, le BMPs mediano la transizione epitelio-mesenchimale (Emt), processo grazie al quale le cellule possono migrare verso microambienti diversi per potersi differenziare in tessuti diversi. D'altra parte esiste anche una Emt oncogenica che media l'invasività e il potenziale metastatico di molti tumori.

Per quanto i particolari di questi meccanismi non siano noti in dettaglio, è accettato che l'attività proliferativa delle cellule staminali presenti una certa dicotomia, essendo quiescenti le cellule che sostengono il processo rigenerativo e più attivamente proliferanti quelle preposte al fisiologico turnover del tessuto di appartenenza. Sono state poi descritte negli ultimi anni le cosiddette Cancer stem cells (Csc), cellule staminali cancerose, che rappresentano una sottopopolazione di cellule sfuggite ai meccanismi di regolazione e che possiedono proprietà

iniziatrici del cancro. Dobbiamo sempre avere presenti alcuni concetti:

1. la cellula staminale ha, in condizioni basali, attività proliferativa bassa o assente. La quiescenza è dunque un meccanismo di risparmio ma soprattutto di protezione dall'eccesso di mutazioni che si accompagna a un'attività mitogenetica spinta. Volendo forzare la rigenerazione tissutale, si rischia di comprometterne la fine regolazione e di favorire la trasformazione neoplastica spontanea;
2. le cellule staminali sono resistenti alle comuni terapie antineoplastiche oltre a non essere riconosciute dal sistema immunitario. Rappresentano quindi un ambiente "permissivo" per lo sviluppo del cancro;
3. esistono cellule staminali cancerose che sono alla base dei processi oncogenetici, nonché della progressione e diffusione metastatica del cancro. Queste non sono identificabili a priori e possono essere somministrate inavvertitamente nel corso di un innesto di cellule "sane", rispondendo in modo violento agli stimoli mitogenetici;
4. uno scaffold tridimensionale può indurre la trasformazione in modo pro-

## Estella Musacchio



Laureata in Scienze biologiche e dottore di ricerca in Gerontologia sperimentale e Clinica, Estella Musacchio si è formata presso il dipartimento di Chimica biologica dell'Università di Padova ed è stata Post-Doctoral Fellow presso il Department of Internal Medicine della Yale University (Usa).

porzionale alla durezza del materiale usato, perché rappresenta un ambiente idoneo la cui struttura rammenta quella dello stroma tumorale. È stato recentemente dimostrato dal gruppo del professor Piccolo dell'Università di Padova che gli stessi geni che vengono attivati nel processo di meccanotrasduzione che media il differenziamento di una Msc in senso osteoblastico quando posta su un substrato rigido, sono anche coinvolti nella trasformazione neoplastica.

### Per quanto riguarda le metodiche delineate all'inizio?

I rischi sono, allo stato attuale delle conoscenze, ancora più concreti. Come

accennato, per le iPS gli esperimenti non sono mai stati effettuati con successo in cellule umane e il 20% dei topi prodotti con iPS sviluppano tumori. Infatti i geni necessari per la riprogrammazione includono fattori coinvolti nell'oncogenesi (come per esempio c-myc).

Analogamente, per quanto riguarda la fusione di cellule somatiche con cellule staminali, pur essendo un processo fisiologico che viene molto aumentato in caso di infiammazione e danno tissutale, è altresì possibile la trasformazione neoplastica per attivazione di geni specifici. Le informazioni riguardanti i rischi relativi all'impiego di cellule staminali adulte, oggetto di studio da più lunga

data, sono assai più ampie e dettagliate.

È stata riportata da diversi ricercatori una trasformazione neoplastica spontanea in coltura in vitro. Per quanto ciò sia più frequente nel modello murino non può essere escluso che dopo un numero sufficiente di duplicazioni si verifichi anche nell'umano.

È stata anche ampiamente descritta una trasformazione guidata da scaffold, cioè da un supporto tridimensionale.

Infine, nel caso dell'uso di agenti stimolanti quali BMPs può verificarsi una trasformazione indotta poiché esiste una correlazione tra tasso di proliferazione e acquisizione di eventi mutageni e inoltre la via di segnalazione delle BMPs utilizza moltissimi fattori coinvolti anche nell'oncogenesi.

**Sappiamo molto, ma ancora molto è da scoprire sulla regolazione di queste strategie a livello cellulare e molecolare:** per meglio definire il rischio associato a questi protocolli sono necessari studi clinici controllati con follow-up a lungo e lunghissimo termine.

**In quali casi è assolutamente controindicato l'uso di cellule staminali?** L'impiego di cellule stami-

nali, così come di BMPs, è da evitare in modo assoluto nel caso di necessità di rigenerazione tissutale dopo resezione per neoplasia. Infatti la presenza di cellule cancerose residue, grazie ai meccanismi di fusione cellulare descritti e all'ambiente permissivo fornito dalle staminali, può fare recidivare la neoplasia con un andamento incontrollabile e devastante, come purtroppo si è già verificato nel caso del carcinoma mammario.

### Vuole lasciare un "take home message"?

La medicina rigenerativa rappresenta senza dubbio il futuro verso cui la ricerca e l'applicazione clinica si rivolgeranno.

Allo stato attuale sappiamo però troppo poco sui reali rischi che si associano all'utilizzo di questi strumenti ed è saggio impiegarli con cautela, fintanto che trial clinici controllati condotti su un numero di pazienti molto elevato e con follow-up a lungo e lunghissimo termine non ne avranno dimostrato con rigore scientifico l'assoluta sicurezza di impiego.

È necessario valutare il rapporto rischio/beneficio di ogni intervento e soprattutto informare il paziente in modo chiaro e consapevole. ●