

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE FILOSOFICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOETICA

XXVIII CICLO

**ASPETTI ETICI RELATIVI ALLA CRIOCONSERVAZIONE DI
CELLULE STAMINALI DA SANGUE DI CORDONE OMBELICALE**

TUTOR

Ch. ma Prof.ssa Alessandra Pica

CANDIDATA

Dott.ssa Maria Grazia Ruggiero

COORDINATORE

Ch.ma Prof.ssa Emilia D'Antuono

ANNO ACCADEMICO 2013/2016

INDICE

PREMESSA	pag 6
1. CELLULE STAMINALI: PROSPETTIVE SCIENTIFICHE	pag 7
1.1 Cosa sono le cellule staminali? Significato ed origine	pag 7
1.2 Derivazione e tipologie delle cellule staminali	pag 9
1.3 Rilevanza scientifica delle cellule staminali in ambito terapeutico e della medicina rigenerativa	pag 15
2. DIBATTITO ETICO RELATIVO ALL'USO DELLE CELLULE STAMINALI	pag 22
2.1 Libertà della ricerca scientifica sulle cellule staminali	pag 22
2.2 Status dell'embrione umano: qualcuno o qualcosa?	pag 24
2.3 Dall'embrione umano alle cellule staminali embrionali	pag 33
2.4 Questioni etiche relative all'utilizzo di cellule staminali embrionali	pag 35
2.5 Regolamentazione giuridica italiana ed internazionale	pag 42
2.6 Le cellule staminali e l'etica della comunicazione sociale	pag 45
3. CELLULE STAMINALI DEL CORDONE OMBELICALE	pag 47
3.1 Significato simbolico del cordone ombelicale	pag 47
3.2 Sangue di cordone ombelicale quale fonte di cellule staminali	pag 50
3.3 La donazione e l'etica del dono	pag 55
3.4 Donazione autologa ed allogenica: quali vantaggi?	pag 58

3.5 Origine ed istituzione delle biobanche di cordone	pag 66
3.6 La possibilità di scelta tra banche pubbliche e private	pag 69
3.7 Dibattito etico sulla regolamentazione delle biobanche: analisi comparativa tra pareri di differenti Comitati Etici	pag 72
3.8 Regolamentazione legislativa nazionale ed internazionale	pag 76
PARTE SPERIMENTALE	pag 78
SCOPO DELLA SPERIMENTAZIONE	pag 78
4. CAPITOLO 4	
Introduzione bibliografica	
4.1 La criobiologia	pag 79
4.2 Principi fondamentali della crioconservazione	pag 80
4.3 I principi chimico-fisici del danno criobiologico	pag 81
4.4 La velocità di raffreddamento	pag 82
4.5 Gli agenti crioprotettori	pag 85
4.6 Metodi di congelamento	pag 88
4.7 Conservazione	pag 89
4.8 Crioconservazione cellule staminali emopoietiche da sangue di cordone ombelicale	pag 90

CAPITOLO 5

5.1 Specie reattive dell'ossigeno (ROS) e crioconservazione	pag 91
5.2 Le difese della cellula: difese antiossidanti	pag 93
5.3 La proteina Superossido Dismutasi	pag 95
5.4 La manganese Superossido Dismutasi ricombinante (rMnSOD)	pag 99

CAPITOLO 6

6.1 Definizione e morfologia della cellula staminale	pag 100
6.2 Caratterizzazione e funzione della molecola di superficie	pag 101
6.3 Sottopopolazioni CD34+: analisi fenotipica e funzionale	pag 102

CAPITOLO 7

MATERIALI E METODI

7.1 Principi di Citometria a flusso (CFM)	pag 103
7.2 Raccolta dei Cordoni	
7.3 Estrazione delle cellule mononucleate mediante gradiente di Ficoll-Hystopaque	pag 108
7.4 Isolamento delle cellule staminali CD34+ tramite biglie magnetiche	pag 110
7.5 Valutazione quantitativa e qualitativa delle cellule CD34+ isolate mediante Citometria a flusso.	pag 111
7.6 Trattamento dei campioni: congelamento con rMnSOD	pag 112
7.7 Scongelo dei campioni e determinazione della percentuale vitalità di cellule CD34+	pag 113

CAPITOLO 8

RISULTATI

pag 115

DISCUSSIONE SPERIMENTALE

pag 123

CONCLUSIONI FINALI

pag 125

BIBLIOGRAFIA

pag 128

PREMESSA

L'inconfutabile progresso scientifico e tecnologico nella biologia, così come nelle tecniche terapeutiche, ha dato vita a nuove possibilità, un tempo del tutto inimmaginabili. Esse promuovono l'affermazione di un modo del tutto nuovo di considerare l'uomo e la sua corporeità e aprono a questioni moralmente dilemmatiche. E' umanamente comprensibile che di fronte a questo rinnovato panorama tecnico-scientifico si sia creato nell'uomo un senso di onnipotenza (per il quale altri principi sono stati ignorati): obiettivo all'interno di questo scenario è la "qualità della vita": la ricerca delle migliori condizioni di vita per l'uomo. E' in questo contesto che si inserisce il dibattito sulle cellule staminali, che nell'ultimo decennio è stato oggetto di privilegiato interesse sia nell'ambito della ricerca scientifica e bioetica che nella divulgazione a mezzo stampa nazionale ed internazionale. Il dibattito sulla ricerca nel campo delle cellule staminali, soprattutto al fine di verificarne i possibili e promettenti usi terapeutici, coinvolge a diverso titolo una pluralità di problematiche. Per una corretta valutazione delle possibili scelte terapeutiche è necessario conoscere profondamente le problematiche inerenti la ricerca scientifica e la sperimentazione terapeutica e le implicazioni etiche che da esse ne derivano. La conoscenza dei termini del problema, di ciò che i filosofi medioevali avrebbero chiamato "status questionis" è premessa e punto di partenza per una corretta analisi degli ulteriori risvolti nella loro complessità.

INTRODUZIONE

1. LE CELLULE STAMINALI: PROSPETTIVE SCIENTIFICHE

1.1 Cosa sono le cellule staminali? Significato ed origine

Il mito di Prometeo narra che egli trasgredì le leggi degli dei e fece dono agli uomini del fuoco sottratto a Zeus, e per punizione fu incatenato al Monte Caucaso. Su questo monte, quotidianamente, un rapace gli divorava con ferocia il fegato, che rapidamente si rigenerava. Questa antica leggenda sottolinea, in modo icastico, la straordinaria capacità del nostro corpo di rigenerare se stesso. Questa “miracolosa” realtà è frutto di piccole cellule presenti nel nostro organismo definite *cellule staminali*.

Il termine “*cellula staminale*” compare nella letteratura scientifica a partire dal 1868, tramite studi condotti dal biologo tedesco Ernst Haeckel. Haeckel, che appoggiava fortemente la teoria dello sviluppo di Darwin, descrisse gli alberi filogenetici per rappresentare lo sviluppo degli organismi tramite la discesa da antenati comuni, denominando questi “alberi di famiglia” ed adoperando il termine di “*Stammzelle*” (in tedesco “*Zell*” cellula e “*Stamm*” staminale) per descrivere l’organismo unicellulare dell’antenato da cui si sono generati tutti gli organismi multicellulari evoluti (Haeckel, 1868). L’espressione “staminale” oggi si riferisce a cellule non differenziate, progenitrici di altre linee cellulari che mostrano un elevato potenziale proliferativo. Esse sono per definizione cellule indifferenziate dotate di *long-term self renewal*, ovvero presentano un’elevata capacità replicativa che si estende per periodi indefiniti, mantenendo lo stato indifferenziato, e quindi producendo ulteriori cellule staminali. Inoltre in seguito all’azione di particolari e specifici stimoli, esse sono in grado di

originare uno o più tipi cellulari diversi. Una strategia con cui le cellule staminali possono realizzare questi due compiti è la divisione cellulare asimmetrica, per cui ogni cellula staminale si divide per generare una cellula figlia identica alla cellula staminale madre e l'altra che va incontro al differenziamento. Tuttavia secondo alcuni autori (Morrison & Kimble, 2006), le cellule staminali possono utilizzare anche divisioni simmetriche, che portano alla generazione di cellule figlie che mantengono le caratteristiche di staminalità. Essi hanno ipotizzato che la maggioranza delle cellule staminali possa dividersi con entrambe le modalità, e l'equilibrio tra questi due meccanismi di divisione è controllato da segnali specifici atti a produrre una quota appropriata di cellule staminali o di cellule figlie differenziate.

A seconda della loro capacità differenziativa, le cellule staminali possono essere classificate in:

- **Totipotenti**, in grado di originare sia tessuti embrionali che quelli extraembrionali, quali la placenta e il sacco vitellino. Questa capacità è esclusiva dello zigote (uovo fecondato allo stadio di due cellule);
- **Pluripotenti**, generano tutte le cellule derivate dai tre foglietti embrionali, endoderma, mesoderma ed ectoderma, ma non sono in grado di dare origine alle cellule che compongono i tessuti extra-embryonali.
- **Multipotenti**, possono specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule.
- **Unipotenti**, sono specifiche, ovvero danno origine ad un solo tipo di cellula specializzata (Teo & Vallier, 2010) (Figura 1).

Le cellule staminali possono essere anche classificate in base alla loro provenienza in:

- *Embrionali, fetali*
- *Da cordone ombelicale o sangue placentare*
- *Adulte*

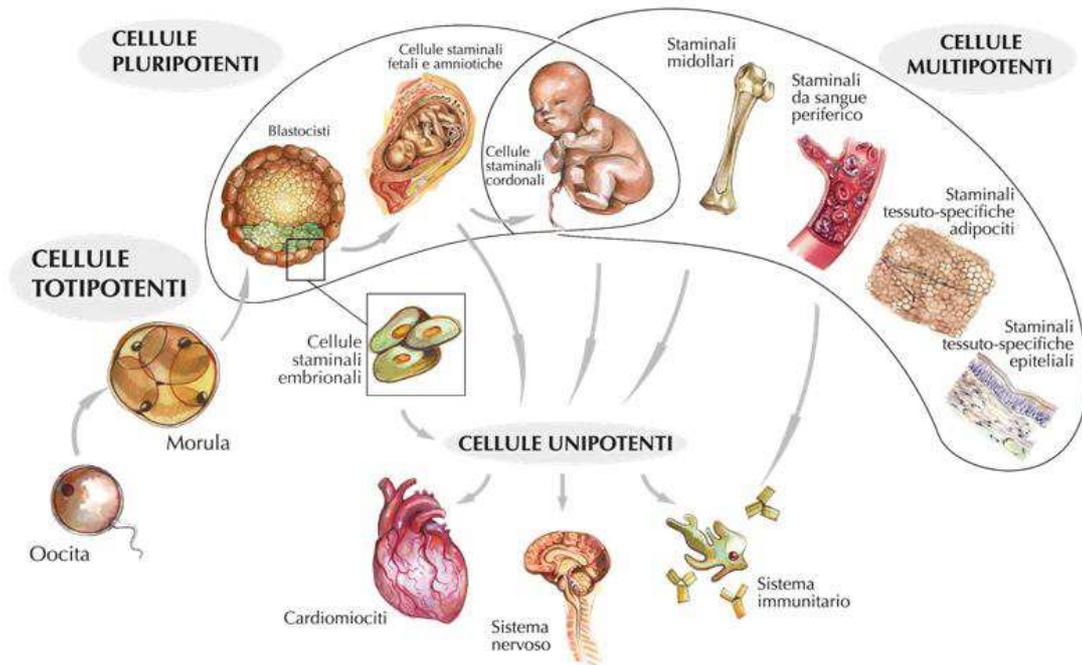


Figura 1. Classificazione delle cellule staminali (<http://stemcells.nih.gov>)

1.2 Derivazione e tipologie di cellule staminali

Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali (*Embryonic Stem Cells, ESCs*) originano dalla massa cellulare interna (o ICM) dell'embrione allo stadio di blastocisti, ovvero a circa 4-5 giorni dopo l'avvenuta fecondazione. La blastocisti appare come una sfera suddivisibile in tre porzioni: *il trofoblasto*, che costituisce lo strato cellulare esterno,

circonda una sezione interna cava e ricolma di fluido, definita *blastocela*, al cui interno si ritrova, una porzione denominata *massa cellulare interna* (*Inner Cell Mass, ICM*), un ammasso di circa trenta cellule in grado di originare l'embrione. Le ESCs possono essere mantenute *in vitro* per lunghi periodi allo stato indifferenziato e successivamente possono essere indotte a differenziarsi. Essendo pluripotenti, sono in grado di generare tutti i tipi cellulari presenti nell'organismo provenienti dai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma). Alla luce delle caratteristiche evidenziate in precedenza, le ESCs potrebbero rappresentare una risorsa notevole utilizzabile nel campo della medicina rigenerativa, se non avessero caratteristiche di crescita così tumultuosa da poter diventare tumorigena. Infatti, occorre sottolineare, che in seguito al trapianto *in vivo*, le cellule staminali embrionali indifferenziate generano grandi tumori definiti teratomi, ovvero tumori benigni che contengono svariati tipi di cellule, alcune altamente differenziate, altre parzialmente indifferenziate, provenienti da differenti foglietti germinali, segno del loro multiforme potenziale differenziativo. Quando includono anche un nucleo di cellule indifferenziate maligne, questi tumori sono definiti teratocarcinomi. Tali cellule indifferenziate maligne sono responsabili del cosiddetto carcinoma embrionale, e rappresentano pertanto le controparti maligne delle cellule staminali embrionali (Blum & Benvenisty, 2008)

Le cellule staminali fetali

Le cellule staminali fetali, come il nome stesso suggerisce, rappresentano un gruppo di cellule primitive localizzate negli organi del feto. Completato sviluppo embrionale (ottava settimana), quando l'aspetto dell'embrione è "umano", questo viene denominato *feto*. Durante il periodo fetale (dalla nona settimana alla nascita) avviene l'accrescimento dei tessuti e la maturazione degli organi formatisi durante il periodo organogenetico (4-8 settimana di sviluppo) (Guillot *et al.*, 2006). Le cellule staminali fetali possono essere isolate non solo dal sangue fetale e dal midollo osseo, ma anche dal liquido amniotico e dalla placenta durante la gestazione, ed inoltre e da altri tessuti fetali, tra cui il fegato e il rene (O'Donoghue & Fisk, 2004; Guillot *et al.*, 2006). La maggior parte dei tessuti fetali contiene cellule staminali pluripotenti che contribuiscono ad un rapido accrescimento e sviluppo degli organi, mentre il sangue fetale è ricco di cellule staminali ematopoietiche che proliferano più rapidamente rispetto a quelle contenute nel sangue del cordone ombelicale o del midollo osseo adulto (Guillot *et al.*, 2006).

Analogamente alle cellule staminali adulte, le cellule staminali fetali sono generalmente tessuto-specifiche, e danno origine a tipi cellulari maturi specifici del particolare tessuto o organo in cui hanno sede. Pertanto, la classificazione delle cellule staminali fetali attualmente appare poco chiara ed al momento vengono raggruppate come le cellule staminali adulte.

Cellule staminali cordonali

Il sangue del cordone ombelicale contiene una miscela altamente eterogenea di cellule. Questa miscela comprende cellule ematopoietiche, tra cui eritrociti e leucociti. Inoltre, il sangue cordonale è costituito da differenti tipi di cellule staminali: cellule staminali ematopoietiche (*Hematopoietic stem cell*, HSCs) che danno origine alle differenti linee cellulari che popolano il sangue e le cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal stem cell*, MSCs), che sono cellule staminali multipotenti simili alle cellule staminali del midollo osseo e pertanto in grado di differenziarsi in cellule del tessuto connettivo (midollo, tessuto adiposo, cartilagine) (Lee *et al.*, 2004). Inoltre, il sangue cordonale contiene una percentuale relativamente bassa di cellule staminali multipotenti non ematopoietiche aventi sulla superficie la proteina SSEA-4, un marker di superficie espresso dalle cellule staminali embrionali, e una varietà di fattori di trascrizione normalmente espressi dalle cellule staminali pluripotenti.

Cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte si presentano come cellule anch'esse indifferenziate, aventi origine da organismi adulti o da organi di essi. Sono caratterizzate da un costante *self-renewal*, tuttavia tale autorinnovamento è più limitato rispetto alle cellule staminali embrionali: infatti, a differenza di queste ultime, le cellule staminali adulte sono multipotenti o unipotenti, e presentano, pertanto capacità differenziativa più ristretta. La funzione primaria di tali cellule consiste nel mantenimento dell'omeostasi del tessuto in cui sono localizzate, e quindi provvedono ad una eventuale riparazione tissutale in seguito a danno ricevuto.

Le cellule staminali adulte sono comparse per la prima volta nella letteratura scientifica agli inizi degli anni sessanta, quando ne furono evidenziati due gruppi principali localizzati all'interno del midollo osseo:

- ❖ Cellule staminali emopoietiche (*Hematopoietic Stem Cells*, HSCs) che danno origine alle varie cellule del sangue;
- ❖ Cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs), definite anche cellule stromali del midollo osseo che danno origine ad osteociti, condrociti, adipociti e alle altre cellule del tessuto connettivo (Till *et al.*, 1961; Becker *et al.*, 1963; Owen, 1988).

Più recentemente, nel 1997 (McKay), e successivamente nel 2003 (Beltrami *et al.*,) hanno evidenziato la presenza di cellule staminali anche in organi, quali il cervello e il cuore, che erano considerati organi privi di capacità rigenerativa. Le cellule staminali cardiache (*Cardiac Stem Cells*, CSCs) sono cellule multipotenti che possono differenziarsi in miociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce e che quindi possono essere utilizzate in caso di danno al miocardio. Cellule staminali adulte sono pertanto, presenti in molti organi, quali cervello, midollo osseo, vasi sanguigni, scheletro, muscoli, pelle e fegato, e, in piccola quota anche nel sangue circolante, tuttavia in percentuale assai limitata. Nei rispettivi organi, le cellule staminali adulte sono localizzate in specifici microambienti, definiti *nicchie*, dove risiedono allo stato quiescente per lunghi periodi; e nel caso di necessità si attivano, iniziano a proliferare, migrando al di fuori delle nicchie e procedendo verso il differenziamento (Urbanek *et al.*, 2006). La struttura delle nicchie è costituita *ad hoc* per garantire le esigenze della cellula staminale e ciascuna cellula staminale, a sua volta, contribuisce

all'organizzazione e alla composizione della nicchia di appartenenza (Fuchs *et al.*, 2004). Nei primi studi effettuati si riteneva che le staminali adulte fossero dotate di capacità differenziativa piuttosto limitata e che potessero differenziarsi solo in cellule con caratteristiche specifiche del tessuto di appartenenza. Studi successivi hanno invece dimostrato che, ad es., le cellule staminali del midollo osseo possono differenziare in cellule nervose o cellule muscolari scheletriche o cardiache e cellule epatiche (Ferrari *et al.*, 1998; Brazelton *et al.*, 2000) mentre le cellule staminali nervose possono dare origine anche a cellule del sangue e cellule muscolari scheletriche purchè trattate con i fattori di crescita e differenziamento specifici per i rispettivi tipi cellulari (Bjornson *et al.*, 1999; Galli *et al.*, 2005; Ponnusamy, 2010). Pertanto, è necessario riconoscere che le cellule staminali adulte sono dotate di una notevole plasticità e che, in virtù di essa, sono in grado di differenziare in cellule di derivazione embriologica differente da quella d'origine.

Cellule staminali pluripotenti indotte

Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) sono create al fine di indurre cellule specializzate a esprimere geni normalmente presenti nelle cellule staminali embrionali. Le cellule staminali embrionali e le cellule staminali indotte condividono numerose caratteristiche, tra cui la possibilità differenziarsi in cellule di tutti gli organi e tessuti, ma non sono identiche. Esse non possono essere considerate nemmeno cellule staminali adulte, ma piuttosto cellule riprogrammate pluripotenti. Utilizzando la riprogrammazione genetica, tramite fattori di trascrizione delle proteine, cellule

staminali pluripotenti, equivalenti alle cellule staminali embrionali, sono state derivate da tessuto cutaneo umano adulto.

Pertanto campioni di sangue crioconservati possono essere utilizzati come fonte di cellule staminali pluripotenti indotte, aprendo prospettive terapeutiche notevoli. Le cellule staminali pluripotenti indotte derivano da cellule somatiche che vengono riprogrammate epigeneticamente per perdere le caratteristiche tessuto-specifiche ed acquisire pluripotenza. Analogamente alle staminali embrionali, tali cellule riprogrammate sono in grado di differenziarsi in ogni tipo cellulare (Wang *et al.*, 2011).

1.2 Rilevanza scientifica nell'ambito terapeutico e della medicina rigenerativa

Le applicazioni terapeutiche delle cellule staminali, in corso già da un decennio, per la cura di diverse patologie, risultano essere altamente promettenti ed utilizzabili anche nell'ambito della medicina rigenerativa. Recenti studi effettuati sulle cellule staminali embrionali, fetali, cordonali, sia amplificate che differenziate, hanno fornito numerose prove a sostegno del loro notevole potenziale utilizzo nel trattamento di malattie genetiche e disturbi degenerativi (Lindvall *et al.*, 2004; Bryder *et al.*, 2006; Mimeault & Batra, 2006; Ruiz *et al.*, 2016; Dziadosz *et al.*, 2016; Wood *et al.*, 2016). In generale le cellule staminali embrionali, fetali, cordonali e adulte (emopoietiche e mesenchimali) mostrano una serie di proprietà funzionali comuni: capacità di auto-rinnovamento e potenzialità di generare progenitori differenziati delle diverse linee

cellulari sia *in vitro*, mantenendo opportune condizioni di coltura, sia *in vivo* dopo trapianto (Mimeault & Batra, 2006).

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche può essere effettuato allo scopo di modificare e sostituire un sistema linfopoietico alterato da neoplasia e pertanto, non funzionante. Tale scopo viene raggiunto effettuando prima la distruzione delle cellule neoplastiche tramite trattamenti chemioradioterapici (mieloablazione) e in seguito procedendo alla infusione di cellule staminali emopoietiche da donatore (*trapianto allogenico*) o precedentemente estratte da paziente e purificate dalle cellule neoplastiche mediante “purging” (*trapianto autologo*). La pratica dei trapianti con cellule staminali emopoietiche preceduti da trattamento con dosi di agenti chemioterapici o radiazioni ionizzanti, contrasta l’effetto mieloablativo conseguente alla chemio-radio con sostituzione del midollo neoplastico con midollo sano nei pazienti neoplastici (Mimeault & Batra, 2006). L’alterazione e la distruzione della struttura tissutale di un organo, conseguenti alla necrosi delle cellule che lo costituiscono, risultano essere alla base della maggioranza delle patologie degenerative che affliggono la popolazione dei paesi industrializzati. Un corretto approccio terapeutico risolutivo mira alla ricostruzione del tessuto alterato tramite trapianto di nuove cellule che abbiano il compito di sostituire quelle distrutte o alterate dalla malattia. A livello clinico questa scelta terapeutica si fonda sul trapianto di organi da donatore deceduto, raramente da donatore vivente, ad eccezione del trapianto di cellule staminali. Tale approccio terapeutico presenta due limiti fondamentali, quali la scarsa disponibilità di organi da trapiantare e la necessità di immunosoppressione cronica per impedire il rigetto dell’organo. Le cellule staminali, a qualsiasi gruppo appartengano,

sia embrionali, fetali, da cordone ombelicale o adulte rappresentano una alternativa valida per la rigenerazione di organi danneggiati. L'espansione *in vitro* di tali cellule, al fine di ottenerne quantità elevate ed in alcuni casi illimitate, potrebbe ovviare le problematiche legate alla disponibilità ridotta di materiale biologico trapiantabile. Per quanto riguarda invece l'aspetto della compatibilità con il sistema immune del ricevente, possono essere utilizzate cellule staminali definite "self" ovvero derivate dal paziente stesso, che in tal caso assumerebbe il ruolo sia di donatore che di ricevente (autotrapianto). Ciò appare possibile per gli epiteli, ma negli organi affetti dalla malattia potrebbero essere presenti cellule staminali già compromesse dalla patologia in sviluppo (Mimeault *et al.*, 2007). Per «*medicina rigenerativa*», si intende un settore della medicina, la cui finalità è il recupero definitivo di tessuti e organi danneggiati, cercando di sfruttare le potenzialità rigenerative delle cellule staminali. Gli approcci di intervento della scienza in tale ambito, sono differenti. Una prima strategia si basa sull'utilizzo *in vivo* e sulla stimolazione farmacologica delle cellule staminali localizzate nei tessuti di interesse, allo scopo di sollecitare il loro potenziale intrinseco riparativo. Un secondo intervento, *ex vivo*, è fondato sul trapianto di cellule staminali, amplificate o modificate geneticamente *in vitro*, che colonizzino il tessuto o l'organo di interesse ed esplicano in quel distretto la loro specifica funzione rigenerativa/riparatrice. Si tratta quindi di una "infusione" di nuove cellule nel tessuto malato, che ha come obiettivo quello di sostituire le cellule danneggiate con cellule sane specializzate, ottenute partendo da staminali. Quindi un passaggio dalla morte alla vita cellulare. Un campo attuale di applicazione riguarda senza dubbio il trattamento di riparazione di epiteli di rivestimento, quali l'epidermide e la cornea. Già

da numerosi anni, sono realtà concreta i trapianti di pelle autologa, in cui il nuovo tessuto cutaneo, viene ottenuto *in vitro*, su apposite matrici di supporto costituite da collagene e matrigel, a partire da cellule staminali cutanee isolate da biopsie della cute del paziente stesso. Il primo successo di tale metodica è stato ottenuto nel 1983, a Boston, dove Howard Green, effettuò un trapianto di pelle coltivata *in vitro* su tre pazienti pediatrici ustionati gravi (Rochat *et al.*, 2007). Da allora numerosi pazienti con ustioni di terzo grado, hanno potuto beneficiare di questo trattamento. Tuttavia la crescita di staminali cutanee *in vitro* ed il successivo differenziamento in cheratinociti necessitano di costi elevati e di tempi piuttosto lunghi per la crescita di lembi di pelle estesi. Inoltre è onesto aggiungere che la pelle ottenuta *ex novo* è priva di ghiandole sudoripare e bulbi piliferi ed appare piuttosto secca, generando anomalie nella termoregolazione e nell'omeostasi fisiologica. In numerosi casi è possibile ricostruire anche l'epitelio corneale, a partire dalle cellule staminali localizzate a livello del *limbus* dell'occhio, una zona ricca di cellule, il cui 10% circa presenta caratteristiche di staminalità, che cinge la cornea. Le staminali limbari, prelevate e messe in coltura, possono rigenerare nell'arco di qualche settimana, una porzione di epitelio corneale, a seguito di innesto. Il primo studio incentrato sulla messa in coltura e la differenziazione delle staminali corneali è stato effettuato da due ricercatori italiani nel 1997 ed in seguito perfezionato dai ricercatori dell'Istituto San Raffaele di Milano (Rama *et al.*, 2010), ottenendo un recupero totale della vista a sei anni dal trapianto. Anche per il trattamento delle patologie cardiache è stato utilizzato il trapianto di cellule progenitrici. La ricerca medica da tempo sosteneva che il cuore fosse uno dei pochi organi, insieme al tessuto nervoso, privi di cellule staminali. In realtà studi

recenti (Chien, 2006; 2008; Xu & Chien, 2011) hanno evidenziato che nel miocardio umano sarebbero localizzati dei progenitori in grado di rigenerare una parte di miocardiociti nell'arco di un quinquennio. Si ipotizza inoltre che le staminali trapiantate riparare il danno ischemico successivo all'infarto miocardico e/o favorire l'angiogenesi e quindi incrementare l'afflusso di sangue al muscolo cardiaco (Passier *et al.*, 2008). I risultati ottenuti sono ancora oggetto di dibattito, sia per la valutazione dell'effettiva capacità rigenerativa, che per la presenza endogena di tali progenitori a livello del tessuto cardiaco. Nonostante i pareri talora discordanti, l'utilizzo delle staminali per rigenerare lesioni cardiache è sicuramente un campo di forte attrattiva per i ricercatori moderni, in particolar modo l'interesse è concentrato sulla sperimentazione per ottenere cellule del miocardio che siano maggiormente simili a quelle della porzione cardiaca oggetto della lesione. E' noto che le cellule del tessuto cardiaco sono differenti per struttura e funzione nei diversi distretti cardiaci. Ad esempio, le cellule cardiache responsabili della conduzione dell'impulso elettrico sono diverse rispetto a quelle che hanno esclusivamente capacità contrattile. Ad oggi le cellule staminali embrionali sono le sole (e le loro omologhe staminali pluripotenti indotte IPS) in grado di differenziarsi in cardiomiociti, in quanto gli esperimenti finora condotti non hanno ancora reso possibile il differenziamento di cellule staminali adulte in cardiomiociti; tuttavia è stato osservato che in caso di trapianto, le cellule staminali adulte contribuiscono al ripristino dell'attività cardiaca anche se con modalità ancora sconosciute e con effetto limitato nel tempo. Nonostante siano capaci di tale elevato potenziale rigenerativo, le cellule staminali embrionali e pluripotenti indotte, in seguito al differenziamento *in vivo* potrebbero contrarsi spontaneamente, generando

indesiderate aritmie. Pertanto sono in corso studi che possano confermare l'utilità delle cellule staminali nelle terapie del cuore infartuato (Menasche, 2011). L'utilizzo delle staminali può essere esteso anche alla cura del diabete, per ottenere la sostituzione delle cellule deficienti nella produzione di insulina nel trattamento del diabete di tipo 2 con cellule sane. Tuttavia, gli studi incentrati sulla produzione di cellule β -pancreatiche insulino-dipendenti attualmente in corso, non sono stati ancora completati. Alcuni lavori preliminari hanno dimostrato la possibilità da parte delle cellule staminali adulte di differenziarsi in cellule β -pancreatiche, ma non sono stati ottenuti risultati convincenti e per funzionalità ed espandibilità delle cellule trapiantate, requisiti entrambi necessari per una applicazione clinica (Borowiak & Melton, 2009). Le aspettative maggiori sono riposte al momento nelle cellule staminali embrionali, che *in vitro* potrebbero riprodurre lo sviluppo fisiologico delle cellule β , partendo dall'endoderma con il dubbio, però, della loro potenziale tumorigenicità. Diversi studi hanno dimostrato che è possibile generare endoderma a partire da cellule staminali embrionali che si differenziano poi in progenitori pancreatici e cellule simili alle cellule β pancreatiche che sono responsive ai livelli di glucosio post-trapianto. Un considerevole risultato è stato ottenuto da Pagliuca *et al.*, (2014), che hanno ottenuto cellule β pancreatiche umane funzionali *in vitro*.

Per il trattamento delle patologie degenerative del muscolo, si può ipotizzare l'utilizzo di cellule staminali con attività miogenica. Tra queste è necessario citare le cellule satellite, ma anche le cellule CD133+ isolate dal muscolo scheletrico o dal midollo osseo, ed i progenitori endoteliali e i mesoangioblasti. Tutte queste cellule possiedono capacità miogenica *in vitro*, tuttavia solo il trapianto di cellule satellite e di

mesoangioblasti, ha ottenuto finora risultati considerabili dal punto di vista rigenerativo. Uno studio condotto dal gruppo di ricerca di Cossu (2003) ha ottenuto l'isolamento dei mesangioblasti ed ha evidenziato la loro specifica capacità differenziativa nei diversi tipi cellulari originatisi dal mesoderma, compreso il muscolo scheletrico. L'infusione di tali cellule, per via endovenosa, in topi distrofici ha ottenuto anche un recupero funzionale dei muscoli ed un conseguente miglioramento anche nel cane spontaneamente distrofico. Alla luce del successo ottenuto dagli esperimenti su animali, di recente è stata avviata la prima sperimentazione clinica su un gruppo ristretto di pazienti distrofici (Tedesco & Cossu, 2012). Anche per il trattamento delle patologie a carico del sistema nervoso è stato sperimentato un approccio tramite l'utilizzo delle cellule staminali. Grazie ai successi ottenuti negli ultimi anni, isolando ed espandendo *in vitro* le cellule staminali neurali umane, ottenute da cervello fetale o adulto, le speranze terapeutiche sono molto aumentate. La malattia neuronale più quotata per il trapianto di cellule staminali è rappresentata senza dubbio dal morbo di Parkinson. Ciò è dovuto alla selettività della lesione e dal numero relativamente limitato e circoscritto di neuroni da sostituire. Le staminali utilizzabili sono le mesenchimali o anche le cordonali, ma i risultati ottenuti finora in ambito clinico non sono a favore di un loro impiego (Petros *et al.*, 2011).

2. DIBATTITO ETICO RELATIVO ALL'USO DELLE CELLULE STAMINALI

2.1 Libertà della ricerca scientifica sulle cellule staminali

Lo sviluppo del corpo umano, prende origine dalla prima cellula staminale che rappresenta il punto di partenza per i 220 tipi cellulari che lo costituiscono. Gli studi, le ricerche, gli approfondimenti, finora effettuati, hanno portato ad avanzamenti sempre più importanti per il miglioramento della qualità della vita umana. I risultati raggiunti sono incoraggianti, ma ancora lunga è la strada da percorrere e sono necessari maggiori spazi e concreti sostegni economici alla ricerca per il raggiungimento degli obiettivi che si propongono mete molto ambiziose. Secondo alcuni ricercatori, il progresso scientifico spesso, appare frenato e osteggiato da riserve di ordine etico, morale e giuridico, che limitano la sperimentazione, come ad esempio l'uso delle staminali non a fine terapeutico ma con obiettivo eugenetico. Tuttavia alla base di tali sperimentazioni, probabilmente, si cela una sorta di insoddisfazione nei confronti dell'essere umano, una misteriosa sensazione di incompiutezza dell'uomo. Ciò rischia di degenerare e scadere nel cosiddetto *transumanesimo*, ovvero il desiderio e la fantasia sfrenata di un potenziale umano privo di limiti (Tomasini, 2007). L'articolo 9 della Costituzione italiana sancisce che “la Repubblica promuove lo sviluppo della cultura e la ricerca scientifica e tecnica”, in aggiunta l'articolo 33 statuisce che “*L'arte e la scienza sono libere e libero ne è l'insegnamento*”. Entrambi i diritti, ben espliciti nella carta Costituzionale, rappresentano il punto di partenza di un dibattito etico che sempre accompagna l'insorgere di innovazioni scientifiche in campo biomedico e non risparmia la ricerca sulle cellule staminali. La libertà di ricerca

non è circoscritta unicamente al singolo ricercatore ma coinvolge la comunità scientifica nel suo insieme. E' necessario che le leggi che regolamentano la ricerca siano sottoposte ad uno *strict scrutiny*, ovvero un'attenta e scrupolosa analisi, nella quale siano considerate opinioni di giuristi, bioeticisti e scienziati. Spesso gli scienziati si oppongono al silenzio delle istituzioni dinanzi ai loro appelli che richiedono un approccio laico apparentemente non influenzato da posizioni ideologiche, in un ambito ricco di possibilità inesplorate. La libertà di ricerca scientifica rappresenta senza dubbio un valore da garantire tramite condizioni che non siano solo proclamate, ma rese effettivamente possibili. Tuttavia come ogni libertà, anche la libertà di ricerca non va intesa come valore assoluto, ovvero indipendente da ogni limite e regolamentazione: il pensiero scientifico non accetta nulla per autorità ma considera solo l'evidenza dimostrabile sperimentalmente o logicamente e rappresenta pertanto conoscenza critica e comunicabile. Autonomia e libertà di scienza non rappresentano tuttavia autodeterminazione. Ogni riflessione sulla libertà di ricerca dovrebbe tenere presente che questa non la si può definire filosoficamente come libertà della scienza ma come libertà del soggetto. Come per la persona umana la libertà non può essere intesa come libertà di ciò che non si è, ma solo di essere e divenire ciò che si è chiamati ad essere, così la libertà di ricerca non può essere intesa come libertà di mettere in atto tutto ciò che è scientificamente possibile e tecnicamente attuabile, ma consiste nell'orientare la scienza verso i fini che le sono propri. Non è pertanto libertà normativa ma libertà orientata da verità che non si pone a priori dal soggetto (Ardigò & Garelli, 1989). Una scienza che rinunciassse al suo legame con la verità e assumesse una visione esclusivamente strumentale e funzionalista della sua attività, vedrebbe

sfumata la sua essenza, scadendo in finalità determinate da forze esterne, quali l'economia, il consenso sociale o il potere politico. La ricerca della verità scientifica, fine ultimo della libertà di ricerca, non avanza esclusivamente analizzando le strade tecnicamente possibili, ignorando le scelte che tali percorsi potrebbero implicare, né si pone alla spasmodica ricerca della "novità" sperimentale ad ogni costo, ma tiene conto di criteri etici e morali che possano consigliare o sconsigliare la scelta di particolari itinerari. Anche nel caso dell'utilizzo delle cellule staminali si è in presenza di un acceso dibattito che impone un'analisi approfondita, che sia in grado di suggerire realisticamente quali siano le prospettive più attenibili, prescindendo da un dibattito teorico di tipo ideologico. Gli interrogativi etici differiscono profondamente a seconda della fonte da cui le cellule staminali sono prelevate. Pertanto è necessario definire quale sia l'origine delle staminali. Assume una valenza assai diversa effettuare ricerche e sperimentazioni su staminali adulte o su staminali embrionali in quanto l'utilizzo di queste ultime comporta sempre la distruzione dell'embrione da cui sono prelevate. E' proprio intorno a tale differenza, o meglio intorno allo *status* dell'embrione, che si accendono i dibattiti bioetici più roventi.

2.2 Status dell'embrione umano: qualcuno o qualcosa?

E' noto che l'interrogativo riguardante l'inizio della vita umana sia una questione che può essere inserita non solo tra le problematiche delle scienze naturali, ma anche tra quelle proprie della filosofia e della teologia. Il nodo gordiano che coinvolge le diverse definizioni di essere umano, di persona e di individuo investe l'embrione ed il suo

statuto ontologico. L'espressione "*statuto ontologico dell'embrione*" si riferisce alla totalità delle caratteristiche che configurano la posizione dell'embrione, e richiede un'analisi approfondita che tenga conto dei differenti punti di vista (scientifico, ontologico, etico, giuridico). Il dibattito fondamentale appare focalizzato sulle incertezze circa l'inizio della vita dell'essere umano, che riguardano in particolar modo ciò che accade nell'arco di tempo che si estende dalla fecondazione, ossia dal momento in cui lo spermatozoo si lega al recettore presente sulla superficie dell'ovulo, sino al suo completamento con l'ottenimento di una cellula uovo fecondata (Zigote) con un solo nucleo, risultato dalla fusione dei due pronuclei e dal mescolamento dei cromosomi/geni con produzione di un nuovo DNA unico ed irripetibile che può ragionevolmente corrispondere ad un nuovo individuo.

Le prime osservazioni empiriche degli embrioni risalgono all'epoca greco-romana. Caspar (1991) cita un testo greco che descrive le strutture visibili di un embrione abortito da sei giorni. Le evidenze ottenute sono servite come fondamento biologico per coloro che hanno sostenuto che l'embrione rappresenta un essere vivo sin dal primo momento della sua esistenza. Tuttavia il costume e le leggi del mondo greco-romano erano fondati sulla concezione stoica, che riteneva il feto come parte della madre, e che la persona avesse inizio solo al momento della nascita. Il diritto romano si basava sul principio *partus nondum editus homo non recte fuisse dicitur* ("Il bambino non ancora nato non è propriamente un uomo"; tale principio è conosciuto come *aforisma di Papiniano*). Infatti, la società romana così come quella greca erano tolleranti in tema di aborto e di infanticidio. Solo all'epoca di Giustiniano si arrivò, non senza resistenze, alla parificazione giuridica tra il delitto di infanticidio e quello di

omicidio. Per Aristotele la generazione dell'essere è frutto dell'azione del seme paterno sul sangue materno. Aristotele sostiene (*De generatione animalium*) che il seme paterno abbia in sé un principio o un impulso che abbia capacità di trasmettere la forma specifica, tuttavia la resistenza della materia materna rende questa informazione progressiva; inoltre l'embrione impiega 40 giorni affinché si trasformi in un corpo organizzato. Prima dei 40 giorni, l'anima nutritiva è in atto, mentre nel seme era in potenza, e l'anima sensitiva è in potenza. Anche l'anima razionale è contenuta in potenza, altrimenti non potrebbe poi passare all'atto. Basandosi su tali considerazioni, Aristotele riteneva che, in certi casi, «bisogna fare un aborto prima che il feto abbia sensibilità e vita, perché l'ammissibilità di quest'atto dipende appunto dalle condizioni di sensibilità e di vita del feto». La filosofia scolastica, riprendendo Aristotele, stabilì l'inizio della forma umana al quarantesimo giorno per i maschi e l'ottantesimo giorno per le femmine. Le ipotesi di Aristotele non ebbero alcun influsso sulla valutazione morale dell'identità dell'embrione da parte dei filosofi e dei teologi cristiani. Gli scritti della Bibbia non affrontano palesemente la questione, ma ribadiscono con forza la chiamata di Dio "*fin dal grembo materno*". Ciò ampiamente sostenuto anche dagli insegnamenti della Chiesa nei primi secoli, che sosteneva il carattere personale dell'embrione tramite la perentoria affermazione dell'inviolabilità della vita umana "*Tu non ucciderai con l'aborto il frutto del grembo*" (*Didaché*, V). I padri della Chiesa San Gregorio di Nissa e San Basilio Magno sostengono l'identità di persona umana dal momento di infusione dell'anima che avviene immediatamente. Tertulliano, che si affianca ai precedenti, si domanda: "*La sostanza del corpo e dell'anima sono prodotte insieme, oppure l'una precede l'altra? Diciamo senz'altro che entrambe sono insieme*

accolte, elaborate, perfezionate" (De anima, 27,1). Sant'Agostino, invece introduce una distinzione tra feto perfettamente formato e feto non completato, e sostiene pertanto un'infusione dell'anima successiva alla completa formazione. Nel Medioevo viene rafforzata la tesi che il feto non sia dotato di anima nelle prime settimane successive alla fecondazione. Opinione sostenuta e ribadita da San Tommaso d'Aquino secondo il quale la creazione dell'anima spirituale da parte del Creatore, presuppone un grado di preparazione della "materia embrionale", di ricettività organica e di strutturazione biologica definita causa dispositiva: pertanto mancando l'anima, non si può parlare di persona. Alla fine del secolo XVII il ricercatore William Harvey evidenziò che l'embrione dispone di una propria circolazione sanguigna e conduce in seno all'organismo materno una sua propria vita. Nel corso dei secoli inoltre, divenne sempre più chiaro che il momento determinante della generazione era l'incontro dei due gameti, che dava luogo ad un nuovo essere, e non l'azione del solo seme maschile sul sangue materno, come sostenuto in precedenza. Nel 1953 James D. Watson e Francis H. Crick riuscirono a decifrare il codice genetico, abolendo ogni possibile interpretazione che l'embrione precoce fosse semplicemente un aggregato cellulare amorfo. Appariva evidente che al momento della fecondazione, e quindi al momento della fusione dell'informazione genetica di origine paterna e materna, si ha la creazione di un nuovo essere individuale, geneticamente differente dai genitori. Sin dalla sua origine l'embrione umano non si sviluppa solo in direzione dell'uomo, ma si evolve come uomo. Da allora in poi successivi studi hanno dimostrato che nello sviluppo dell'embrione c'è identità di soggetto e citando Jerome Lejeune «accettare il fatto che, dopo la fecondazione, un nuovo essere umano è venuto ad esistere non è

più una questione di gusto o di opinione [...]. Non è un'ipotesi metafisica, ma un'evidenza sperimentale». Il punto fondamentale, sul quale pare si sia raggiunta una concordanza, è che l'embrione umano anche precoce, sia un individuo umano vivo. Per contraddire tale evidenza alcune teorie ipotizzano la collocazione dell'inizio della vita non al momento iniziale del processo di fecondazione dell'ovocita, bensì in un momento immediatamente successivo: ovvero al momento dell'assemblaggio dei cromosomi, definito in scienza *singamia*, che si riferisce ad un evento che è postumo all'attivazione dell'ovocita e alla penetrazione in quest'ultimo dello spermatozoo e alla formazione nella cellula di due pronuclei. In contrapposizione alla teoria della singamia, si tende a sottolineare anzitutto l'inscindibilità del processo procreativo, affermando che l'incontro dei due gameti costituisce di per sé l'identità biogenetica dell'essere umano creato ed essa si presenta come radicalmente nuova, unica e irripetibile. La legislazione statunitense (*Court of Appeal of Tennessee 13 settembre 1990, in Dir Fam., 1991, 96*), per prima, enucleò la teoria dell'annidamento (peraltro di recente fatta propria dalla Legislazione italiana), la quale sostiene che una cellula uovo fecondata è differente dall'embrione già annidatosi nell'utero, e che pertanto abbia già iniziato la sua evoluzione. Tale teoria si fondava sul concetto scientifico che la cellula fecondata origina due cellule le quali, a loro volta, si dividono in quattro, otto, e così via, innescando così il processo riproduttivo. Ma dell'insieme delle primissime cellule, solo una parte sono destinate a diventare l'embrione vero e proprio. Le altre, invece, sono adibite a formare la placenta, dentro la quale evolverà in seguito, l'embrione. Prima dell'impianto, inoltre, si ritiene non ancora instaurato uno scambio biochimico tra la madre e l'embrione, scambio necessario allo sviluppo. Pertanto

l'embrione non è considerabile come soggetto autonomo. La teoria dell'impianto si fonda anche su un concetto filosofico, incentrato sull'aspetto relazionale alla base del concetto di persona. Infatti, dal momento che solo con l'impianto si stabilisce una relazione con la madre, prima di esso l'embrione non può essere considerato persona. Da posizione diversa parte una teoria che sostiene che la soglia divisoria tra vita umana e non, sia da fissare al momento dello sviluppo della stria primitiva all'interno dell'ovulo fecondato. Secondo l'embriologia tale sviluppo avverrebbe al 14° giorno della fecondazione. Pertanto, gli embrioni più giovani di quattordici giorni o quelli non ancora impiantati in utero verrebbero definiti *pre-embrioni*. Tale tesi venne adottata dalla Commissione Warnock, nominata dal parlamento britannico nel 1982 per condurre indagini approfondite sull'avanzamento degli studi scientifici raggiunti dalla biomedicina sulla fecondazione umana. Nella nota conclusiva della Commissione, il *Report of committee of inquiry into human fertility and embriology*, si raccomanda la sospensione degli esperimenti sugli embrioni proprio a partire dal 14° giorno post-fecondazione. Questa teoria non appare del tutto convincente, poiché anche prima del 14° giorno dalla fecondazione, l'embrione possiede le caratteristiche dell'unicità e della unitarietà (nuovo DNA, unico e irripetibile). Inoltre durante il periodo anteriore al quattordicesimo giorno, lo zigote possiede l'informazione genetica necessaria e sufficiente a determinare e completare lo sviluppo individuale. Inoltre, tenendo conto degli studi della medicina prenatale, il 14° giorno non rappresenta un passaggio decisivo rispetto agli altri nei quali avvengono processi di sviluppi altrettanto importanti. Un'altra ipotesi, invece, si avvale del concetto di persona solo dopo la formazione del sistema nervoso centrale. Tale teoria si fonda su una visione

utilitaristica, che minimizzando la sofferenza, si appropria della liceità di eseguire interventi su esseri non in grado di provare dolore. Altri ancora sostengono che si possa ritenere vita solo dopo la formazione della corteccia cerebrale: come l'individuo viene ritenuto morto alla cessazione dell'attività cerebrale, al pari può essere considerato vivo solo quando l'attività cerebrale ha inizio. Occorre però sottolineare, che la vita e la morte non possono avere la stessa valenza: la morte è la cessazione anche immediata dell'unità dell'organismo mentre l'inizio della vita è un processo progressivo. Tutte le teorie che identificano l'inizio della persona con l'insorgere delle capacità o delle condizioni per l'esercizio delle capacità hanno una matrice unica che può essere identificata nella visione "funzionalistica": ovvero la persona viene intesa tale dalla rilevanza di alcune proprietà o funzioni. Poiché dunque la persona è ridotta alle sue funzioni, ne consegue che tale condizione sia raggiunta solo acquisendo determinate caratteristiche, quali la razionalità e la volontà. Tuttavia, tale visione funzionalistica cede il passo ad un errore concettuale: il manifestarsi di una funzione (sensitiva, intellettiva, autocosciente, valutativa) presuppone l'esistenza di un soggetto, che renda possibile l'espletarsi delle funzioni. Esse non sono il "soggetto" semmai sono "del" soggetto, ovvero non potrebbero mai esistere se non fossero manifestabili da un soggetto che è in grado di esprimerle ed attuarle (Agazzi, 1992). Si può giustificare che l'essere umano "è" persona in virtù della sua natura razionale, e non "diviene" persona in forza dell'esercizio delle sue funzioni. Tale principio sostanziale consente di riconoscere lo statuto attuale della persona nell'essere umano anche in condizioni di "potenzialità", ovvero quando l'essere umano si trova in stato di non attuazione, momentanea o permanente, di certe funzioni, a causa di uno sviluppo

incompleto o della presenza di fattori che ne impediscono la manifestazione. Di conseguenza l'embrione può essere già ritenuto persona, in quanto, pur non manifestando al massimo grado le proprietà viventi, sono presenti le condizioni che consentiranno l'attuazione di tali caratteri. Nonostante ciò, il riconoscimento dell'identità personale all'embrione non appare una questione del tutto conclusa. Infatti, anche riconoscendo un'identità antropologica all'embrione come persona, non ne derivano necessariamente doveri morali di rispetto o titolarità di diritti, se non presupponendo la dignità della persona. Non essendoci nozioni certe in ambito giuridico circa il momento iniziale della vita umana, il Comitato Nazionale di Bioetica (CNB), nel parere *Identità e statuto dell'embrione umano* del 1996, ha indicato alcune linee guida. In tale studio è condivisa l'idea secondo cui gli embrioni non sono riducibili a materiale biologico, ma rappresentano un segno di una presenza umana che merita rispetto e tutela. Il CNB ribadisce il dovere morale di considerare l'embrione umano, sin dal primo momento della fecondazione, degno di rispetto e tutela, al pari degli individui umani a cui si attribuisce la qualità di persone; indipendentemente dal fatto che all'embrione possa essere o meno attribuita con certezza tale qualità sin dall'inizio. Nel documento si evince che l'embrione non può essere considerato una "res", in quanto la sua stessa natura biologica e materiale lo colloca tra gli esseri appartenenti alla specie umana e, che tale identità personale sussista sin dal primo momento della fecondazione. Per alcuni tale identità è riconosciuta con certezza, mentre per altri viene accolta con alto grado di plausibilità. Inoltre il Comitato ha invitato al rispetto della vita umana, sin dall'origine, invitando al principio di precauzione, in base al quale l'assenza di certezza deve comportare un atteggiamento

di cautela e di astensione da comportamenti che potrebbero risultare nocivi e dannosi. Appare evidente quindi che la questione dell'embrione umano si articola su un dibattito strettamente connesso al tema dei diritti umani. Si registrano una serie di orientamenti normativi nazionali ed internazionali che spesso possono apparire anche in contrasto tra loro. Si pensi alla *Convenzione internazionale sui Diritti del Fanciullo del 1990* (che ritiene necessaria una adeguata protezione della vita umana sia prima che dopo la nascita), continuata con la *Dichiarazione universale sul genoma umano e i diritti dell'uomo* del 1997 dell'Unesco (che dichiara all'art. 11 che "pratiche contrarie alla dignità umana" "non devono essere permesse"). Come anche alle *Raccomandazioni* del Consiglio d'Europa (la 1046 "relativa all'utilizzazione di embrioni e feti umani a fini diagnostici, terapeutici, scientifici, industriali e commerciali" della 1986 e la 1100 "sull'utilizzazione di embrioni e feti umani nell'ambito della ricerca scientifica" del 1989) e alla *Convenzione sui diritti dell'uomo e la biomedicina* del Comitato Direttivo per la Bioetica del Consiglio d'Europa, ove viene ripetuta la priorità dell'essere umano sugli interessi della società e della scienza. Anche la più recente *Carta dei diritti fondamentali dell'Unione Europea* (2000) si richiama al principio della inviolabilità della dignità umana, del diritto alla vita e all'integrità fisica di ogni individuo. Tuttavia spesso le legislazioni nazionali hanno adottato orientamenti molto diffusi, ignorando in parte le indicazioni internazionali e comunitarie. Basti pensare agli Stati Uniti, o al nord Australia, all'Inghilterra o alla Spagna dove sono in vigore direttive molto più liberali rispetto a quelle più rigide di paesi come la Svezia, la Norvegia, la Germania, l'Austria, la Svizzera e l'Italia stessa.

2.3 Dall'embrione umano alle cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali (*Human Embryonic Stem Cells*, in sigla *hESC*) furono identificate per la prima volta nei topi dal prof. Evans nel 1981 ed isolate per la prima volta dal dr. James Thomson nel 1998 (Evans & Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1998). Esse hanno la capacità di originare qualsiasi cellula differenziata e matura dell'organismo (Biswas & Hutchins, 2007). Durante le prime fasi di sviluppo embrionale le cellule sono relativamente indifferenziate e vengono definite *totipotenti*, ovvero possiedono la capacità di differenziarsi in qualsiasi cellula del corpo, dopo circa sette giorni, lo zigote origina la *blastocisti*, che contiene una massa di cellule che diventa prima embrione e poi, raggiunto l'aspetto umano (alla fine dell'ottava settimana) feto, proprio come il tessuto trofoblastico che alla fine, diventa placenta ed altri annessi embrionali. Le cellule staminali embrionali (*hESC*) derivate dal primo stadio di sviluppo embrionale possiedono due caratteristiche fondamentali: auto-rinnovamento e pluripotenza (Kang *et al.*, 2010), inoltre possono essere indotte a differenziarsi in cellule progenitrici o mature specifiche dei tre foglietti germinali embrionali (ectoderma, mesoderma, endoderma) *in vitro*, mediante condizioni di coltura specifiche. Tra queste, ci sono le linee cellulari ematopoietiche, le cellule neuronali, i progenitori gliali, le cellule dendritiche, gli epatociti, le cellule delle isole pancreatiche, gli osteociti, i condrociti, gli adipociti, cardiomiociti, le fibre muscolari ed endoteliali, le cellule del derma, del polmone e della retina (Mimeault *et al.*, 2007). Le cellule staminali embrionali sono potenzialmente in grado di rigenerare ogni tessuto dell'organismo adulto, e quindi controllarne appieno i processi di sviluppo, rappresenterebbe, di fatto, essere in possesso di una fonte inesauribile di cellule e

tessuti per la cura delle malattie degenerative o di importanti lesioni del sistema nervoso centrale, nonché una sorgente di cellule che, *in vitro*, possono replicare qualsiasi tipo di patologia e pertanto costituire un esemplare modello sperimentale. Per numerose patologie, nelle quali viene progressivamente persa la funzione cellulare, l'iniezione di cellule staminali embrionali potrebbe rappresentare una valida opzione. Resta tuttavia l'importante problematicità dell'uso delle cellule staminali embrionali per la loro potenziale tumorigenicità. Quale esempio di tale capacità si può considerare il teratoma, un tumore benigno che si può ritrovare nel neonato, conseguente ad un errore di sviluppo intrauterino, la mancata chiusura del nodo embrionale della linea primitiva, che continua a proliferare creando una massa, interna o esterna, che sarà necessario asportare chirurgicamente dopo la nascita. La scoperta delle cellule staminali embrionali ha permesso pertanto alla ricerca di effettuare notevoli avanzamenti per lo sviluppo di protocolli e strategie per ottenere progenitori tissutali capaci di completare il differenziamento *in vitro* o *in vivo* dopo trapianto. Tramite questi protocolli è stato possibile ottenere dalle cellule staminali embrionali diverse classi di neuroni maturi (ad esempio i motoneuroni che degenerano nella sclerosi amiotrofica laterale o i neuroni dopaminergici che degenerano nel Parkinson), ma anche cellule cardiache, cellule muscolari o del pancreas. Le promesse terapeutiche sono tuttavia ancora piuttosto remote per le caratteristiche di "crescita tumultuosa" di tali cellule. Diversi studi in fase preliminare indicano la possibilità di utilizzarle nella clinica, ma i timori per il loro comportamento tumorigeno a lungo termine permangono. Uno dei principali ostacoli all'uso clinico ottimale di cellule staminali embrionali, è, per quanto sopra esposto, la possibilità di formazione di teratomi o

teratocarcinomi. Infatti, è stato osservato che l'innesto di progenitori cellulari derivati da cellule staminali embrionali in topi immunodepressi, può portare alla formazione di teratomi, ovvero tumori benigni che contengono svariati tipi di cellule, alcune altamente differenziate, altre parzialmente indifferenziate, provenienti da differenti foglietti germinali, segno del loro multiforme potenziale differenziativo (Mimeault *et al.*, 2007). Il principale limite al loro utilizzo, al di là delle questioni bioetiche, è che il loro grande potenziale è un'arma a doppio taglio, che le rende difficili da controllare e quindi suscettibili di trasformarsi in cellule tumorali.

2.4 Questioni etiche relative all'utilizzo di cellule staminali embrionali

La scoperta, le ricerche scientifiche e le applicazioni sperimentali e terapeutiche delle cellule staminali embrionali aprono a formidabili prospettive per la medicina rigenerativa e allo stesso tempo sollevano numerosi interrogativi etici, che sono senza dubbio più profondi quando il dibattito è incentrato sulle staminali embrionali. L'unica fonte di cellule staminali embrionali esistente in natura è l'embrione umano; gli embrioni utilizzati per ottenere queste cellule possono essere anche embrioni soprannumerari creati mediante fecondazione *in vitro* e non più destinati a un progetto procreativo, oppure embrioni creati *ad hoc* con la tecnica del trasferimento nucleare. Gli embrioni soprannumerari, ovvero in eccesso, sono blastocisti umane che non vengono trasferite in utero della madre, e che con il consenso dei genitori sono utilizzate per la ricerca. Da tali blastocisti umane al quattordicesimo giorno di sviluppo, vengono isolate e coltivate le cellule staminali del nodo embrionale, definite blastomeri. E' doveroso ricordare che il prelievo di un gruppo di blastomeri comporta

la distruzione e quindi la morte del vivente allo stadio di blastocisti-embrione, mentre il prelievo di un singolo blastomero, come nel caso della diagnosi preimpianto, può, anche se con rischi, essere completato salvaguardando il futuro embrione. Come descritto in precedenza, il dibattito principale è focalizzato sullo *status* morale degli embrioni e, se il loro utilizzo ai fini della ricerca possa essere moralmente accettabile. La questione appare sempre la medesima: se considerare o meno essere umano l'embrione nel momento del concepimento e nelle fasi immediatamente successive. Dal punto di vista embriologico, la vita inizia con il completamento della fecondazione ed è ampiamente accettato che la vita del soggetto umano sul quale la ricerca viene effettuata, ha il diritto di essere tutelata dal ricercatore e dallo Stato. Il principio di protezione della vita umana è fondato sul rispetto dell'inviolabilità della vita umana stessa e della sua dignità. Se ciò contribuisce a tutelare la vita degli esseri umani viventi, a maggior ragione è necessario il dovere di tutelare la vita dei più deboli, dei più innocenti della società, tra cui senza dubbio possono essere inclusi i non ancora nati. Inoltre prima di procedere ad ogni tipo di sperimentazione, devono essere valutati attentamente i rischi a cui il soggetto umano va incontro rispetto ai benefici che si intendono ottenere dalla ricerca in conformità con il principio della proporzionalità. Essendo l'embrione umano, il protagonista della ricerca biomedica, è necessario valutare pertanto la proporzionalità tra i rischi a cui l'embrione è sottoposto ed il suo effettivo bene, e tutelarlo. L'Associazione Medica Internazionale, nella sua dichiarazione sui principi etici per la ricerca medica che coinvolga i soggetti umani, dichiara: *“E' dovere del medico nella ricerca medica di proteggere la dignità del soggetto umano”* (2000). Anche il Parlamento Europeo ha ribadito la necessità di

assicurare che *“l’embrione umano e il feto siano trattati in condizioni adeguate alla dignità umana... ”*. Tuttavia anche in questo caso si assiste al costituirsi di due opposte posizioni. Da un lato i bioeticisti cattolici e una parte dei laici, sostengono con forza che la dignità umana è una caratteristica intrinseca dell’essere umano, ed essendo l’embrione, un essere umano ne può e ne deve godere pienamente. Ciò implica che l’essere umano non è un mezzo, uno strumento da utilizzare per il raggiungimento di scopi altrui. Kant, nella sua opera *“Grundlegung zur Metaphysik der Sitten”* (1785) afferma che: *“[...] l’uomo e generalmente qualsiasi ente razionale esiste come fine in se stesso, non semplicemente come mezzo per essere usato arbitrariamente da questa o quella volontà, ma tutte le sue azioni, o riguardino se stesso o altri esseri razionali, devono essere sempre considerate allo stesso tempo come un fine”*. Nella ricerca sulle cellule staminali embrionali appare evidente la violazione di tale principio, in quanto l’embrione è distrutto al fine di ottenere possibili applicazioni terapeutiche per altri esseri umani. Opinione non condivisa dalla maggioranza dei ricercatori genetisti e bioeticisti laici, i quali sono persuasi dei benefici ottenuti dall’utilizzo delle staminali ottenute da embrioni soprannumerari, utilizzo che sarebbe in grado di salvare e migliorare la vita di numerosissimi malati. Alcuni ritengono necessario invocare il principio di beneficiabilità: allo scopo di trarre dei possibili futuri vantaggi terapeutici o anche solo conoscitivi, conviene prelevare le cellule embrionali, di conseguenza il sacrificio di questi embrioni umani sarebbe proporzionato ai vantaggi sperati, una giusta soluzione del conflitto tra il diritto alla vita dell’embrione e il diritto dei malati a essere curati con terapie avanzate. Inoltre essi ritengono che l’uso di cellule staminali provenienti da embrioni non impiantabili non significhi una mancanza di rispetto nei

confronti degli embrioni, ma può essere considerato, come sostenuto dal prof. Demetrio Neri, esponente del Comitato Nazionale di Bioetica, nell'Aprile del 2003, *“un contributo da parte della coppia donatrice alla ricerca di terapie per malattie difficilmente guaribili, contributo che deriva da un atto di solidarietà”*. C'è anche chi ha nominato questi embrioni *“episode embryos”* e sostiene che la ricerca che ne fa uso sia lecita e lodevole, in virtù dell'aiuto che ne deriva agli altri. Tuttavia ci si interroga se il benessere del soggetto non debba prevalere sull'interesse della società. A tale scopo è intervenuta, sempre nel 2000 l'Associazione Medica Mondiale, che, nella sua Dichiarazione stabilisce che *“nella ricerca medica sui soggetti umani, considerazioni riguardanti il bene del soggetto umano devono avere la precedenza sugli interessi della scienza e della società”*. In più occorre dimostrare che l'uso degli embrioni umani sia l'unico ed indispensabile mezzo per condurre le ricerche in questo campo. Per l'avanzamento di una sperimentazione umana è necessario rilasciare il consenso informato, e ci si chiede, nel caso di utilizzo di embrioni, chi possa rappresentare il soggetto deputato al consenso. Certamente non si può ricorrere al concetto di patria potestà che manifesta il consenso alla protezione e promozione degli interessi del minore tutelato, che in questa fattispecie è l'uomo allo stadio embrionale. Qui invece si richiede qualcuno che possa concedere il consenso a distruggere l'embrione, e che pertanto lo considera come una *“res”* della quale è proprietario e di cui può disporre a proprio piacere. Così l'articolo 6 paragrafo 1 della Convenzione sui Diritti umani e sulla Biomedicina stabilisce che *“un intervento può essere eseguito sulla persona che non ha capacità di consentire, per il suo diretto beneficio, mentre l'articolo 17 stabilisce che la ricerca sulla persona che non risulta essere in grado di dare il proprio*

consenso è possibile solo se *“i risultati della ricerca abbiano la potenzialità di produrre reale e diretto beneficio alla sua salute”*. In molti laboratori, da diverso tempo, viene condotta un'intensa attività sperimentale alla ricerca di fonti alternative di cellule staminali che non richiedano necessariamente al ricorso agli embrioni. Attualmente le fonti alternative più promettenti sono: a) una variazione della tecnica del trasferimento nucleare che dà luogo a embrioni anormali incapaci di impiantarsi nell'utero, ma in grado di generare cellule staminali embrionali normali; b) la riprogrammazione mediante inserimento di alcuni geni specifici di cellule somatiche adulte che genera cellule staminali pluripotenti indotte; c) la rimozione di una singola cellula da un embrione di 8-10 cellule (con la stessa tecnica usata per effettuare la diagnosi preimpianto, che già è stata dimostrata rischiosa ma non nociva per l'embrione) dalla quale è stato possibile generare svariate linee di cellule staminali embrionali, (recentemente, però, la validità di questa tecnica è stata messa in discussione dalla comunità scientifica internazionale); d) la produzione di embrioni ibridi uomo-animale ottenuti con la tecnica del trasferimento nucleare somatico iniettando il nucleo di una cellula umana in un ovocita di animale (mucca, coniglio). Alcuni ricercatori hanno proposto l'estrazione di blastomeri, e quindi di cellule staminali embrionali, da embrioni prodotti dalle tecniche di fecondazione, che sono già morti per cause diverse e che quindi non sono impiantabili in utero (Landry & Zucker, 2004). In questo caso mentre l'organismo individuale ha cessato di vivere, alcune cellule possono essere ancora vitali, e non coinvolte nel processo degenerativo. Non siamo più dinanzi ad un organismo vivo: è cessata l'attività epigenetica e metabolica. In tal caso sarebbe tuttavia opportuno dimostrare che l'embrione è morto e che quei

blastomeri oggetto del prelievo non potranno mai svilupparsi in un embrione completo. Ai fini dell'accertamento della morte dell'embrione non è sufficiente constatare che il processo di segmentazione e divisione delle cellule embrionali si sia bloccato, come ad esempio affermato su *Stem cells* (Zhang *et al.*, 2006), perché l'unico modo oggi disponibile per conoscere la vitalità di un embrione è trasferirlo nell'utero materno. Inoltre sarebbe necessario dimostrare che l'introduzione delle cellule staminali provenienti da embrioni morti non provoca forme tumorali, infezioni e crisi di rigetto. Nel par. 2 dell'articolo 18 della Convenzione sulla biomedicina, si afferma “*La creazione degli embrioni per gli scopi della ricerca è proibita*”. Ciò vuol significare che nessuna creazione di embrioni solamente ai fini della sperimentazione sulle cellule staminali può essere giustificata. Una delle tecnologie utilizzate per creare questi embrioni destinati esclusivamente alla ricerca può essere la fecondazione *in vitro* oppure il trasferimento nucleare cellulare somatico (TNSA). Quest'ultima si è sviluppata a partire dal 1997, quando sono stati effettuati degli studi che hanno dimostrato che il programma genetico di nuclei di cellule del tutto differenziate può essere completamente modificato (Henig, 2003). Gli esperimenti utilizzati si avvalgono di tecniche di trasferimento nucleare. In realtà si tratta di una vera e propria clonazione con trasferimento di nucleo: viene selezionato un oocita umano, ad esso viene tolto il proprio nucleo al posto del quale viene inserito il nucleo di una cellula somatica dell'individuo da sanare. Questo “oocita ricostruito” si divide e si sviluppa in più cellule che nei primi giorni di vita sono totipotenti, al pari delle cellule embrionali, e che potrebbero poi essere reimpiantate nel paziente escludendo qualsiasi tipo di rigetto. Se tutti i bioeticisti sono concordi nella proibizione dell'uso di embrioni creati

specificamente per la ricerca tramite la tecnica di fecondazione in vitro, la TNSA crea posizioni differenti e divide le coscienze. La Commissione Dulbecco, considera questa “ cellula uovo attivata” non un vero e proprio embrione, al contrario degli esponenti cattolici che sostengono che tale tipo di tecnica rappresenti una vera e propria clonazione anche se in questo caso definita “clonazione terapeutica” e non “clonazione riproduttiva”. Non ci può essere distinzione tra di esse, in quanto è sempre prodotto un embrione che viene distrutto per il raggiungimento di scopi altrui. Senza dubbio la questione riguardante l’utilizzo delle cellule staminali embrionali, va affrontata in tutte le sue implicazioni, adottando un atteggiamento equilibrato che da un lato non sottovaluti i pericoli derivanti dalle tecnologie biomediche, e dall’altro sia lungi dal criticare ed escludere a priori qualsiasi tipo di ricerca sperimentale. La ragionevolezza e la convenienza di un percorso scientificamente rigoroso ed eticamente indirizzato alla ricerca di terapie per malattie che rappresentano piaghe per l’umanità, vengono percepite da numerosi studiosi e medici come un imperativo morale e come una naturale corrispondenza alla propria vocazione professionale. Come ricordato da San Giovanni Paolo II: *“Una guida dell’etica non toglie nulla, naturalmente, all’indipendenza epistemologica della conoscenza scientifica. Piuttosto, essa assiste la scienza nell’adempimento della sua più profonda vocazione che è servizio alla persona umana. Ogni conoscenza della verità - inclusa la verità scientifica - è un bene per la persona e per tutta l’umanità. Ma, come sapete, la verità conosciuta attraverso la scienza può essere usata dalla libertà umana per scopi che sono opposti al bene dell’uomo, il bene che l’etica conosce. Quando in una civiltà la scienza si separa dall’etica, l’uomo viene continuamente esposto a gravi rischi. L’amore per la persona*

umana deriva da una visione della verità dell'uomo, della sua dignità e del suo incomparabile valore”.

2.5 Regolamentazione giuridica italiana ed internazionale

Piuttosto complessa appare la normativa concernente la produzione e l'uso ai fini della ricerca delle cellule staminali embrionali, che essendo ricavate da embrioni umani condannati in questo modo alla distruzione, riflette tutte le incertezze connesse allo statuto giuridico dell'embrione, come soggetto giuridico e titolare di diritti e prerogative tutelate dall'ordinamento italiano. In particolar modo tale questione viene affrontata dalla legge 40/2004 che riguarda la procreazione medicalmente assistita (PMA). Tale legge, assicurando i diritti di tutti i soggetti coinvolti, compreso il concepito, ammette la produzione di embrioni umani *in vitro* solo nell'ambito della PMA (art.1), ma vieta in generale qualsiasi sperimentazione sull'embrione umano, che non sia volta esclusivamente alla tutela della salute e allo sviluppo del singolo embrione. Inoltre tale regolamentazione vieta la produzione di embrioni umani ai fini della ricerca o della sperimentazione, come anche interventi di clonazione terapeutica (art.13). La legge vieta categoricamente anche la clonazione riproduttiva, prevedendo sanzioni penali per “chiunque realizza un processo volto a ottenere un essere umano discendente da un'unica cellula di partenza, eventualmente identico, quanto al patrimonio genetico nucleare, a un altro essere umano in vita o morto” (art. 12 comma 7). Per di più vieta la crioconservazione di embrioni, salvo che nell'ipotesi in cui sia possibile effettuare il loro impianto, e la loro soppressione, fermo restando quanto

previsto dalla legge n.194/197 (legge sull'aborto). La legge 40/2004 è stata tuttavia "svuotata" da alcune recenti pronunce giurisprudenziali, sui contenuti delle quali si rinvia la discussione a testi specializzati sull'argomento. L'aspetto più problematico del dibattito sia in Italia che in Europa riguarda l'eventuale utilizzo ai fini sperimentali degli embrioni soprannumerari, quelli non impiantati per impossibilità o per intervenuto rifiuto della donna. La legge italiana, a differenza di altri paesi europei, mira a contenere anche questa ipotesi prevedendo che le tecniche di produzione degli embrioni "non devono creare un numero di embrioni superiore a quello necessario ad un unico impianto" (art.14, comma 2), tuttavia la donna può sottrarsi alle tecniche di PMA, anche dopo consenso. In tal caso, anche per questi embrioni vale il divieto di un loro uso ai fini sperimentali e della ricerca: qualora vengano ritenuti in "stato di abbandono", verranno sottoposti a crioconservazione. Questa soluzione riflette il parere del Comitato Nazionale di Bioetica che è intervenuto sull'argomento con due pareri che hanno affrontato la questione in una prospettiva interdisciplinare e pluralista: *il Parere sull'impiego terapeutico delle cellule staminali (27 ottobre 2000)* e *il Parere su ricerche utilizzando embrioni umani e cellule staminali (11 aprile 2003)*. Il CNB registra posizioni comuni rispetto al divieto della clonazione riproduttiva e alla liceità dell'uso di cellule staminali da feti abortiti e da adulto per esclusivi fini di ricerca e terapia; registra invece posizioni articolate rispetto all'uso delle cellule staminali embrionali umane. E' comune l'affermazione della illiceità di produzione di embrioni (per clonazione) a solo scopo sperimentale e della illiceità della commercializzazione e brevetto di cellule staminali umane. Alcuni ritengono lecita la derivazione di cellule staminali a scopi

terapeutici dagli embrioni soprannumerari non impiantabili (previo consenso della donna o coppia); tale posizione è motivata dall'intento solidaristico di fare il possibile "per aiutare quanti oggi patiscono gravi sofferenze perché colpiti da malattie di grande impatto sociale e ancora difficilmente curabili"; altri membri del Comitato dichiarano gravemente illecito anche l'uso di embrioni congelati non impiantabili. Il documento comunque si distanzia dall'eccesso di ottimismo rispetto ai vantaggi terapeutici offerti dall'uso delle cellule staminali, al fine di accendere un eccesso di speranza presso l'opinione pubblica e ritiene opportuno sottolineare che i risultati terapeutici sono ancora in corso di sperimentazione. Inoltre va ricordato che la legge italiana, in attuazione della direttiva comunitaria 94/22/CE in materia di protezione giuridica delle invenzioni biotecnologiche, esclude dalla brevettabilità, oltre al corpo umano fin dal momento del concepimento e in ogni sua fase dello sviluppo, anche "ogni procedimento tecnologico di clonazione umana", "ogni utilizzazione di embrioni umani, ivi incluse le linee di cellule staminali embrionali umane" e ogni procedimento tecnico che utilizzi cellule embrionali umane (art.4 Decreto Legge 10 Gennaio 2006, n.3).

In Europa la situazione normativa è piuttosto variegata. A fronte di Paesi, come la Germania, l'Austria e la Svizzera che sono posizionate su una linea di più forte tutela dell'embrione umano, considerato vita umana e soggetto, con conseguente divieto di sperimentazione embrionale, altri paesi come la Gran Bretagna e la Spagna ammettono l'utilizzo sperimentale di embrioni umani fino al 14° giorno dalla fecondazione, il cosiddetto pre-embrione. Queste differenze normative si riflettono nel contenuto della Convenzione di Oviedo (Convenzione sui diritti dell'uomo, sulla biomedicina e sul

divieto di clonazione, 1997-1998), che si limita a prevedere il divieto di creazione di embrioni umani ai fini della ricerca, ma si rimette alle leggi nazionali per quanto concerne la questione degli embrioni soprannumerari. Inoltre il Protocollo addizionale alla Convenzione (1998) di cui è parte integrante, vieta ogni forma di clonazione umana e tale orientamento era stato accolto da tutte le legislazioni europee. Tuttavia il Governo britannico nel 2002 ha autorizzato la clonazione a fini terapeutici, seguito poi dalla Svezia e dal Belgio, mentre il governo spagnolo nel 2006 ha dichiarato l'intenzione di presentare al Parlamento un disegno di legge in tal senso e, nel Giugno del 2007, ha approvato la cosiddetta Legge di ricerca biomedica, con la quale si incentiva e si regola la cosiddetta "clonazione terapeutica", finalizzata al miglioramento della salute dei cittadini. In tal modo la Spagna diviene il quarto paese europeo ad approvare la clonazione terapeutica ed il nono nel mondo dopo il Giappone, l'Australia, Israele, la Corea del Sud e Singapore. Nel Dicembre del 2006 inoltre il Parlamento europeo, ha approvato finanziamenti a progetti di ricerca sulle cellule staminali prelevate da embrioni umani, laddove consentiti secondo le legislazioni nazionali.

2.6 Le cellule staminali e l'etica della comunicazione sociale

Un ulteriore problema etico che emerge in modo ricorrente a proposito delle cellule staminali riguarda l'ambito della comunicazione sociale, e in particolare la completezza delle informazioni trasmesse dai mass media. Leggendo con attenzione editoriali, corsivi, cronache, interviste, o ascoltando dibattiti radiofonici e televisivi, non si può non constatare la parzialità e la lacunosità delle informazioni. Spesso

l'espressione "cellula staminale" viene usata esclusivamente con l'accezione embrionale, come se esistessero solo le cellule staminali di origine embrionale. Anche quando vengono rese note nuove applicazioni terapeutiche, nella maggioranza dei casi non è precisato se si tratta di cellule staminali adulte o embrionali, ed inoltre si può constatare come la maggioranza dei mezzi di comunicazione non dia notizia delle numerosissime applicazioni terapeutiche ottenute grazie alle cellule staminali adulte. Gli stessi mezzi di comunicazione di massa enfatizzano spesso in modo entusiastico i risultati di alcune ricerche che con il passare del tempo si rivelano false, si ricordi a titolo di esempio, l'entusiasmo con cui nel 2004 venne salutato il veterinario sud-coreano Hwang Woo-Suk, celebrato dalla Fondazione Veronesi, come il "ruggito di Seul" perché aveva dichiarato di essere riuscito a clonare l'essere umano. In seguito la comunità scientifica ha dichiarato falsi i dati forniti da Hwang, tuttavia tale smentita ha trovato poca enfasi da parte dei mezzi di comunicazione. Oppure occorre ricordare il caso del ricercatore Lanza (Klimanskaya *et al.*, 2006), il quale nell'agosto del 2006, aveva dichiarato di essere riuscito ad estrarre blastomeri dall'embrione senza comprometterne lo sviluppo. Nei giorni successivi le azioni dell'Advanced Cell Technology, la società dove Lanza effettuava le sue ricerche, subirono una forte impennata. Anche in questo caso però arrivò la smentita dei dati forniti, in quanto le sue dichiarazioni erano prive di fondamento sperimentale, tuttavia Lanza ne uscì a testa alta avendo ottenuto la solidarietà di numerosi colleghi e un consistente finanziamento alle sue ricerche. Quando il prof. Paolo De Coppi (2007) e la sua équipe hanno pubblicato i risultati delle loro ricerche sulle cellule staminali isolate dal liquido amniotico, parte della comunità scientifica ha dimostrato perplessità e scetticismo e il

suo studio non ha ricevuto alcun rilievo. Si ha il dubbio che la divulgazione di successi sperimentali e clinici ottenuti mediante cellule staminali adulte possa dirottare gli investimenti pubblici e privati dei ricercatori che lavorano sulle staminali embrionali alle équipes che lavorano invece sulle staminali adulte. Tutto ciò spesso evidenzia le lacune del mondo della ricerca tecno-scientifica, il quale per quanto possa perseguire i nobili ideali della conoscenza e della cura, è permeato da una potente competizione per aggiudicarsi le sue risorse.

3. CELLULE STAMINALI DA CORDONE OMBELICALE

3.1 Significato simbolico del cordone ombelicale

Il cordone ombelicale, o più propriamente detto funicolo ombelicale, rappresenta l'anello di congiunzione tra il feto e la placenta, consentendo il passaggio di sostanze nutritive dalla madre al feto. Esso origina dal medesimo zigote che genera il feto, ed inizia a svilupparsi a partire dalla quinta settimana di gestazione, sostituendo funzionalmente il sacco vitellino che garantisce gli apporti nutrizionali nei primissimi stadi di sviluppo dell'embrione (Figura 2).

Presenta una lunghezza di circa 50-60 cm e un diametro di circa 2 cm al termine della gravidanza, l'aspetto si presenta attorcigliato come una corda, di colorito madreperlaceo, che lascia trasparire le sfumature scure del sangue all'interno dei vasi. Questi ultimi sono tre: una vena e due arterie, che avvolgono la vena conferendo al cordone una configurazione elicoidale. La vena fornisce al feto il sangue ossigenato

ricco di sostanze nutritive dalla placenta e le arterie hanno il compito di riportare alla placenta il sangue deossigenato impoverito di nutrienti. I tre vasi sanguigni sono avvolti da una sostanza gelatinosa, definita gelatina di Wharton, che provvede alla loro protezione ed impedisce la compressione dei vasi. Esso è collegato al feto all'altezza della zona addominale, in corrispondenza del punto che dopo la nascita diventerà l'ombelico. Il cordone ombelicale presenta un'ampia connotazione simbolica. Le donne indonesiane, per citare un esempio, lo conservano per tutta la durata della vita, in quanto lo ritengono dimora dell'anima in vita e sede di rifugio per l'anima dopo la morte. Fogel (1991) riferisce che nella cultura giapponese dopo la nascita, il cordone ombelicale viene seccato e conservato in una scatola ornamentale per rammentare il vincolo di unione stretta tra madre e figlio. Stessa procedura viene spesso eseguita in Senegal, dove è diffusa la convinzione che un medicamento con il cordone possa avere effetti benefici sui dolori di pancia del neonato. Le popolazioni amerindie o della Polinesia utilizzano diverse strumentazioni per il taglio del cordone a seconda che il nascituro sia maschio o femmina.

In questo modo si vuole sottolineare l'inserimento e l'appartenenza del bambino ad una specifica categoria che si distingue proprio in base al genere. Nel caso si tratti di un maschio, si utilizzano un coltello o una freccia, nel caso di una femmina vengono invece impiegati un fuso o un bastone. Interessante è anche il fatto che il cordone ombelicale viene conservato insieme per esempio ai capelli e alle unghie, per preservare intatto lo spirito vitale del bambino stesso. Numerose credenze e leggende hanno riguardato il cordone ombelicale, in particolare legati alla mitologia dell'antica Grecia. Il mito di Dedalo e del suo labirinto, ad esempio, contiene degli evidenti

richiami simbolici al cordone ombelicale, nel cosiddetto filo di Arianna oppure diventa invece un nastro nel Mito di Afrodite e di suo figlio Eros, i quali, per scappare dal terribile mostro Tifone, si trasformano in pesci. E' la madre Afrodite a legare a sé il suo bambino, per non smarrirlo durante la fuga.



Figura 2. Feto e cordone ombelicale

3.2 Sangue di cordone ombelicale quale fonte di cellule staminali

Fino a pochi anni fa, il cordone ombelicale, una volta reciso, diveniva uno scarto biologico. L'interesse scientifico nei suoi confronti sorse verso la fine degli anni '80, quando furono messi a punto i primi trapianti di midollo osseo e contemporaneamente venne definita la composizione e la caratterizzazione dei componenti cellulari del sangue cordonale. Infatti, oltre alla presenza degli emocomponenti, quali eritrociti, leucociti e piastrine, il sangue del cordone ombelicale è ricco di diverse popolazioni di cellule staminali, in quantità molto maggiore rispetto al sangue periferico. Scienziati e ricercatori hanno individuato tre classi principali di cellule staminali contenute nel sangue del cordone ombelicale: cellule staminali emopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSCs), cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal stem cells MSCs) e cellule staminali multipotenti non emopoietiche (Figura 3).

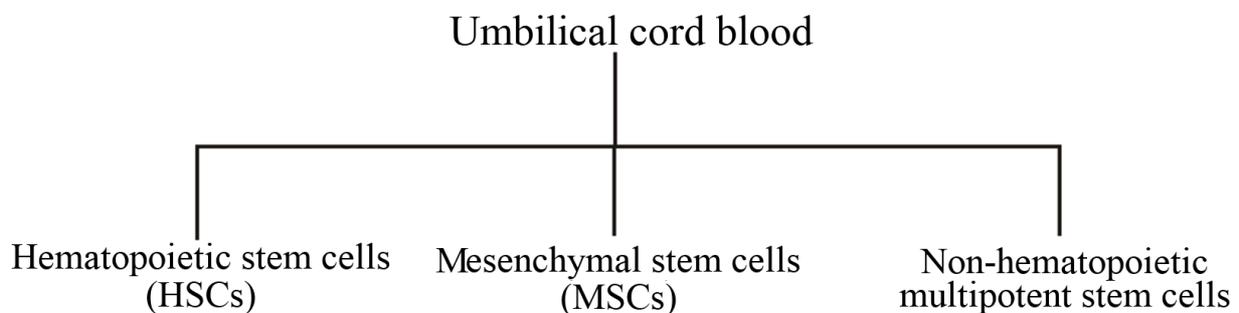


Figura 3. Il sangue del cordone ombelicale contiene almeno tre popolazioni di cellule staminali. Ognuno ha le sue proprietà molecolari e cellulari uniche

Cellule staminali emopoietiche (HSCs)

L'emopoiesi rappresenta il processo di formazione delle cellule del sangue. Tutti i componenti cellulari del sangue originano da una popolazione di cellule staminali multipotenti definite cellule staminali ematopoietiche attraverso una serie di eventi di proliferazione e differenziazione piuttosto complessi (Muller-Sieburg *et al.*, 2002). Il sangue del cordone ombelicale contiene cellule staminali emopoietiche (Hematopoietic stem cells, HSCs) a differenti stadi, caratterizzate dall'espressione di antigeni emopoietici CD133, CD34 e CD45 come descritto inizialmente da Knudtzon nel 1974, mentre a distanza di dieci anni Leary & Ogawa dimostrarono l'esistenza di cellule progenitrici emopoietiche maggiormente primitive. Inoltre è stato dimostrato che le cellule staminali cordonali possono essere differenziate *in vitro* in specifiche linee cellulari emopoietiche, quale linea eritroide, megacariocitaria e monocitica.

Cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs), sono una popolazione di cellule staminali multipotenti riscontrate originariamente nel midollo osseo e capaci di differenziarsi in differenti linee cellulari. Il sangue cordonale si presenta come un'eccellente alternativa al midollo osseo come fonte di cellule staminali mesenchimali. Tali cellule sono state ampiamente studiate in confronto con le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo ed è emerso che, pur essendo morfologicamente e immunologicamente simili a queste ultime, (entrambe mancano di antigeni di superficie quali CD133, CD34 e CD45), presentano una maggiore versatilità differenziativa (Bieback *et al.*, 2004). La presenza di cellule staminali mesenchimali è stata riscontrata anche nella Gelatina di

Wharton (il tessuto connettivo mucoide che avvolge le due arterie e la vena del cordone ombelicale e che fino ad ora è stato considerato come un tessuto privo di utilità): tali cellule sono state differenziate in cellule di tipo osteoblastico, condrocitico, adipocitico, epatocitico e in cellule produttrici d'insulina. Esse inoltre sono state anche differenziate *in vitro* in osteociti, condrociti e cellule neurali ed epatiche (Liu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

Cellule staminali multipotenti non emopoietiche

Una popolazione particolare di cellule staminali non emopoietiche multipotenti è stata, inoltre, identificata anche nel sangue cordonale. Queste cellule staminali sono di piccole dimensioni e sono presenti in bassa densità nel sangue del cordone ombelicale e sono negative al marcatore emopoietico CD45. Inoltre sono state individuate anche alcune cellule progenitrici endoteliali che nel sangue cordonale contribuiscono al microambiente emopoietico. Secondo alcuni ricercatori tali cellule potrebbero avere un ruolo nella terapia angiogenetica e di endotelizzazione nel caso di trapianti di tessuti bioingegnerizzati.

Prospettive terapeutiche derivanti dall'uso delle cellule staminali cordonali

Intorno alla fine degli anni sessanta, l'approfondimento del sistema d'istocompatibilità *human leucocyte antigen* (HLA) aveva portato ad avere i primi successi nel trapianto di midollo osseo allogenico in pazienti affetti da immunodeficienza severa. Thomas nel 1969, creando il "*Seattle marrow transplant team*" istituì il vero e proprio trapianto midollare nella pratica clinica, sia per pazienti neoplastici o leucemici, sia per altri

pazienti affetti da altre patologie ematologiche e immunodeficienze severe. Nel 1988, oltre al trapianto di midollo osseo, si aggiunse la possibilità di trapianto di cellule staminali emopoietiche, autologhe o allogeniche, ottenute tramite aferesi dalla circolazione periferica (Kessinger *et al.*, 1988).

Il ritrovamento nel sangue del cordone ombelicale di cellule progenitrici ematopoietiche ha pertanto creato numerose aspettative tra ricercatori e clinici. Il primo esperimento di trapianto di cellule staminali ematopoietiche isolate dal sangue di cordone ombelicale fu effettuato nel 1972 (Ende), ma il primo successo clinico venne ottenuto nel 1988 da Gluckman, per il trattamento di un bambino di cinque anni affetto da una forma severa di anemia di Fanconi. Dopo questi primi tentativi, l'interesse nei confronti del sangue cordonale, quale fonte alternativa di cellule staminali trapiantabili, è cresciuto notevolmente. Ad oggi il trapianto di sangue cordonale è utilizzato sempre più frequentemente nei bambini e negli adulti che presentano neoplasie maligne, in particolar modo leucemia acuta, che necessitano di trapianto allogenico di staminali ematopoietiche ma che non hanno a disposizione un donatore compatibile tra i familiari (unrelated cord blood transplant) (Slatter, 2006). Inoltre il trapianto di cellule staminali cordonali ha il vantaggio di una più pronta disponibilità in caso di difficoltà a reperire un donatore compatibile, e nonostante la velocità di integrazione cellulare all'interno dell'organismo possa risultare più lenta, si rileva una minore incidenza di insorgenza di reazione contro l'ospite. Nel complesso, comunque, il successo del trapianto dipende in larga misura dalla qualità del cordone ombelicale (numero di cellule staminali) e dal grado di compatibilità HLA tra le cellule contenute nel cordone e il ricevente. La scoperta delle cellule staminali

multipotenti non ematopoietiche uniche nel cordone ombelicale e la possibilità di differenziare queste cellule in molti tipi cellulari diversi presenta il potenziale uso di sangue del cordone ombelicale come strumento terapeutico per una vasta gamma di malattie e disturbi. Ad oggi il sangue cordonale è già stato utilizzato in una serie di studi clinici mirati per il trattamento di alcune malattie neurologiche, tra cui l'encefalopatia ipossico-ischemica e la paralisi cerebrale spastica, e diversi studi scientifici hanno indicato notevoli miglioramenti nei bambini trattati, ma i rapporti ufficiali devono ancora essere pubblicati. In un altro studio attualmente attivo, il sangue del cordone viene utilizzato per il trattamento di persone con lesioni al midollo spinale, o affetti da malattia di Buerger, o con lesioni cardiache o pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1. Gli studi clinici sono ancora in fase iniziale, ma le prime indicazioni suggeriscono che le cellule staminali cordonali posseggono un alto potenziale ed incrementano la speranza verso lo sviluppo di terapie efficaci per i disturbi e le lesioni che hanno larga diffusione. Il sangue non idoneo per il trapianto (percentuale di staminali troppo ridotta) può in alternativa essere utilizzato sia a scopo di ricerca, sia per la produzione di gel piastrinico, un emocomponente per uso topico, di origine autologa od allogenica, ottenuto tramite aggregazione di un concentrato piastrinico messo a contatto con calcio e fattori pro aggreganti biologici (trombina) o farmacologici. L'uso topico del gel, caratterizzato da un'ampia plasticità e modellabilità alla sede di applicazione, accelera la riparazione tissutale sia cutanea che ossea. Esso è di largo uso nella chirurgia maxillo-facciale, ortopedica e nella cura delle ulcere torpide cutanee. La possibilità di non disperdere il sangue cordonale quando

risultato non idoneo per la conservazione a scopo di trapianto rappresenta una valida opportunità di valorizzare il gesto solidaristico della donazione.

3.3 La donazione e l'etica del dono

Oltre alla connotazione simbolica intrinseca del cordone ombelicale, appare evidente una relazione ed un'associazione al significato simbolico del dono.

Nel 1924 Marcel Mauss, un sociologo che ha fornito contributi significativi alla tematica incentrata sul significato della parola *dono*, ha pubblicato il testo “*Essai sur le Don: Forme et Raison de l'Échange dans les Sociétés Archaiques*”, nel quale analizza approfonditamente il concetto del donare. L'autore evidenzia il carattere volontario e insieme obbligatorio della donazione che si articola in tre passi correlati: dare, ricevere e ricambiare. Per Mauss il punto principale è sicuramente il terzo; egli inoltre cerca di individuare quali meccanismi, anche spirituali, inducano a ricambiare il dono che si è ricevuto e analizza quali possano essere i legami di coloro coinvolti nella donazione. Pertanto questa analisi interessa *in toto* la vita sociale, tanto che lo stesso Mauss definisce il dono come un evento sociale. L'intera vita sociale delle comunità da lui studiate, si basa su numerosi scambi, il cui scopo è la creazione ed il mantenimento di legami sociali. L'essenza fondamentale del dono è per Mauss la presenza in esso dello *Hau*, termine che indica il valore simbolico che la cosa acquisisce al momento della donazione e che, proprio in virtù dell'essere donata, oltrepassa l'ambito economico che si riferisce solo al lavoro e alla materia prima di cui è costituita. In seguito, Alain Caillé, nelle sue pubblicazioni, *Critique de la Raison Utilitariste* (1989), e nell' *Esprit du Do* (Godbout & Caillé, 1992), afferma che tali gesti sono esclusivamente dettati

dalla libertà e rappresentano passi decisivi per lo sviluppo di una società migliore. Egli, infatti, tenta di conciliare due aspetti fondamentali del dono: la volontarietà e l'obbligo. Caillé definisce il dono come “qualsivoglia concessione di beni o servizi effettuata senza alcuna garanzia di ritorno, col solo fine di creare, perseverare e rigenerare il legame sociale.” Il dono si colloca in quella zona tra l'obbligo e la libertà, l'interesse e il disinteresse. Il dono è allo stesso tempo scambio condizionale e incondizionale, interessato e disinteressato. Nel 2002, un altro sociologo, Marcel Hénaff, ha descritto tre tipologie di donazione: una forma “cerimoniale” (che richiede l'obbligo a ricambiare), una forma “gratuita” (dettata da una spontanea generosità) ed una forma di “mutuo soccorso” (che denota una dimensione sociale delle comunità). Nel suo testo *“Donner le Temps: la Fausse Monnaie”* il filosofo Jacques Derrida analizza quattro aspetti cardine relativi al tema in questione: alla donazione è necessario associare la reciprocità, colui che è destinatario del dono non può restituirlo, parzialmente accettarlo o rimborsare il donatore, la scomparsa del dono implica la scomparsa del donatore ed infine il dono non può rimanere tale se il suo *status* di “concesso liberamente” svanisce o non è mai comparso. Benveniste nel vocabolario indoeuropeo (1969) evidenzia che nella lingua greca vi sono cinque differenti sensi e termini riconducibili al dono e derivanti dalla stessa radice che indica il dare: *dos, doron, dorea, dosis, dotine*. Il primo, *dos*, di senso molto generale, indica unicamente la valenza positiva del dare “*donare è bene, sottrarre è male*”, *doron, dorea* e *dosis* si concentrano sull'aspetto concreto del dono: ovvero lo scambio e la transazione. *Doron* è il dono in quanto tale, l'oggetto donato, *dorea* indica l'atto concreto di portare e destinare un dono, infine *dosis* indica propriamente l'atto del

donare, ovvero offrire un impegno, una promessa di dono, ma che implica anche la ricompensa o l'offerta di un premio per un'impresa compiuta. Infine *dotine* rappresenta una sorta di dono obbligato ovvero “ un dono offerto ad un capo che si vuole onorare o il dono al quale si è tenuti nei confronti di un ospite”. Pur tenendo conto di queste osservazioni sociologiche e filosofiche, è fondamentale notare che i significati del termine dare non sono esclusivamente simbolici. Essi hanno sicuramente conseguenze pratiche importanti: il dibattito sulla donazione in opposizione alla conservazione autologa del sangue cordonale rappresenta senza dubbio un problema di relazioni sociali. Titmuss, nel suo testo rivoluzionario del 1970 *The Gift Relationship: From Human Blood to Social Policy*, analizza su base sociale i sistemi di reclutamento e donazione del sangue in Inghilterra e Stati Uniti. Secondo Titmuss, il sistema inglese fondato sulla donazione volontaria risultava più efficiente rispetto a quello statunitense fondato sulla remunerazione monetaria, sia quantitativamente sia qualitativamente. La donazione volontaria aveva così anche l'effetto di migliorare i legami di solidarietà sociale e la fiducia tra i membri della comunità. Inoltre egli sostiene che anche la qualità della donazione ne beneficia: infatti, quando l'oggetto della donazione, in questo caso l'autore si riferisce al sangue, assume la connotazione di merce, la sua qualità ne risulta danneggiata. L'uomo è creato per donare, nel dono si realizza e pienamente come tale. Ciò diventa sempre più evidente se correlato alle caratteristiche di gratuità. Diverse possono essere le cause che inducono alla donazione, ma unico è il fine: l'amore verso l'altro. Il dono crea una “catena libera”, poiché esso è contagioso, coinvolge e rinnova. Chi dona innesca un meccanismo di sensibilità, solidarietà, generosità che difficilmente si arresta. Ed è

proprio in questa ottica che si inserisce la donazione del sangue di cordone ombelicale (estendibile anche alla donazione di organi ecc.): essa rappresenta un banco di prova della capacità dell'uomo di elevare la sua dignità. In tal caso il valore del dono riesce a raggiungere vette elevatissime, perché il dono spesso è destinato ad un "altro" senza volto, di cui si ignora la storia e da cui difficilmente si potrà mai ricevere un ringraziamento.

3.4 Donazione autologa ed allogenica: quali vantaggi?

Il sangue del cordone ombelicale (*Umbilical Cord Blood, UBC*) rappresenta una ricca fonte di cellule staminali multipotenti, aventi elevata capacità di rigenerazione e differenziazione nelle diverse linee cellulari dell'organismo. Esse pertanto sono delle quotate candidate per il trattamento di un'ampia gamma di patologie, proprio in virtù del loro potenziale rigenerativo in particolare di cellule emopoietiche, epiteliali, endoteliali e tessuti neurali sia *in vivo* che *in vitro* (Rosenthal *et al.*, 2011). Attualmente le cellule staminali cordonali sono utilizzate con successo per il trattamento di neoplasie ematologiche, quali leucemie e linfomi, ma anche per patologie ematologiche quali insufficienze midollari mono/plurilineari, emoglobinopatie, istiocitosi, disordini congeniti del sistema immunitario. I successi attuali e potenziali ottenuti tramite trapianto e il possibile utilizzo nella medicina rigenerativa delle cellule staminali cordonali hanno creato elevate aspettative scientifiche e popolari e un crescente interesse nell'istituzione e nello sviluppo delle biobanche per lo stoccaggio di unità sangue cordonale e pertanto disponibili ad uso trapiantologico. Nel quadro normativo italiano sono possibili tre tipi di conservazione:

- Conservazione di cellule staminali da cordone per uso allogenico, cioè destinate a riceventi differenti dal donatore, come fine esclusivamente solidaristico;
- Conservazione di sangue da cordone ombelicale destinato al neonato che presenta una patologia al momento della nascita o in epoca prenatale, oppure ad uso dedicato ad un consanguineo che al momento della raccolta manifesti una patologia trattabile con le cellule staminali cordonali previa presentazione di motivata documentazione clinico-sanitaria;
- Conservazione per uso dedicato a famiglie geneticamente predisposte ad avere figli affetti da patologie, per le quali si propone l'utilizzo di cellule staminali cordonali, con apposita dichiarazione clinica rilasciata da uno specialista;
- Conservazione per uso autologo-dedicato, riservato a particolari patologie non incluse nel decreto del 2009, ma per le quali sono riportati dati scientifici accertati che evidenzino la possibilità di utilizzo delle cellule staminali isolate da cordone.

Secondo Rocha & Locatelli (2008), esistono sostanziali, logistici benefici clinici nell'uso allogenico del sangue di cordone ombelicale, rispetto ad altre fonti di cellule staminali per trapianto: a) disponibilità più immediata di unità di sangue cordonale; b) minore incidenza e severità della malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD); c) minor rischio di trasmissione di infezioni da virus latenti, come il citomegalovirus (CMV) e virus di Epstein-Barr (EBV); d) assenza di rischio per il donatore. Tuttavia, esistono anche alcuni possibili svantaggi nell'uso di cellule staminali cordonali, come discusso da Samuel *et al.*, (2008). Il sangue del cordone ombelicale contiene una dose di cellule staminali piuttosto limitata, inoltre il trapianto presenta tassi di fallimento

elevati ed elevata possibilità di infezioni. Recenti studi suggeriscono che questi inconvenienti possano essere ovviati mediante il cotrapianto di due unità di sangue cordonale provenienti da differenti donatori; o anche l'utilizzo di protocolli per l'espansione del volume di sangue cordonale, aumentando di conseguenza anche la quota di cellule staminali. Inoltre sono in corso studi per valutare la fattibilità dell'espansione "ex vivo" delle unità di sangue cordonale (Escalo & Komanduri, 2010). Pertanto, sulla base di tali considerazioni, l'uso allogenico di cellule staminali isolate da cordone sembra soddisfare il principio di beneficenza. Come dichiarato da Di Sciascio *et al.*, (2007) "le cellule staminali hanno l'obiettivo dichiarato di curare o di controllare le patologie che non possono essere gestite tramite i correnti protocolli di trattamento. Pertanto le intenzioni di coloro che mirano all'utilizzo delle staminali si qualificano in linea di principio come positive, in quanto riflettono un punto centrale dell'etica medica: la tutela della vita e la salute del paziente".

Al contrario dell'uso allogenico, per quanto riguarda l'uso autologo delle cellule staminali cordonali non esistono evidenze scientifiche consolidate a sostegno della concreta utilità di tale pratica. Infatti in letteratura scientifica sono riportati solo 3 casi contro i 100.000 per il trapianto allogenico. In particolare il primo caso di trattamento di leucemia infantile risale al 2007 (Hayani *et al.*, 2007), tuttavia ad oggi compaiono gruppi più consistenti di pazienti trattati con staminali autologhe. Studi recenti hanno riportato l'utilizzo delle staminali autologhe nella medicina rigenerativa per il trattamento di lesioni ortopediche, nel trattamento dell'infarto del miocardio e nel trattamento del diabete mellito di tipo 1, e in caso di danni cerebrali, i risultati sono ancora preliminari o necessitano, comunque, di ulteriori approfondimenti (Haller *et al.*,

2008), (Harris, 2009) (Zhao & Mazzone, 2010), (Arien-Zakay *et al.*, 2010). Alcune Società Scientifiche di Ginecologia ed Ostetricia hanno espresso pareri differenti circa la donazione autologa di cellule staminali cordonali. Vi sono due elementi che rendono controproducente la scelta terapeutica del trapianto autologo di staminali cordonali:

- il non beneficiare dell'effetto *graft versus leukemia*, ovvero la reazione immunoterapica verso le cellule malate ritrovabili ancora in circolo, infatti le cellule differenziate a partire da staminali prelevate e infuse nel medesimo paziente, spesso non riconoscono le cellule malate come estranee all'organismo;
- il possibile innesto, oltre delle cellule staminali isolate, anche della radice genetica della patologia che si sta cercando di sconfiggere. (*Ministero della Salute; American Society for Blood and Marrow Transplantation Committee Report.*)

Ciò è particolarmente specifico per la leucemia, nella quale ormai è nota l'esistenza di cellule preleucemiche (Gale *et al.*, 1997), ma anche per emoglobinopatie o altre patologie ereditarie per le quali il difetto genetico è già presente al momento della nascita.

Quando si verifica il caso che in una famiglia un figlio sia affetto, o ci sia il timore che i figli possano essere affetti, da patologie gravi, oppure vi siano evidenze scientifiche per le quali “*sussistano comprovate evidenze scientifiche di un possibile impiego di cellule staminali del sangue da cordone ombelicale anche nell'ambito di sperimentazioni cliniche approvate secondo la normativa vigente*” (Decreto 18 novembre 2009), è proposta e consigliata la conservazione dedicata del sangue

cordone dei figli. In tali casi la sacca viene crioconservata, con le spese finanziarie sostenute dallo Stato, in una struttura pubblica ed il suo impiego è riservato ai fratelli del donatore nel caso in cui manifestino la malattia. La probabilità di compatibilità tra fratelli si aggira intorno al 25% (World Marrow Donor Association). La possibilità di utilizzare le cellule staminali emopoietiche da cordone ombelicale prelevato alla nascita di un bimbo per il trattamento di patologie gravi, non ha posto in secondo piano le considerazioni e le implicazioni bioetiche che riguardano la raccolta e la conservazione di questo materiale biologico così prezioso. In questi anni, numerosi Comitati Nazionali di Bioetica hanno analizzato e approfondito i pareri differenti riguardo l'uso di sangue cordonale, al fine di formulare pareri specifici sia in vista di una legislazione nazionale sia perché necessari per elaborare linee guida alle possibilità di donazione autologa o allogenica. I pareri raccolti in Europa sono stati ricevuti dall'Austria, dal Belgio, Cipro, Francia, Grecia, Irlanda, Italia. Tali Comitati hanno elaborato pareri simili e ben rappresentati nelle conclusioni *del Comité Consultatif National d'Éthique pour les Sciences de la Vie et de la Santé*, Comitato francese che ha evidenziato criticità etiche, in particolare per l'utilizzo di sangue cordonale per uso esclusivamente autologo. Tale tipo di conservazione contraddice il principio di solidarietà senza il quale nessuna società è in grado di perseverare; inoltre sovverte il concetto di donazione volontaria quale patrimonio sociale per la vita, quale elemento fondante e consolidante dei rapporti civili. Se ogni madre donatrice si orientasse verso la donazione autologa, si assisterebbe ad una consistente diminuzione della disponibilità delle unità di sangue cordonale donate ai fini trapiantologici allogenici; ciò comporterebbe tempi di attesa estesi e possibilità di trarre vantaggi da

tale procedura terapeutica notevolmente ridotti. Va tuttavia considerato in particolare il principio di autonomia o il diritto all'autodeterminazione fondati sul diritto di espressione del proprio consenso in conformità a informazioni complete e trasparenti. Beauchamp e Childress (2001) hanno identificato alcuni passaggi essenziali che contribuiscono al rilascio di un consenso informato da parte del donatore: a) la competenza per una scelta volontaria e libera, b) la comunicazione di elementi informativi completi e trasparenti, c) il raggiungimento di un consenso, ovvero una decisione a favore di un progetto e la conseguente autorizzazione a farne parte. Nel particolare contesto che riguarda la raccolta e la crioconservazione di sangue di cordone ombelicale, l'attuazione delle suddette tre fasi del processo di consenso presenta diverse problematiche. Una fondamentale questione riguarda l'appartenenza e l'effettiva proprietà dell'oggetto in esame, ovvero il cordone. Alcuni ritengono che la proprietaria reale sia la madre che, in quanto tale, abbia diritto di concedere o meno il consenso; altri invece ritengono l'effettiva proprietà del cordone attribuibile al bambino, che essendo incapace giuridicamente di esprimere consenso favorevole o contrario delega la decisione ai genitori (Petrini, 2010). Nonostante le differenze tra le normative vigenti, e tra le differenti posizioni di filosofi, giuristi, bioeticisti e scienziati circa lo statuto ontologico del feto, un bambino completamente formato fuori dal grembo materno è riconosciuto come persona avente diritti a tutti gli effetti e pertanto il cordone rappresenta proprietà del bambino nato. Tuttavia quest'ultimo non è in pieno possesso delle capacità di comprensione di ogni aspetto ed è incapace di rilasciare un consenso. Accettando questa interpretazione, è necessario riconoscere che la madre può concedere il consenso a nome del bambino, condividendone la

responsabilità con il padre che dovrebbe essere coinvolto nella concessione del parere. Altri punti rilevanti sui quali è necessario porre l'attenzione riguardano la tipologia di informazioni che sono fornite alla coppia per ottenere il consenso. Nonostante la proibizione di ogni forma pubblicitaria a favore della conservazione autologa, prevista dal Decreto legge del Novembre del 2009, spesso si ricevono informazioni tramite incontri, organizzazioni, e promozioni di siti internet che sponsorizzano la conservazione autologa di sangue cordonale presso banche private. Solo in un secondo momento, le stesse fonti di informazione fanno riferimento al Ministero della Salute e alle banche pubbliche. Inoltre difficilmente viene chiarita la distinzione tra il trapianto autologo ed allogenico di cellule staminali emopoietiche, ed esiste una radicata tendenza, anche da parte di medici legati a banche private, ad interpretare i dati della ricerca di base in maniera troppo favorevole. Non a caso infatti il Comitato Nazionale per la Bioetica raccomandava la *“predisposizione di idonei strumenti di informazione del pubblico non specialistico in ordine alle realistiche applicazioni terapeutiche delle cellule staminali derivate da cordone ombelicale, confortate dagli sviluppi delle conoscenze scientifiche a riguardo”*. Una unanime uniformità di giudizio si registra sulla tempistica con cui il consenso informato deve essere ottenuto. Numerose Associazioni mediche e Comitati Etici internazionali, raccomandano che le informazioni necessarie e precise siano rilasciate ai genitori con ampio anticipo rispetto alla data prevista per la nascita del figlio, al fine di poter concedere il giusto lasso di tempo per approdare ad una scelta consapevole e decisa. L'Accademia Americana Pediatri, suggerisce addirittura che le coppie che abbiano rilasciato

consenso favorevole prima del parto, confermino la loro scelta anche dopo il parto stesso (American Accademy of Pediatrics Policy Statement, 2007).

Secondo la *American Medical Association* (2007) “Il consenso informato per la raccolta di cellule staminali del sangue del cordone ombelicale deve essere ottenuto, quando possibile, prima dell’inizio di ogni possibile attuazione. I possibili legami di medici con banche pubbliche o private di sangue cordonale devono essere comunicati durante il processo di consenso informato. Gli addetti ai lavori non possono accettare in alcun modo finanziamenti o incentivi per la fornitura di campioni alle banche”. In Italia ci sono due possibili vie da intraprendere per la raccolta del consenso informato. Per la conservazione ad uso autologo, le strutture specializzate, individuate dalle regioni, forniscono e ricevono il foglio informativo sottoscritto poi dalla coppia consenziente. Inoltre, in tal caso, la coppia donatrice prende contatti diretti con la o le banche private scelte per la donazione e con esse stipula un contratto diretto. In caso di donazione allogenica, il consenso informato viene raccolto dopo colloquio informativo dal presidio ospedaliero, dove avverrà la nascita del bambino. Occorre ricordare che in altri paesi sono in vigore leggi che impongono ai medici o agli ostetrici, che sono coinvolti nella raccolta e nella conservazione di sangue di cordone ombelicale, di dichiarare qualsiasi possibile conflitto di interesse e la quota del compenso attribuita loro per lo svolgimento di tale attività.

3.5 Origine ed istituzione delle biobanche di cordone

Un punto di svolta per il progresso scientifico e tecnologico è avvenuto nel 2003, con la mappatura, completata poi nel 2006, del genoma umano, tramite *lo Human Genome Project*, progetto al quale hanno partecipato scienziati quale, tra gli altri, James D. Watson. Da allora le biotecnologie sono avanzate e sono pertanto emerse esigenze nuove, che hanno portato alla necessità di conservazione di materiali biologici utilizzabili ai fini della ricerca e di identificazione e classificazione. Nasce da qui il fenomeno del “*Bio-Banking*”, ovvero viene creata una nuova struttura definita biobanca. Il Consiglio d’Europa, nella Raccomandazione del Marzo 1994, ha definito la biobanca come “*Un’organizzazione no-profit che deve essere ufficialmente riconosciuta dall’autorità sanitaria competente negli stati membri e che deve garantire il trattamento, la distribuzione e la conservazione del materiale secondo certi standard di qualità e di professionalità*”. Un’altra definizione sovente citata nei documenti internazionali è quella estratta dalle *Regulations dell’European Biobank dell’Università di Maastricht*, che indicano la biobanca come “una unità operativa che fornisce un servizio di conservazione e gestione del materiale biologico e dei relativi dati clinici, in accordo con un codice di buon utilizzo e di corretto comportamento e con ulteriori indirizzi forniti da Comitati Etici ed Università” (De Robbio & Corradi, 2010). Dal punto di vista scientifico, il termine “*biobank*” risale al 1996, quando apparve per la prima volta in articolo pubblicato da Loft e Poulsen, due ricercatori di clinica farmacologica dell’Università di Copenhagen. In questo studio la biobanca è indicata come sede di svolgimento di attività di stoccaggio e conservazione di materiale biologico, destinato a fini diagnostici, terapeutici o di ricerca. Nel lavoro

in esame, dunque, si richiamava il contesto della ricerca biomedica. Seguendo la classificazione stilata dal *Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure* Italia, le biobanche umane, che raccolgono cellule, tessuti, sangue e derivati, liquidi biologici, linee cellulari e acidi nucleici, possono essere suddivise in tre grandi aree: a) Biobanche orientate alla malattia, b) Biobanche di popolazione, c) Tessuti d'archivio. Tra le biobanche orientate a malattia, un numero consistente è rappresentato dalle banche oncologiche e genetiche, ma esistono altre biobanche che si occupano di patologie cronico - degenerative, quali diabete, malattie cardiovascolari, morbo di Alzheimer. Tuttavia nell'ultimo decennio sono incrementate le banche ad indirizzo terapeutico, quali le biobanche di cordone ombelicale e di cellule staminali, che raccolgono e conservano campioni idonei all'utilizzo clinico per fini terapeutici. Come già espresso in precedenza, il sangue cordonale rappresenta una ricca fonte di cellule staminali emopoietiche, simili alle cellule staminali localizzate nel midollo osseo. Fino ai primi anni '80 del secolo scorso, il trapianto di cellule staminali emopoietiche era esclusiva dei pazienti affetti da leucemie acute e le cellule staminali innestate erano di provenienza del midollo. Risale invece al 1988 (Gluckman *et al.*,) il primo trapianto di cellule staminali emopoietiche provenienti da sangue di cordone ombelicale: si trattava di un paziente pediatrico affetto da anemia di Fanconi, al quale furono trapiantate cellule staminali isolate dal cordone della sorella. La possibilità concreta che le cellule staminali emopoietiche contenute nel sangue cordonale, potessero rappresentare una valida alternativa, almeno per i bambini, al sangue midollare, aprì nuove prospettive terapeutiche, inducendo l'istituzione di banche adibite alla crioconservazione di sacche di sangue cordonale in tutto il mondo. La

prima banca per la conservazione di sangue cordonale è sorta a New York nel 1991, ad opera di Rubinstein, creata in seguito al successo del primo trapianto di cellule staminali emopoietiche isolate da cordone ombelicale, trapianti che si sono susseguiti anche negli anni successivi con risultati favorevoli (Rubinstein *et al.*, 1995; Kurtzberg, 1996). I risultati ottenuti hanno suggerito l'opportunità di disporre a livello mondiale, di una quantità di sangue cordonale selezionato e di elevata qualità. Inoltre sono incrementati gli sforzi da parte dei ricercatori per lo sviluppo di protocolli volti a migliorare la raccolta, lo stoccaggio e il rilascio di unità di sangue cordonale per il trapianto in pazienti che avessero o non avessero legami di parentela con i donatori. La constatazione che la malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD) era ridotta nei trapianti di sangue cordonale rispetto ai trapianti a base di midollo, ha stimolato ulteriormente la necessità di istituire banche sul modello adottato da Rubinstein. Infatti, le prime banche pubbliche compaiono tra il 1992 e 1993 anche in Europa (Parigi, Milano, Dusseldorf, Liegi, Regno Unito). Ad oggi il *Bone Marrow Donors Worldwide* (BMDW), fondato nel 1988 a Leiden (Olanda), costituisce il più grande registro internazionale di donatori di midollo osseo e l'organizzazione che gestisce a livello mondiale le banche di sangue cordonale, fornendo informazioni centralizzate e anonime. Esso rappresenta un database ampissimo, contenendo circa 14 milioni di donatori di cellule staminali cordonali e gestendo una rete di circa 44 banche cordonali in ben 26 paesi. Inoltre nel 1994 è sorta l'*European cord blood banking group* che si occupa di regolare la raccolta, la conservazione delle unità di sangue ed inoltre identifica linee guida etiche e giuridiche per regolamentare la cooperazione internazionale in questo settore (Gluckman, 1994).

3.6 La possibilità di scelta tra banche pubbliche e private

La dimostrazione che le cellule staminali isolate da cordone ombelicale rappresentavano una valida alternativa al sangue midollare per i trapianti, ha favorito la costituzione di banche per la crioconservazione di sacche in tutto il mondo. Si possono identificare differenti tipi di banche in base all'aspetto giuridico (pubblica o privata), in base al tipo di attività condotta (profit o no profit) e anche in base al tipo di donazione (allogena, autologa o dedicata). Le *banche pubbliche* accreditate no profit ricevono il sangue del cordone ombelicale in seguito al consenso informato dei genitori. Le sacche sono analizzate e ne viene valutata l'ammissibilità per la conservazione (quota rilevante di cellule staminali, assenza di patologie). Se l'unità di sangue soddisfa i suddetti requisiti, viene inserita in registri mondiali a disposizione dei centri nazionali ed internazionali di trapianto (Querol *et al.*, 2012). In questo caso il sangue cordonale diventa proprietà della banca pubblica per il successivo uso clinico. Circa il 20% delle unità di sangue cordonale raccolto soddisfa i criteri stabiliti per la crioconservazione (Sun *et al.*, 2010). I campioni non ammessi alla crioconservazione possono essere destinati alla ricerca, e in tal modo la società riceve un beneficio anche dai cordoni di scarto (Bordet *et al.*, 2010). La maggioranza delle banche coopera tra loro attraverso banche dati consultabili pubblicamente, quali l'Associazione mondiale donatori midollo osseo (Bone Marrow Donors Worldwide, BMDW), la fondazione NETCORD, la National Marrow Donor Program (NMDP) e numerosi registri nazionali, al fine di fornire un libero accesso a tutti i pazienti in necessità. Nelle *banche private* di sangue cordonale, i campioni vengono raccolti e

conservati per uso individuale da parte delle famiglie e rimangono di proprietà del bambino sotto la tutela dei genitori. In tal caso, la donazione presso la banca privata può essere destinata ad uso autologo o allogenico, ovvero per il donatore neonato o per qualche membro familiare che ne necessitasse, ma sono esclusivi della cerchia familiare e non disponibili per il pubblico. Ed è proprio quest'ultima la critica più forte che viene obiettata alle banche private (Smith, 2011). Inoltre dati clinici e scientifici dimostrano che le possibilità che l'individuo trapiantato con il suo stesso sangue cordonale sviluppi la patologia nuovamente, sono comprese tra lo 0.04% e lo 0,005% (Annas, 1999). Nel registro mondiale del Bone Marrow Donors Worldwide si riporta che circa 650.000 unità di cordone anonime sono state raccolte, conservate e registrate al sito web della BMDW (BMDW Marrow Donor di: <http://www.bmdw.org>). Non è nota la quota di campioni raccolti e crioconservati nelle banche private: due delle più grandi banche private degli Stati Uniti indicano sui loro siti web che dispongono di circa 500.000 unità memorizzate ognuna. Tuttavia circa 35.000 trapianti emopoietici di cellule staminali sono stati effettuati tramite le donazioni allogeniche, contro i <1.000 trapianti autologhi negli ultimi decenni (Armitage, 2016). Esistono inoltre ulteriori modelli di banche oltre agli standard pubblici e privati: banche a direzione familiare, banche miste, ed altre. Ad esempio nel Regno Unito, Branson ha lanciato il Virgin Health Bank, un esperimento innovativo a doppio bancaggio pubblico e privato: il 20% del campione viene crioconservato ad uso privato per il bambino e per la famiglia del donatore, l'80% diviene pubblico e quindi accessibile a chiunque nel mondo senza alcun costo. La sfida della Virgin Health Bank è quella di combinare le potenzialità note della donazione allogenica con le applicazioni di uso autologo (Lancet, 2007).

Occorre sottolineare un aspetto fondamentale relativo alle banche private: esse impongono una tassa all'accettazione del campione (di solito compresa tra i 1300 e i 1700 €) ed in più una quota annuale di conservazione (Ballen, 2010). Diversi studi hanno stimato che esiste un numero sopraelevato di unità di sangue cordonale crioconservate rispetto alle reali esigenze della popolazione. La quantità di unità da conservare nelle banche, i vantaggi in termini di effettivi trapianti pertanto dovrebbero essere valutati tenendo conto anche dei costi. Identificare la dimensione appropriata delle strutture di crioconservazione appare fondamentale non solo per ragioni cliniche (al fine di garantire una corrispondenza tra domanda e offerta), ma anche ragioni di sostenibilità economica (Petrini, 2014).

I costi per ogni unità di sangue cordonale crioconservato in banche pubbliche ai fini trapiantologici, riportati dalle reti internazionali, sono stati oggetti di numerosi studi da parte di differenti autori. Secondo Sirchia *et al.*, (1999), i costi per ogni unità crioconservata ottengono un recupero dopo circa 10 anni. Uno studio più recente, Howard *et al* (2005), ha stimato che il costo per ogni unità rilasciata in una banca pubblica varia tra \$ 15.336 (per un inventario di 50.000 unità UCB) e \$ 92.675 (per un inventario di 300.000 unità).

Numerosi gruppi di ricerca continuano a indagare sull'utilità dell'uso di sangue cordonale a scopi terapeutici, in particolare per il trattamento di disordini emopoietici ma anche per riparare i danni causati da malattie cardiache e infarti, diabete mellito, patologie cerebrali e midollari, lesioni traumatiche e ictus (Kogler *et al.*, 2009). Secondo alcuni autori la rivalutazione dell'utilizzo autologo di sangue cordonale ai fini terapeutici e sperimentali, motiva un attento riesame nei confronti delle banche private

(Rosenthal *et al.*, 2011) e in particolare andrebbero incoraggiate le banche di sangue cordonale definite “familiari” (Gluckman *et al.*, 2011). Il sangue cordonale, sia se donato ad una struttura pubblica, privata o familiare, rappresenta un prodotto cellulare unico. Al fine di garantire il successo dell'utilizzo di tale fonte biologica sia ad uso autologo che allogenico ed esprimere la reale potenzialità di esso, è essenziale che siano seguiti gli standard internazionali. Il settore medico che si occupa del sangue cordonale, le banche pubbliche e private, i donatori e i riceventi devono collaborare per migliorare la qualità delle banche e creare nuove opportunità che contribuiscano al benessere dell'individuo e della società.

3.7 Dibattito etico sulla regolamentazione delle biobanche: analisi comparativa tra pareri di differenti Comitati Etici.

Il crescente utilizzo del sangue cordonale nella prassi clinica rende necessaria un'attenta riflessione etica sia sul suo utilizzo, sia sull'istituzione delle banche per la raccolta, la conservazione e la distribuzione di esso. Allo stato attuale, il pensiero etico è polarizzato e diviso tra coloro che sostengono che vi è un insieme di principi comuni a tutti gli esseri umani, indipendentemente dalle differenze di religione, politica e cultura; e coloro che ritengono che i principi etici sono specifici e diversi per ogni cultura. Coloro che appartengono al primo gruppo ribadiscono i principi comuni alla base della tradizione etica della medicina: ovvero il principio di beneficenza, della non maleficenza, dell'autonomia e della giustizia (Beauchamp & Childress, 2001). L'obbligo etico di beneficiare il paziente, esponendolo al minimo rischio possibile, è la

considerazione di base per affermare la validità dell'uso di cellule staminali emopoietiche cordonali nel trattamento di malattie specifiche. La scelta di utilizzo di sangue cordonale a dispetto del midollo osseo prevede una serie di motivazioni, quali una assenza di rischio medico per il donatore, una disponibilità immediata delle unità conservate, una maggiore possibilità di avere campioni per le minoranze etniche. A questi vanno aggiunti ulteriori possibili vantaggi ottenibili, quali un numero di cellule staminali sufficienti a garantire l'attecchimento sia negli adulti sia nei bambini, minore rischio di sviluppare malattia contro l'ospite (GVHD) dopo trapianto, essendo il neonato da cui viene prelevato il cordone "immunologicamente" debole (Wagner & Gluckman, 2010). Il principio di beneficenza spesso però viene violato o ignorato dalle banche private, in quanto prospettano spesso false promesse, come quella di una "assicurazione biologica" per la quale tuttavia non esiste nessuna prova scientifica; inoltre è assicurata la conservazione e la disponibilità illimitata e pronta in ogni momento della vita del donatore. Secondo uno studio compiuto da Broxmeyer (2010), i campioni di sangue cordonale potrebbero essere conservati in buone condizioni fino a ventitré anni. L'obbligo ippocratico della medicina impone la necessità di *primum non nocere*. Non è noto se nelle banche private per ragioni economiche o di lucro, le unità di sangue conservate siano sottoposte agli stessi controlli richiesti per la conservazione in banche pubbliche, il che potrebbe comportare una qualità inferiore rispetto all'unità crioconservate nelle banche pubbliche (Sun *et al.*, 2010). Se lo Stato rispetta il principio di autonomia, garantisce anche il diritto delle persone di scegliere liberamente. L'ottenimento del consenso informato rappresenta un passaggio indispensabile per assicurare il rispetto dell'autonomia della donna donatrice. Inoltre

sono necessari la salvaguardia della riservatezza ed il rispetto della privacy della donna e del bambino, applicando le medesime cautele ordinariamente richieste dalla raccolta di sangue per differenti finalità mediche. Ancora, occorrerà assicurare adeguatamente il rispetto della confidenzialità nelle eventuali relazioni tra la donna donatrice e la banca in cui le unità di sangue sono conservate. Coloro che promuovono le banche pubbliche sostengono che ogni decisione individuale libera sia espressione del rispetto del principio di giustizia sociale, infatti le banche pubbliche, essendo supportate economicamente dallo Stato, sono in grado di rispondere alle esigenze di salute di tutti i cittadini, tenendo conto del diritto alla salute di tutti. Al contrario i promotori delle banche private ritengono che non tutte le azioni debbano essere regolate dalla solidarietà sociale, essendo quest'ultima una scelta del tutto volontaria. Per quanto tale posizione sia ragionevole, è necessario ammettere che spesso la mancanza di solidarietà priva di valore le azioni libere individuali. Ad oggi 9 Comitati Etici degli Stati membri della UE hanno pubblicato pareri circa il bancaggio di sangue cordonale e ogni valutazione etica è stata fondata su dati scientifici e clinici in possesso. La maggioranza dei pareri possono essere riassunti nei principi elencati dal *the European Group on Ethics in Science and New Technologies (EGE)* nel suo parere n.19 "*Ethical aspects of umbilical cord blood banking*" pubblicato a Marzo del 2004. Secondo L'EGE ci sono diversi principi etici fondamentali che devono essere considerati per le banche di sangue cordonale: rispetto della dignità umana, dell'autonomia, principio della giustizia sociale e della solidarietà, principio di beneficenza e della non maleficenza, rispetto della privacy e della proporzionalità tra mezzi e obiettivi. Tutti i comitati sottolineano l'importanza delle banche pubbliche per il trapianto allogenico

mentre l'attenzione e la rilevanza all'uso autologo sono piuttosto ristrette. La maggioranza delle opinioni suggeriscono che l'uso autologo dovrebbe essere limitato. La commissione Austriaca raccomanda l'utilizzo di banche pubbliche di sangue cordonale per uso allogenico e addirittura sconsiglia la creazione di banche pubbliche (*Bio ethikkommission Bundeskanzleramt, Austrian Bioethics Commission at the Federal Chancellery, 2008*). Il Comitato belga, mostra maggiore apertura verso le banche private e familiari anche se non tutti i membri sono favorevoli all'istituzione di banche private con risvolto commerciale; la Commissione di Cipro invece si mostra a favore di entrambe purchè siano monitorate sistematicamente dalle autorità competenti, e anche se l'uso autologo non è raccomandabile, non ne vieta la promozione e l'istituzione. Il Comitato francese appoggia e promuove le banche pubbliche mentre scoraggia l'approccio alle banche private che non dispongono di dati scientifici rilevanti, mentre la Grecia rimanda alle autorità pubbliche la concessione di licenze e la supervisione delle banche sia pubbliche sia private. Il Comitato irlandese non esprime opinioni nette ma prende atto del dibattito in corso sulle banche cordonali, a differenza del Nuffield Council on Bioethics del Regno Unito che incoraggia la raccolta in strutture pubbliche. Il nostro Comitato di Bioetica (CNB) raccomanda lo stoccaggio in banche pubbliche, tuttavia "dove esistano banche private autorizzate alla raccolta e alla conservazione di cellule staminali cordonali, devono essere soggette ad un sistema di controllo che ne autorizzi l'esercizio effettivo secondo le direttive della CE". Infine la Svezia promuove il bancaggio pubblico ma invita alla regolamentazione anche delle strutture private.

3.8 Regolamentazione legislativa nazionale ed internazionale

In Italia le attività trasfusionali e la produzione di emoderivati sono regolamentate dalla legge n.219 del 25 ottobre 2005. Inoltre, tra il 2002 e il 2009 sono state emanate otto ulteriori ordinanze ministeriali incentrate sul sangue cordonale. Secondo tali ordinanze è consentita la conservazione ad uso allogenico e dedicato, e l'esportazione all'estero di sangue cordonale ad uso autologo con autorizzazione specifica (Ministero della Salute, 2002). Due decreti del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali del 2009 riguardano le biobanche cordonali. Il primo contiene *“Disposizioni in materia di conservazione di cellule staminali da sangue del cordone ombelicale per uso autologo dedicato”*, il secondo, invece, si occupa dell' *“Istituzione di una rete nazionale di banche per la conservazione di sangue da cordone ombelicale*. Attualmente in Italia sono 19 le banche pubbliche, mentre le banche private, non essendo supportate da evidenze scientifiche, sono vietate in quanto la normativa non permette la conservazione autologa ma consente quella dedicata. Tuttavia è consentito alle coppie di esportare il sangue cordonale e conservarlo ad uso autologo in banche private estere. A tale scopo esistono agenzie di società estere quali Bioscience Institute, FamiCord ed altre che aiutano l'esportazione. In Italia è presente la rete nazionale Italia Cord Blood Network (ITCBN), istituito dal Ministero della Salute nel 2007, che coordina ed esegue ripetuti controlli tecnico-scientifici (Cord Blood Network” www.centronazionalesangue.it). Nel 2010 è nato il “Comitato Italo Francese per il buon uso del sangue del cordone ombelicale”, in cui esponenti scientifici e bioeticisti italiani e francesi, hanno fatto richiesta al Parlamento Europeo di far

applicare le direttive vigenti in Italia e in Francia in tutti i paesi europei. L'Italia e la Francia vietano l'istituzione di banche private e applicano un'interpretazione rigorosa di tale ordinamento legislativo. A sostegno dell'attuale normativa italiana, si colloca anche la posizione espressa dalle principali Società scientifiche e mediche del Paese - Società Italiana di Medicina Trasfusionale e Immunoematologia (SIMTI), Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO), Società Italiana di genetica Umana (SIGU), Federazione Nazionale Collegio delle Ostetriche (FNCO) che si pongono in piena opposizione alla donazione autologa nelle banche private.

In Europa vi sono state tre direttive comunitarie che hanno regolamentato l'utilizzo di staminali cordonali: nella prima 2004/23, si impone agli Stati membri di indicare una o più "autorità competenti" che hanno il compito di attuare le direttive generali specie per quanto concerne autorizzazioni e licenze, nonché controlli ed organizzazione. Nella direttiva 2006/17 si indicano le prescrizioni tecniche che regolamentano le diverse fasi della procedura di raccolta e conservazione sia in caso allogenico che autologo.

La direttiva 2006/86, infine, definisce i criteri per il rilascio dell'autorizzazione o dell'accreditamento o della licenza alle strutture da parte dell'autorità competente, inoltre puntualizza che per la manipolazione del sangue siano rispettati alcuni requisiti fondamentali previsti dalle Good Manufacturing Practices (GMP) seguite dall'Unione Europea. Al momento attuale non tutti i Paesi hanno stabilito normative che regolamentino le banche di sangue cordonale, anche se negli ultimi cinque anni si è assistito ad una evoluzione nell'organizzazione delle biobanche di cordone in numerosi stati Europei. Le banche pubbliche istituite per la conservazione allogenica

in genere consentono anche la conservazione dedicata al neonato o ad un membro familiare per il quale al momento della raccolta risulti appropriato il trapianto di cellule staminali cordonali. E' previsto divieto di istituzione di banche private in maniera esplicita in Belgio, Francia, Italia, Lussemburgo e in maniera non del tutto esplicita in Olanda. Tuttavia questi stessi paesi ospitano società che permettono e favoriscono l'esportazione per la conservazione autologa all'estero. Negli altri paesi europei sono presenti ed operanti banche private per conservazione autologa.

SEZIONE SPERIMENTALE

SCOPO DELLA SPERIMENTAZIONE

Fino a pochi anni fa, il cordone ombelicale era considerato, una volta eliminato dal corpo del neonato, uno scarto biologico. La scoperta della presenza di cellule staminali emopoietiche, utilizzabili ai fini trapiantologici ha incrementato l'interesse scientifico nei confronti di esso, suscitando numerose aspettative tra i ricercatori e i clinici. Inoltre la notevole capacità delle cellule cordonali di sopportare le procedure di crioconservazione a lungo termine, ha reso concreto e possibile il loro utilizzo sia in pazienti che necessitavano di una ricostituzione emopoietica, sia nell'ambito della medicina rigenerativa. Infatti, è possibile conservare le cellule del sangue del cordone ombelicale mediante congelamento a -196°C ; e dopo scongelamento, è possibile trasferire tali cellule in un organismo ospite senza che perdano la capacità di

ripopolamento. Ciò ha favorito lo sviluppo di banche pubbliche e private, che consentono la conservazione di unità di sangue cordonale. Questo lavoro si focalizza sulla sperimentazione di una molecola antiossidante, di recente scoperta, che ottiene un migliore efficienza di crioconservazione delle cellule staminali cordonali e riduce gli effetti derivanti dai fattori che danneggiano le cellule, durante la crioconservazione a basse temperature. L'utilizzo di tale molecola nei protocolli standard di congelamento, ottiene un incremento della vitalità delle cellule staminali isolate da cordone, dimostrando un effettivo beneficio per trattamenti terapeutici conseguenti.

Introduzione Bibliografica

4. La criopreservazione

4.1 La criobiologia

La stabilizzazione a lungo termine delle cellule staminali è il fondamento della ricerca su di esse e sulla loro possibile applicazione terapeutica, soprattutto perché è necessario avere a disposizione riserve cellulari elevate e disponibili prontamente (Hubel, 1997). Se le cellule sono mantenute in ambiente liquido, possono subire perdita di vitalità a causa dei processi legati al tempo. Pertanto per prevenire tale degrado, le cellule devono essere poste in condizioni che arrestino tutti prodotti derivanti dalle reazioni chimiche che derivano dallo stoccaggio (Katkov *et al.*, 2006). Il metodo standard utilizzato per la stabilizzazione a lungo termine di ogni cellula biologica è la crioconservazione a basse temperature (generalmente in azoto liquido).

Tale processo viene definito *crioconservazione*. I protocolli di crioconservazione delle cellule staminali sono stati descritti sin dal 1955 (Barnes & Loutit, 1955) e ampiamente studiati a oggi, a partire soprattutto dalle cellule staminali embrionali. La ricerca poi si è ampliata alle cellule staminali mesenchimali, con studi più approfonditi a partire dal 1996 (Nicol *et al.*, 1996).

4.2 Principi fondamentali della crioconservazione

La stabilizzazione a lungo termine di una popolazione cellulare si ottiene attraverso la sospensione dei processi biologici. Il metabolismo biologico nelle cellule viventi diminuisce drammaticamente a basse temperature e questo rappresenta il fattore fondamentale che permette la crioconservazione di cellule vive (Gao & Critser, 2000). Al di sotto delle temperature fisiologiche (32-37 °C per i mammiferi), la perdita di calore all'esterno provoca la riduzione dell'energia cinetica necessaria sostenere le reazioni chimiche e, ciò a sua volta interrompe l'attività metabolica delle cellule viventi. Tuttavia, prima di raggiungere questo stato stabile di crioconservazione, è necessario un passaggio intermedio. Entro un intervallo di temperatura che va dagli 0 °C a -70 °C, avvengono alterazioni chimiche fisiche e fisiologiche associate al danno cellulare e tali fenomeni sono noti come danni da congelamento. Alcune ipotesi emerse nel corso degli anni hanno portato alla comprensione di tali danni conseguenti al congelamento, tuttavia la scoperta dei crioprotettori (cryoprotective agents CPA), in particolare il dimetilsolfossido (DMSO), e il loro successo nella crioconservazione di un'ampia varietà di cellule viventi, ha costituito la base per la crioconservazione a lungo termine delle cellule staminali. Gao & Critser (2000) hanno riassunto i passi fondamentali nel processo di crioconservazione che prevedono in primo luogo

l'aggiunta del crioprotettore alle cellule prima di procedere al raffreddamento, che deve essere progressivo, ovvero è necessario effettuare prima un passaggio del campione a basse temperature ed in seguito introdurlo in azoto liquido a -196°C . Per lo scongelamento è necessario rimuovere quanto prima il crioprotettore dal campione essendo tossico per le cellule. Occorre sottolineare che il danno da crioconservazione rappresenta un processo piuttosto complesso e può insorgere in passaggi differenti.

4.3 I principi chimico-fisici del danno criobiologico

Le molecole biologiche sono altamente instabili dal momento che ogni reazione biochimica ne modifica l'assetto strutturale e funzionale. Per tutti i processi biochimici che avvengono all'interno di una cellula viva, occorre la disponibilità di acqua allo stato liquido. Durante la criopreservazione cellulare, l'acqua disponibile all'interno delle cellule si trasforma in ghiaccio a temperature comprese tra -2°C e -5°C ; il passaggio di stato fisico del prodotto, su cui influiscono numerose variabili, avviene in genere tra -6°C e -10°C . Tale procedura pertanto è caratterizzata da una brusca oscillazione della temperatura, fino all'arresto al punto di congelamento della soluzione; infatti, raggiunta la temperatura caratteristica di congelamento, il prodotto non solidifica ma si "surraffredda", ossia rimane allo stato liquido ma a temperatura inferiore a quella di congelamento. La repentina liberazione di energia termica porta la temperatura al valore caratteristico di congelamento, segnando l'inizio della fase di transizione durante la quale il prodotto rimane a temperatura costante fino a quando non è completamente solidificato. La durata del cambiamento di stato è direttamente

proporzionale al rapporto superficie/volume, mentre è inversamente proporzionale alla differenza di temperatura tra camera di congelamento e prodotto. La formazione del ghiaccio ha inizio nell'ambiente extracellulare e, mentre si forma, il cristallo puro esclude i soluti che si concentrano all'interno della cellula. Questo causa uno shock osmotico e disidratazione cellulare, la cui entità dipende dalla velocità di raffreddamento (Miller & Mazur, 1976) (Figura 4).

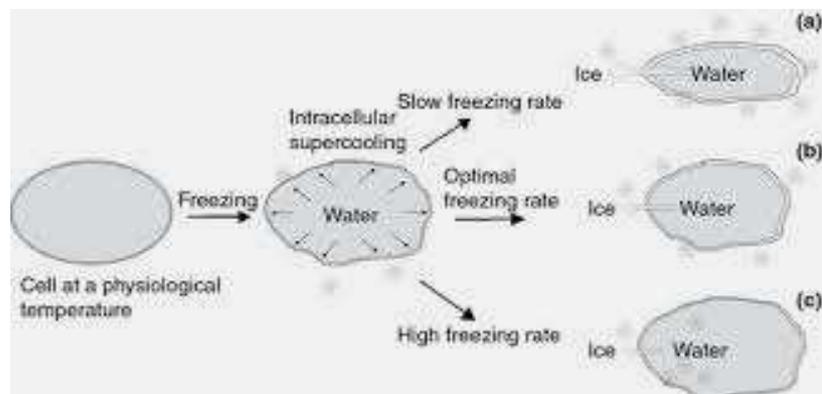


Figura 4. Rappresentazione schematica degli eventi fisici che si verificano in cellule durante il congelamento (Gao & Critser, 2000).

4.4 La velocità di raffreddamento

Per raffreddamento si intende l'estrazione di una certa quantità di energia dalla cellula e, contemporaneamente, una riduzione della sua possibilità di evoluzione chimico-fisica o biologica, imponendo ad essa una struttura più ordinata. Il primo ruolo caratteristico giocato dal freddo, quindi, è la sua azione stabilizzante e moderatrice attuata con sottrazione del veicolo acquoso dal mezzo cellulare. Se la velocità di raffreddamento è bassa, si ha una disidratazione con eccessiva concentrazione dei

soluti all'interno della cellula tale da alterarne notevolmente la condizione *in vivo*. Quando, invece, la velocità diventa estremamente rapida, l'intervallo temporale durante cui si ha il raffreddamento è troppo breve per consentire il trasporto di acqua attraverso la membrana. La cellula continua a sottoraffreddarsi e la probabilità di formazione del ghiaccio intracellulare aumenta. Si ha così una formazione spontanea di cristalli di ghiaccio anche nello spazio intracellulare. Il danno da criopreservazione, dunque, si verifica sia ad alte sia a basse velocità di raffreddamento. Per massimizzare la sopravvivenza cellulare occorre quindi raffreddare ad una velocità intermedia, sufficientemente veloce da non provocare eccessive concentrazioni di soluto e, allo stesso tempo, sufficientemente lenta da non indurre la cristallizzazione intracellulare.

Ogni tipo cellulare ha velocità ottimali specifiche differenti; ciò è dovuto al differente rapporto superficie/volume cellulare, alle specifiche caratteristiche di permeabilità all'acqua e, verosimilmente, alla loro complessità strutturale e attività funzionale.

Le caratteristiche termo-fisiche del materiale biologico, quali volume e composizione, e della confezione di congelamento costituiscono i parametri di maggior impatto; un elemento che contribuisce in modo determinante è la tempestiva e uniforme distribuzione della temperatura in tutto il prodotto. La forma geometrica della cellula stessa e la sua disposizione spaziale all'interno della camera di congelamento assumono un'importanza fondamentale per la diffusione del freddo all'interno della confezione. L'ideale è disporre di sacche di raccolta particolarmente resistenti alle basse temperature e che possano essere distese in strato sottile in modo da non superare lo spessore di 0,8 cm; in tal modo, ogni cellula può variare istantaneamente la sua temperatura (Leibo *et al.*, 2011). Il congelamento lento può essere anche

automatizzato mediante congelatori automatici che raffreddano gradualmente la cellula a un cooling rate compreso tra 1°C/min e 10°C/min, fino a quando la temperatura non si stabilizza a -196°C, al cui raggiungimento il campione viene trasportato in azoto liquido. Tale procedura è più controllata e riduce notevolmente le lesioni cellulari dovute al raffreddamento, anche se richiede tempi e costi maggiori. Il congelamento rapido, descritto da Sherman nel 1990, presenta un cooling rate molto elevato, circa 20°C/min, e prevede di portare le cellule prima a -25°C o -30°C, in seguito raffreddarle in vapori d'azoto per 8/10 min e poi direttamente poste in azoto liquido. Ad oggi è la metodica più diffusa, tuttavia prevede concentrazioni di crioprotettori piuttosto elevate, crea rapida disidratazione, anche se consente un congelamento anticipato. E' necessario considerare che le cellule e i tessuti congelati mediante il congelamento rapido non riescono a raggiungere l'equilibrio osmotico con le concentrazioni extracellulari prima del congelamento. Il congelamento rapido è perciò definito, insieme alla vitrificazione, come tecnica di congelamento in assenza di equilibrio. La vitrificazione è intesa come il passaggio fisico di una soluzione dallo stato liquido a quello vetroso tramite una procedura di congelamento rapido che non determina la formazione di ghiaccio all'interno delle cellule (Fahy *et al.*, 1984). Tale fenomeno si verifica quando il volume nel quale le cellule sono sospese, è notevolmente basso (solo pochi μL) e di conseguenza la viscosità della soluzione incrementa; al contrario, in tale volume limitato, la concentrazione dei crioprotettori deve essere elevata (circa quattro o cinque volte maggiore rispetto alle concentrazioni utilizzate nel congelamento lento). Tutto ciò porta ad una intensa disidratazione, che limita notevolmente la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari. Il protocollo di

vitrificazione prevede l'esposizione dei campioni ai crioprotettori per brevi intervalli di tempo ed una successiva e rapida immersione degli stessi in azoto liquido (MacFarlane, 1987). La vitrificazione ha un grande vantaggio rispetto alle altre procedure di congelamento, in quanto evitando la formazione di ghiaccio intracellulare, favorisce la sopravvivenza delle cellule. Tuttavia l'utilizzo di una elevata concentrazione di crioprotettori nel medium può indurre effetti tossici e provocare shock osmotici (Gosden, 2011). Liang & Wong (2008) hanno sperimentato la crioconservazione di cellule staminali emopoietiche tramite vitrificazione, utilizzando il glicole etilenico (EG) e il glicole propilenico (PG) come crioprotettori. Tuttavia, non appare ancora chiaro se tali crioprotettori e tale metodica possano essere validi anche per la crioconservazione delle cellule staminali ematopoietiche.

4.5 Gli agenti crioprotettori

Il punto di forza della criobiologia è dato dall'uso degli agenti crioprotettori, sostanze che, addizionate alla soluzione cellulare, sono in grado di preservare la cellula dai danni da congelamento. Essi sono piccole molecole capaci di penetrare facilmente nelle membrane cellulari (McGrath, 1988). I meccanismi esatti di crioprotezione sono ancora oggetto di dibattito, ma è noto che essi contribuiscono alla riduzione degli effetti della soluzione durante il congelamento lento (Fahy, 1980). Nella determinazione di un protocollo di crioconservazione sono importanti la scelta e il tipo di crioprotettore da utilizzare. Infatti, è necessario valutare parametri quali velocità di diffusione e tossicità che differiscono sensibilmente in funzione del tipo cellulare. In pratica, è necessario un rapporto di equilibrio tra tossicità-protezione, in modo tale che la cellula sia preservata dai danni delle basse temperature, ma contemporaneamente

tollerare la tossicità del crioprotettore che dipende dalle sue caratteristiche chimiche, dal tempo di esposizione a esso e dalla temperatura. A seconda della loro capacità di oltrepassare la membrana vengono distinti in *permeanti* (CPA, Cryoprotective Permeating Agents), ovvero piccole molecole che diffondono nella membrana plasmatica, superando la pressione osmotica presente ai due lati della membrana, e abbassano la temperatura alla quale si formano i cristalli di ghiaccio impedendone o riducendone la formazione. A questo gruppo appartengono il dimetilsolfossido, il glicerolo (Gy) e l'etilenglicole (EG). Il secondo tipo di crioprotettori sono i *non permeanti*, ovvero molecole che non oltrepassano la membrana producendo disidratazione cellulare con riduzione della formazione di ghiaccio. Tra questi vi sono il glucosio, il tretaloso.

Il Dimetilsolfossido (Me_2SO , detto DMSO) è il crioprotettore intracellulare utilizzato per congelamento di cellule staminali emopoietiche. È un composto molto igroscopico, ad alta diffusione attraverso la membrana cellulare. La sua velocità di penetrazione cellulare dipende dalla temperatura di utilizzo: pochi secondi a 37°C , circa tre minuti a 5°C . Il suo meccanismo d'azione è dovuto alla sua capacità di ridurre la quantità e la dimensione dei cristalli di ghiaccio, abbassando il punto di congelamento, e di limitare la disidratazione cellulare. Il DMSO interagisce con le macromolecole della membrana cellulare, soprattutto con le proteine e la loro acqua d'idratazione, sostituendosi ad ogni mole di acqua. Per un miglior effetto stabilizzante e protettivo vengono aggiunti alla soluzione di congelamento crioprotettori ad azione extracellulare; essi non penetrano nella cellula ed esercitano la loro azione a bassa concentrazione. La protezione è dovuta, probabilmente, all'azione di tali sostanze sul

metabolismo idrolitico: diminuendo il potassio intracellulare provoca un flusso reversibile di elettroliti attraverso la membrana cellulare durante le fasi di congelamento e scongelamento, evitando alla cellula un elevato gradiente osmotico. Il crioprotettore extracellulare non impedisce ai liquidi cellulari di fuoriuscire, ma ne modula il movimento, ritardando la diffusione di ioni e soluti. Generalmente sono impiegati mezzi proteici, quali plasma autologo o albumina umana e, solo recentemente, polimeri ad alto peso molecolare come l'amido idrossietilico. E' regola comune, impiegare una soluzione di criopreservazione al 20% di DMSO che viene aggiunta alla sospensione cellulare volume/volume, in modo da ottenere una concentrazione finale di DMSO al 10%. Come crioprotettore esterno viene aggiunto solitamente plasma autologo o una soluzione al 5% di albumina umana in fisiologica; la metodica prevede l'uso di albumina umana piuttosto che plasma autologo. La soluzione di DMSO/proteine, conservata a +4°C, viene aggiunta rapidamente alla sospensione cellulare tenuta immersa in bagno di ghiaccio fondente e in agitazione continua; questa metodica permette una diffusione omogenea della soluzione criopreservante e permette di contrastare l'effetto esotermico generato dall'ingresso del DMSO all'interno delle cellule. Inoltre, data la diffusibilità del DMSO, si procede rapidamente al congelamento per limitare il tempo di esposizione della sospensione cellulare al crioprotettore, limitando, così, il suo effetto detrimentalmente sui progenitori emopoietici (Makino *et al.*, 1991; Rubinstein *et al.*, 1995). Prima di procedere al congelamento occorre esporre, per un tempo non definito, le cellule al crioprotettore, si tratta di una fase definita adattamento durante la quale il crioprotettore interagisce con l'acqua intracellulare, scambiandola o sottraendola, con velocità influenzabile da

diversi parametri quali: temperatura, specie, tipo cellulare, concentrazione e tipo di crioprotettore e tempo di esposizione (Figura 5).

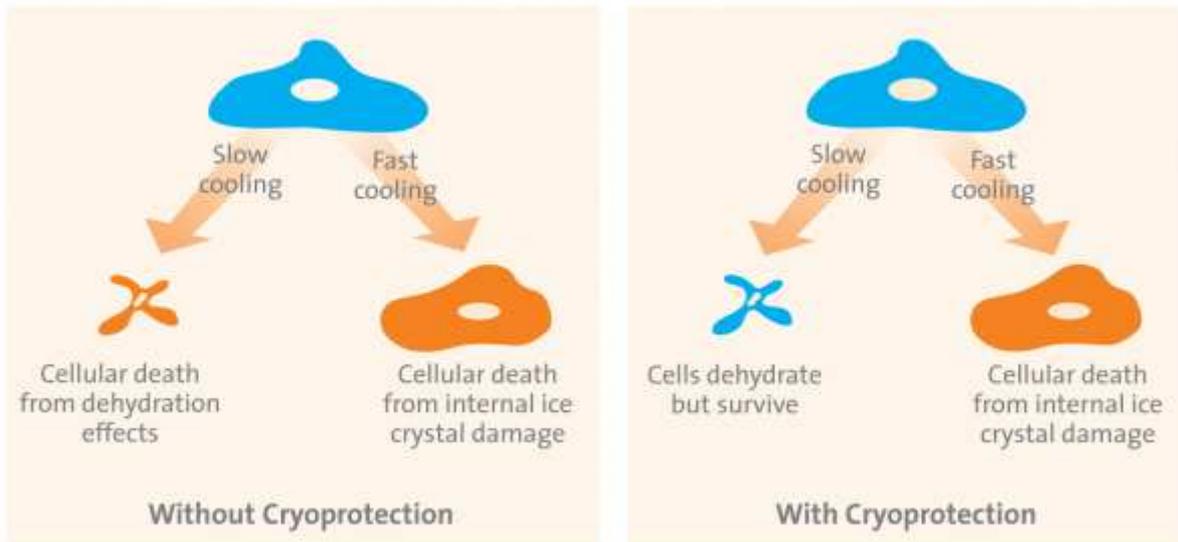


Figura 5. Effetti del congelamento sulle cellule animali in presenza ed in assenza di crioprotettori (Cryobiology, 2000).

4.6 Metodiche di congelamento

Per ottenere un raffreddamento uniforme e progressivo è indispensabile utilizzare congelatori a discesa programmata della temperatura che consentono la selezione di differenti velocità, una per ciascuna fase del ciclo di raffreddamento. Il programma utilizzato di routine prevede una discesa di 1°C al minuto fino al passaggio di stato; in questa fase la temperatura delle preparazioni cellulari può risalire anche di 10°C.

Questo fenomeno è dovuto al passaggio di fase dell'acqua da liquida a cristallina che determina la produzione di energia sotto forma di calore, conosciuto come *calore latente di fusione*. Per tale aumento di temperatura deve esservi una compensazione; per questo motivo è prevista una vigorosa immissione di frigoriferie in modo da limitare al massimo il fenomeno a 2-3 minuti. Successivamente, si passa alla discesa della temperatura di 2°C al minuto fino a -40°C e di 5°C al minuto fino a -100°C. Come già accennato, negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi su sistemi alternativi semplificati di congelamento. Queste metodiche, messe a punto da Stiff (1987) per la criopreservazione midollare, propongono:

- doppio crioprotettore intra-extracellulare (DMSO al 5%- amido idrossietilico al 6%);
- albumina al 4%;
- discesa non controllata della temperatura impiegando congelatori meccanici a -80°C.

Successivamente questo tipo di procedura è stata adottata anche da Makino *et al.*, (1991) per la criopreservazione di cellule staminali da sangue periferico. La sospensione cellulare viene posizionata in un comune congelatore meccanico (-80°C) e la discesa della temperatura avviene a 1-3°C/min. I prodotti possono essere lasciati a -80°C o, eventualmente, trasferiti in vapori di azoto o in immersione, in fase liquida.

4.7 Conservazione

I prodotti criopreservati possono essere stoccati in fase gassosa di azoto a -150°C, o in fase liquida a -196°C. La conservazione in fase gassosa è probabilmente l'opzione più semplice, in quanto sono facilitati il posizionamento, l'inventario ed il recupero al momento dell'uso, ma esistono problemi legati alla stabilità della temperatura. La parte superiore del contenitore di stoccaggio, infatti, è sottoposta alle escursioni

termiche maggiori, dovute alle aperture ripetute, e sono frequenti oscillazioni di 30-40°C. Di conseguenza, lo stoccaggio in fase liquida sembra dia maggiori assicurazioni di stabilità durante la conservazione. Studi recenti, però, hanno dimostrato la possibilità di contaminazioni crociate nella conservazione in azoto liquido. In conclusione, sembra più raccomandabile la conservazione in fase gassosa o in congelatori meccanici, sempre più diffusi, che raggiungono temperature criogeniche inferiori a -120°C (Gluckman, 1994).

4.8 Crioconservazione cellule staminali emopoietiche da sangue cordone ombelicale

Numerosi studi hanno riportato le strategie di crioconservazione delle cellule staminali emopoietiche per prevenire i danni da congelamento e scongelamento. La riduzione dei cristalli di ghiaccio è attuata tramite l'aggiunto di Dimetilsulfossido (Me_2SO) che è usato alla concentrazione del 10% in aggiunta a albumina sierica. Tuttavia il Me_2SO può avere effetti tossici sulle cellule nel momento precedente al congelamento e conseguente allo scongelamento (Berz *et al.*, 2007). A causa della sua tossicità, alcuni studi hanno ridotto le concentrazioni di Me_2SO (dal 3 al 7%) per le cellule di midollo osseo e per le cellule staminali cordonali (Halle *et al.*, 2001).

CAPITOLO 5

5.1 Specie reattive dell'ossigeno (ROS) e crioconservazione

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche da sangue di cordone ombelicale, può rappresentare una scelta terapeutica per pazienti con neoplasie, malattie immunologiche, emoglobinopatie e sindromi d'insufficienza midollare (Haspel & Miller, 2008). Spesso la modalità di questo trapianto richiede la crioconservazione delle cellule staminali ematopoietiche (HSCs) in banche cordonali, nelle quali rimangono conservate anche per un possibile uso futuro (Rodrigues *et al.*, 2008). L'ottimizzazione dei protocolli di crioconservazione, al fine di mantenere una qualità adeguata di cellule staminali crioconservate, rappresenta un compito importante per le banche di cellule staminali cordonali. Per consentire lo stoccaggio prolungato, il campione è raffreddato lentamente ad una temperatura controllata e posto in azoto liquido a -196°C . Il raffreddamento progressivo evita l'accumulo di ghiaccio intracellulare che può causare la lisi della membrana cellulare, ma può provocare disidratazione delle cellule mediante la formazione di ghiaccio extracellulare. Per evitare ciò viene aggiunto dimetilsolfossido (Me_2SO), un composto polare igroscopico, originariamente sviluppato come solvente per le sostanze chimiche. Le sue proprietà sono state descritte originariamente nel 1959 da Lovelock e Bishop. Con la crioconservazione, le membrane cellulari sono massimamente influenzate dalla formazione di ghiaccio intracellulare che si potrebbe generare anche durante il congelamento progressivo. Inoltre la generazione di radicali liberi dell'ossigeno (Reactive oxygen species, ROS) è uno dei fattori che danneggiano le cellule durante la crioconservazione a bassa temperatura (Kearney, 1998; Katkov *et al.*, 1998).

L'ossigeno è una molecola essenziale per la sopravvivenza degli organismi aerobi; ma è in grado di generare intermedi altamente instabili, chiamate specie reattive dell'ossigeno (ROS) a causa della sua struttura atomica che non gli permette di accettare doppietti elettronici (Gutteridge & Halliwell, 2000). I ROS principali sono l'anione superossido (O_2^-), il radicale idrossilico (OH^\cdot) e il perossido d'idrogeno (H_2O_2). Il radicale libero prodotto in maggiore quantità è l'anione superossido O_2^- . Esso reagisce con il perossido di idrogeno H_2O_2 e forma radicale ossidrile OH^\cdot , maggiormente dannoso dell' O_2^- . I ROS, le specie reattive dell'ossigeno, sono un tipo di radicale libero derivato dall'ossigeno con un ruolo chiaramente definito nel danno cellulare. Sono un prodotto dei processi di respirazione mitocondriale e di produzione energetica, ma vengono degradate ed eliminate dai sistemi di difesa cellulari. In questo modo le cellule sono in grado di mantenere una condizione di equilibrio che tollera la presenza transitoria e innocua di radicali liberi a basse concentrazioni. Quando però la produzione di ROS aumenta o i sistemi di rimozione non funzionano correttamente si registra un eccesso di radicali liberi responsabili dello stress ossidativo. I ROS una volta aumentati interagiscono con molecole biologiche e ne alterano le loro caratteristiche (Robbins & Cotran, 2010). La crioconservazione cellulare è associata ad elevate concentrazioni ROS intracellulari come risultato di danno mitocondriale (Xu *et al.*, 2010). Gli elevati livelli di O_2 e H_2O_2 post crioconservazione porta al rilascio di citocromo C dai mitocondri al citosol che innesca l'attività delle caspasi (Rauen *et al.*, 1998). Poiché gli spazzini dei radicali liberi e dello stress ossidativo sono diventati meno attivi a bassa temperatura, gli elevati livelli di ROS inducono maggiormente apoptosi (Li & Teng, 2012). L'approccio per ridurre lo stress ossidativo e la

produzione di ROS consiste nell'aggiunta di antiossidanti. Gli antiossidanti sono definiti come “qualsiasi sostanza che, presente in concentrazione molto bassa rispetto a quella di un substrato ossidabile, è in grado di ritardare o inibire significativamente l'ossidazione di quel substrato” (Halliwell & Gutteridge, 1989). Le cellule neutralizzano l'accumulo di ROS attraverso enzimi antiossidanti, come la superossido dismutasi (SOD) e glutazione perossidasi (GPX). L'aggiunta di antiossidanti per mezzo di congelamento convenzionale migliora il recupero cellula post-disgelo (Limaye & Kale, 2001).

5.2 Le difese della cellula: difese antiossidanti

Le specie chimiche reattive e, in particolare, le specie reattive dell'ossigeno (Reactive oxygen species, ROS), sono potenzialmente lesive. Per cui, le cellule hanno sviluppato diversi meccanismi sia enzimatici che non, allo scopo di rimuovere i radicali liberi e ridurre il danno. Questi complessi sistemi di difesa sono costituiti dall'insieme degli antiossidanti (www.osservatoriostressossidativo.com). Gli antiossidanti vengono definiti come “qualsiasi sostanza che, presente in concentrazione molto bassa rispetto a quella di un substrato ossidabile, è in grado di ritardare o inibire significativamente l'ossidazione di quel substrato” (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Gli antiossidanti possono essere classificati: in base alla loro origine, in esogeni ed endogeni, in base alla struttura chimica, enzimatici e non enzimatici, e in base alla solubilità, in liposolubili e idrosolubili. Il sistema di difesa antiossidante, all'interno delle cellule, ha una precisa compartimentalizzazione (Figura 6).

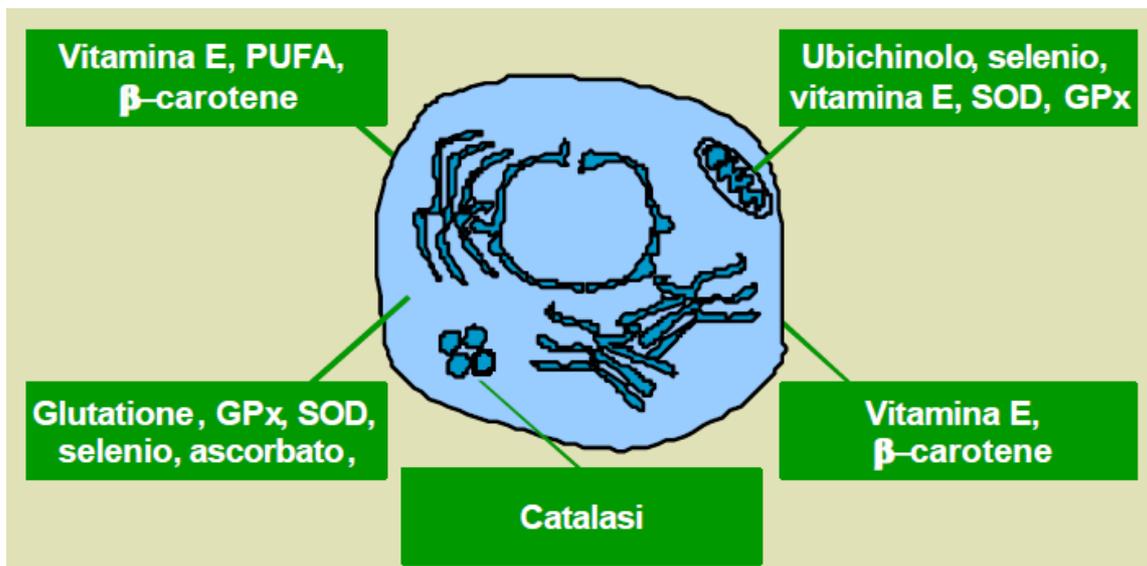


Figura 6. La compartimentalizzazione dei sistemi di difesa (www.osservatoriestressossidativo.com).

In particolar modo, gli antiossidanti di tipo enzimatico sono prevalentemente presenti a livello intracellulare mentre quelli non enzimatici a livello extracellulare (www.osservatoriestressossidativo.com).

Tra i vari meccanismi di difesa vi sono:

- gli antiossidanti, il cui ruolo è di inattivare i radicali liberi o di bloccare la loro formazione. Esempio: glutazione, acido ascorbico, vitamine liposolubili E ed A;
- il controllo dei livelli di ferro e rame, che possono catalizzare la formazione di ROS. I bassi livelli di questi metalli sono mantenuti grazie al legame di questi ioni con proteine di deposito o trasporto (ad es. transferrina, ferritina, lattoferrina e cerulo plasmina), ciò permette di limitare la produzione di ROS;

- enzimi che agiscono come sistemi di disinnesco dei radicali liberi, inattivando H_2O_2 e O_2^- . Tra gli enzimi antiossidanti si annoverano: la superossido dismutasi (SOD), la glutatione perossidasi e la catalasi (Robbins & Cotran, 2010).

La superossido dismutasi reagisce con l'anione superossido per formare perossido di idrogeno e ossigeno molecolare. La catalasi converte il perossido di idrogeno in acqua e ossigeno molecolare. La glutatione perossidasi catalizza la riduzione di una varietà di idroperossidi utilizzando glutatione ridotto (Borrelli *et al.*, 2014)

5.3 La proteina Superossido Dismutasi

L'enzima superossido dismutasi (SOD) svolge un ruolo di primo piano tra i meccanismi difensivi contro il danno ossidativo. Le superossido dismutasi (SOD) sono una classe di enzimi, appartenenti alla classe delle ossido reduttasi, strettamente correlati che catalizzano la reazione di dismutazione, ovvero la rottura dell'anione superossido in diossigeno O_2 e perossido di idrogeno H_2O_2 (Zelko *et al.*, 2002) (Figura 7).

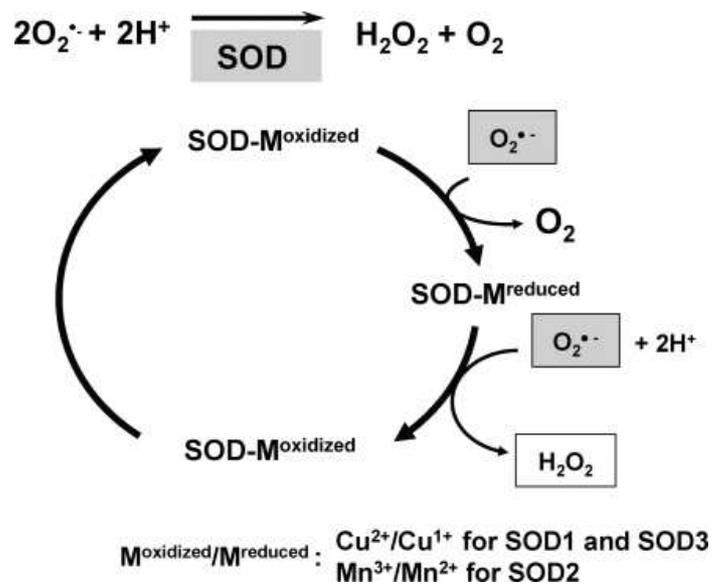


Figura 7. Funzioni della superossido dismutasi (Fukai & Ushio-Fukai, 2011).

Questo enzima è stato scoperto nel 1930 da Pauling (Borrelli *et al.*, 2014), è stato isolato per la prima volta nel 1939 ma solo nel 1969 McCord e Fridovich ne dimostrarono la sua attività come antiossidante (McCord & Fridovich, 1969).

Nell'uomo si riscontrano 3 isoforme di SOD:

- le Cu-SOD e Zn-SOD citosoliche (SOD1),
- la manganese superossido dismutasi mitocondriali (SOD2), e
- le superossido dismutasi extracellulari (ec-SOD) (SOD3)

Queste differiscono per la natura del centro di metallo o per la costituzione amminoacidica, come anche per il loro numero di subunità, cofattori e altre caratteristiche (Landis & Tower, 2005) Ogni isoforma è un prodotto di geni diversi ed inoltre ha diversa localizzazione subcellulare ma catalizza la stessa reazione. La distinta posizione subcellulare delle diverse isoforme di SOD è particolarmente importante per la segnalazione redox in compartimenti.

SOD1 è la principale SOD intracellulare (citosolica Cu/ZnSOD). Esiste come un omodimero 32 kDa ed è localizzata principalmente nel citosol con una frazione più piccola nello spazio intermembrana (IMS) dei mitocondri. È stato anche riportato che SOD1 è anche localizzata in nuclei, lisosomi e perossisomi (Fukai & Ushio-Fukai, 2011). La Cu/Zn-SOD catalizza la dismutazione dell'anione superossido ad ossigeno e acqua. È un omodimero composto da 2 subunità identiche, ogni subunità contiene come sito attivo un cluster di metallo nucleare costituito da ioni zinco e rame e l'attività enzimatica è relativamente indipendente dal pH (intervallo 5-9.5). La superossido dismutasi extracellulare (EC-SOD) è una glicoproteina secretoria tetramerica che contiene zinco e rame. Possiede alta affinità per determinati glicosaminoglicani come eparina e sulfato eparina (Mates *et al.*, 1999). La sua regolazione nei tessuti animali è dovuta principalmente alle citochine. La MnSOD (manganese superossido dismutasi) è nota per avere importanti funzioni in una vasta gamma di malattie indotte da stress. A differenza della Cu/ZnSOD, è l'unico enzima essenziale per la sopravvivenza della vita in ambiente aerobico in condizioni fisiologiche. Questa funzione può essere dovuta alla posizione mitocondriale dell'MnSOD (Borrelli *et al.*, 2014).

Il gene che codifica per la MnSOD umana si trova sul cromosoma 6q25.3 e comprende 5 esoni e 4 introni. L'enzima, una volta sintetizzato a livello citoplasmatico, è trasportato nella matrice mitocondriale grazie la sua sequenza leader di 2 kDa. Tale peptide è, in seguito, clivato producendo la forma matura ed enzimaticamente attiva della proteina (Mancini *et al.*, 2006). La MnSOD mitocondriale è un enzima omotetramero, formato da quattro subunità di 24 kDa. Ogni subunità contiene un

atomo di manganese, con intorno 3 istidine, un residuo di acido aspartico e una molecola solvente: insieme rappresentano il sito attivo dell'enzima (Figura 8).

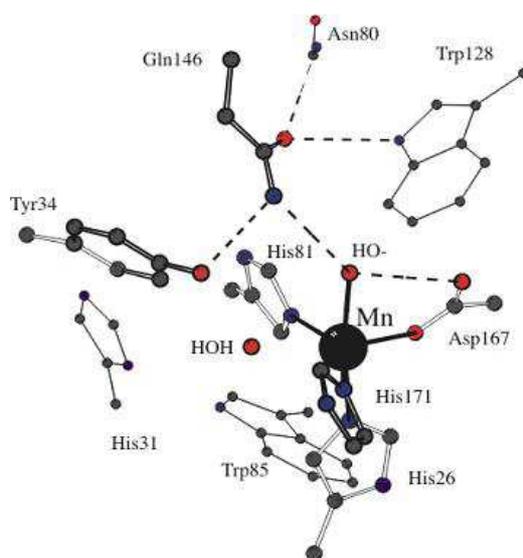


Figura 8. Sito attivo dell'MnSOD (www.chem.uky).

E' stato osservato che la Mn-SOD, quando sovraespressa, inibisce molte delle proprietà tipiche delle neoplasie (aumento del tasso di crescita, invasività, ecc.) (Borrelli *et al.*, 2014).

MnSOD, inoltre, svolge il ruolo di una proteina tumorale soppressiva, inibendo la proliferazione delle cellule ed intensificando l'apoptosi (Oberley, 2005). Essa influenza l'attività di alcuni fattori di trascrizione, come proteina attivatrice-1 (AP1), il

fattore NF-kB e p53 e protegge anche i tessuti normali dall'instabilità cromosomiale. Inoltre, questo enzima modula la concentrazione dei ROS nelle cellule tumorali. Gli effetti soppressivi di MnSOD sono stati studiati in correlazione a livelli alterati di ROS. Quando overespressa, la MnSOD indebolisce le cellule neoplastiche, che diventano più vulnerabili agli agenti che generano ROS e muoiono sia *in vitro* che *in vivo* (Li *et al.*, 1998).

5.4 La manganese superossido dismutasi ricombinante (rMnSOD)

Recentemente è stata scoperta una nuova isoforma di MnSOD, caratterizzata dalla presenza di un peptide leader non clivato alla maturazione, isolata dalla linea cellulare di liposarcoma umano (LSA) e purificata da colture cellulari attraverso tecniche cromatografiche e SDS-page. Tale isoforma differisce dalla MnSOD nativa per una singola sostituzione aminoacidica treonina in isoleucina in posizione 82 e una trasversione silente al nucleotide 222; il suo peso molecolare, di circa 30 kDa è notevolmente superiore rispetto all'MnSOD convenzionale, di circa 24 kDa (Pica *et al.*, 2015). La nuova isoforma possiede ancora la sequenza leader che non altera l'attività enzimatica, a differenza dell'enzima wild-type che richiede il clivaggio del peptide per la maturazione nella forma attiva. Attraverso le librerie di cDNA, la proteina è stata sequenziata e prodotta in forma ricombinante (rMnSOD), sfruttando un clone di cellule di liposarcoma umano (Mancini *et al.*, 2006). Risultati preliminari ottenuti da Cocchia *et al.*, 2011 indicano che basse concentrazioni di questa nuova isoforma di rMnSOD incrementi la qualità del liquido seminale crioconservato rispetto agli enzimi antiossidanti attualmente utilizzati.

6. CELLULE CD34+

6.1 Definizione e morfologia

L'espressione dell'antigene CD34 si riferisce ad una popolazione cellulare morfologicamente piuttosto eterogenea, caratterizzata dalla capacità di generare *in vitro* aggregati clonali derivati da progenitori più o meno ancestrali e dalla capacità *in vivo* di ricostituire il sistema linfo-mielopoietico in un ospite letalmente irradiato (Sutherland & Keating, 1992). Studi immunistochemici hanno dimostrato che l'antigene CD34 è specifico per lo stadio ma non per la filiera differenziativa: infatti, indipendentemente dalla linea differenziativa, esso viene espresso solo da cellule ontologicamente immature (Andrews *et al.*, 1986) e in tali cellule i livelli di espressione della molecola CD34 tendono a decrementare con la maturazione. L'utilizzo dell'antigene CD34 e di altri marcatori di superficie quali, ad esempio, CD33, CD38, HLA-DR, in metodiche di separazione cellulare con immunofluorescenza o altri sistemi ha generato numerosi approfondimenti in questo campo. Osservando, al microscopio ottico, campioni colorati con May-Grünwald-Giemsa, si nota che la cellula CD34+ presenta medie dimensioni, un ampio nucleo e un alone citoplasmatico intensamente basofilo, talvolta presenta granulazioni citoplasmatiche; mentre alcune cellule CD34+ mostrano uno o più nucleoli. Oltre ai marcatori immunologici convenzionalmente assegnati a specifici cluster di differenziazione, le cellule CD34+ presentano sulla loro superficie recettori per numerosi fattori di crescita, come lo Stem cell factor, interleuchina 3, GM-CSF, G-CSF (Baum *et al.*, 1992). Inoltre sebbene tutte le cellule clonogeniche presentino l'antigene CD34, la percentuale di cellule CD34+ con attività clonogenica si aggira

intorno al 10% e al 30%. Probabilmente le cellule CD34+ non clonogeniche rappresentano un gruppo cellulare non responsivo ai fattori di crescita tradizionali, mentre invece hanno bisogno di particolari ligandi (epitocyte growth factor) attivatori di geni specifici della cellula staminale, e che pertanto le consentano di acquisire responsività ai fattori di crescita (Kmiecik *et al.*, 1992).

6.2 Caratterizzazione e funzione della molecola di superficie

Le molecole di superficie delle cellule CD34+ sono caratterizzate dal punto di vista biochimico, inoltre il DNA umano e i rispettivi geni sono stati clonati e sequenziati in un arco ristretto di tempo (Greaves *et al.*, 1992). CD 34 è una glicoproteina transmembrana con un peso molecolare di 105-120 kDa, e che non presenta alcuna omologia con altra proteina nota. Essa è composta da 354 aminoacidi, nove siti di glicosilazione in corrispondenza di un residuo di azoto e diversi punti di glicosilazione in radicali contenenti ossigeno; è, inoltre, molto ricca in acido sialico. Il gene per l'antigene CD34 è localizzato sul cromosoma 1, vicino ad altri geni che codificano per fattori di crescita o molecole funzionali, quali CD1, CD45, TGF2, laminina. La funzione di tale glicoproteina di superficie nelle cellule staminali emopoietiche è ancora oggetto di numerosi studi; tuttavia pare abbia un ruolo rilevante nella modulazione delle cellule di adesione (Lanza *et al.*, 1993), probabilmente esprimendosi come ligando per la L-selectina. Inoltre assumerebbe un ruolo protettivo contro il danno proteolitico, grazie al suo elevato numero di siti O-glicosilati.

6.3 Sottopopolazioni CD34+: analisi fenotipica e funzionale

La popolazione delle cellule CD34+ verosimilmente contiene progenitori di tutte le linee umane linfo-emopoietiche, tra cui le cellule staminali in grado di ricostituire l'emopoiesi in seguito a trapianto di midollo. Con la progressione della differenziazione, si assiste ad una riduzione dei livelli di espressione dell'antigene CD34: pertanto appare chiaro che le più ancestrali cellule clonogeniche (CFU-blast, LTC-IC) esprimono i più alti livelli di CD34, mentre le cellule più differenziate (CFU-G, CFU-M, CFU-E, CFU-Meg) esprimono solo bassi livelli di CD34. Inoltre l'antigene CD34 identifica le cellule ematopoietiche staminali e progenitrici del midollo osseo, ma non è presente nelle cellule circolanti del sangue periferico. Pertanto tale antigene rappresenta un marcatore esclusivo per lo stadio maturativo ma non di linea cellulare differenziativa (Carlo Stella *et al.*, 1994).

7. MATERIALI E METODI

7.1 Principi di Citometria a flusso (CFM)

La citometria a flusso, sviluppata fin dall'inizio degli anni '70, è diventata una tecnologia altamente raffinata per la valutazione qualitativa e quantitativa di cellule sospese in un mezzo fluido, in modo veloce e molto preciso. Per mezzo della citometria a flusso, è ormai possibile raccogliere le informazioni concernenti le molecole della superficie delle cellule e la loro espressione durante la differenziazione cellulare; studiare il ciclo cellulare attraverso la valutazione quantitativa delle modificazioni nel contenuto di DNA; svolgere studi funzionali di una varietà di parametri cellulari e ottenere delle popolazioni arricchite di cellule per ulteriori studi.

Il citofluorimetro consiste di tre componenti principali:

- un sistema fluidico che controlla la captazione cellulare e il flusso cellulare;
- un sistema ottico che “interroga” le cellule mentre attraversano un raggio laser;
- un sistema elettronico che raccoglie, raffigura ed analizza i dati.

Le cellule vengono introdotte come una sospensione a cellule singole in un flusso di soluzione clorurata isotonica e viaggiano come “un flusso dentro un flusso”; vengono poi iniettate all'interno di un capillare dove vengono separate le singole particelle e allineate longitudinalmente. Mentre procedono, e mentre vengono alla fine espulse oppure recuperate (vale a dire separate le diverse popolazioni di cellule), attraversano un raggio di luce che “interroga” ogni cellula per quanto riguarda le caratteristiche richieste. Le fonti di luce più impiegate sono i laser a gas, preferibilmente quello di Argon perché emette, a 488 nm (blu), una linea di luce di eccitazione utile con i

fluorocromi più comuni in uso attualmente. Le cellule, infatti, prima dell'analisi, vengono trattate in modo tale che a componenti cellulari, quali proteine e acidi nucleici si leghino fluorocromi specifici, che colpiti da un raggio di luce monocromatica generino luce fluorescente e dunque si abbia un segnale che discrimini in maniera accurata e sensibile le diverse linee cellulari o ci dia informazioni sulla vitalità cellulare o sull'attività enzimatica. Vi sono diversi tipi di fluorocromi usati in citometria, scelti a seconda del tipo di analisi che si sta conducendo. L'analisi attraverso fluorescenza può essere fatta attraverso l'utilizzo di fluorocromi che legano in maniera stechiometrica il DNA o l'RNA o l'uso di anticorpi che legano fluorocromi specifici per antigeni presenti sulla membrana, nel citoplasma o nel nucleo, attraverso tecniche di immunostochimica diretta ed indiretta. Ogni fluorocromo viene eccitato da una diversa lunghezza d'onda, quindi per separare ogni singola lunghezza d'onda della luce emessa dai fluorocromi vi sono filtri e specchi ottici che discriminano la diversa fluorescenza emessa, permettendo la lettura da parte dei detectors.

Per far in modo che ogni detector rilevi una specifica lunghezza d'onda di emissione di un singolo fluorocromo, nello strumento sono presenti diversi filtri ottici che si dividono in:

- Long Pass, che consentono il passaggio di lunghezze d'onda superiori al filter number;
- Short Pass, che facilitano il passaggio di luce con lunghezze d'onda inferiori al filter number;
- Specchi dicroici, che sono in grado di riflettere la luce con lunghezze d'onda inferiori o superiori al filter number.

Nella camera a flusso, le cellule fluiscono in fila indiana e quando una delle cellule interseca con il raggio laser (punto d'interrogazione) la luce, colpendo la cellula, viene dispersa in ogni direzione. La luce dispersa in avanti rappresenta il Forward Scatter (FSC), che ci dà un'indicazione delle dimensioni della cellula, ma anche della posizione della particella nel capillare. La luce dispersa verso i lati, ovvero il Side Scatter (SSC), è un parametro legato alla complessità della cellula e fornisce informazioni sul rapporto nucleo/citoplasma, sulla rugosità di superficie e sulla densità della cromatina. La rifrazione e la diffrazione della luce sono raccolte dai tubi fotomoltiplicatori che amplificano il debole segnale di luce. Lo strumento è calibrato per considerare nulli gli eventi che generano un segnale di intensità minore di una soglia prefissata (Threshold) (Figura 9).

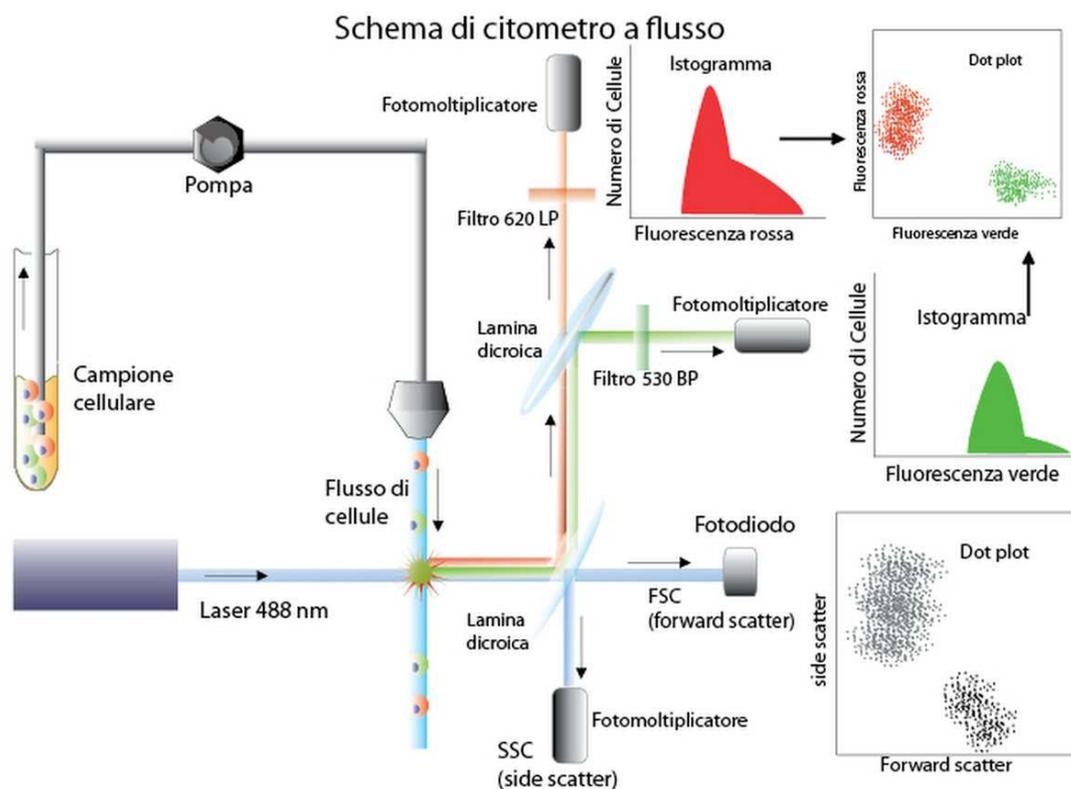


Figura 9. Schema di citometro a flusso (www.wesapiens.org).

Nel componente elettronico di un citofluorimetro, il segnale di luce emesso da una cellula alla sede d'interrogazione è convertito in un impulso elettrico (più comunemente sarà un segnale analogico). I segnali analogici sono poi convertiti nei segnali digitali che vengono raffigurati su uno schermo da un tubo a raggi catodici. L'avvento di computer sempre più potenti ha consentito l'introduzione di sistemi computerizzati per controllare l'operazione dei citofluorimetri, nonché per la raccolta, la memorizzazione e l'analisi dei dati.

I segnali di luce sullo schermo sono raffigurati poi come puntini: ognuno rappresenta un evento come determinato dalle proprietà della dispersione di luce possedute dalla cellula. I grafici che si ottengono dal software possono essere Istogrammi o Dot-Plot. Nell'istogramma sull'asse delle ascisse viene messa l'intensità di fluorescenza, mentre sulle ordinate avremo la rappresentazione del numero di cellule che presentano il fluorocromo. Il dot-plot è un diagramma bidimensionale in cui si mettono in relazione due parametri rilevati, come un segnale di fluorescenza con uno scattering (FSC, SSC). Per le misurazioni della citometria a flusso sono richieste cellule singole e questo rappresenta un fattore limitante che previene gli studi dei tessuti che non possono venire facilmente dispersi in una sospensione di cellule singole. Una singola piattaforma di citometria a flusso è disponibile per la determinazione rapida ed assoluta delle cellule CD 34 + sulla base di linee guida della International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) (Keeney *et al.*, 1998). La vitalità cellulare viene valutata tramite il colorante 7-AAD (7-Aminoactinomycin D). Tale colorante, utilizzato nelle valutazioni standard dei progenitori emopoietici, penetra

nelle membrane non più intatte delle cellule danneggiate. Esso emette nello spettro rosso e può facilmente essere combinato con altri anticorpi per il conteggio delle cellule CD34+. Tuttavia il colorante 7-AAD penetra solo nelle cellule in apoptosi tarda o in necrosi, pertanto per una valutazione più accurata della vitalità è necessario utilizzare l'Annexina V che rileva anche le cellule in apoptosi precoce.

7.2 Raccolta dei Cordoni

Sono stati utilizzati, per il presente lavoro, campioni di sangue di cordone ombelicale proveniente dalla Banca di Sangue Cordonale (Ba.S.C.O.), avente sede presso l'Azienda Ospedaliera "Santobono Pausilipon" di Napoli. Tali campioni, ottenuti mediante consenso informato, non avevano i requisiti necessari per essere bancati e pertanto sono stati concessi ad uso sperimentale. Alcuni di essi, infatti, sono stati esclusi perché presentavano uno scarso volume, altri perché avevano un numero insufficiente di cellule nucleate o perché le gestanti avevano assunto farmaci durante la gravidanza. Essi sono stati processati e congelati nello stesso giorno, a distanza di 24h ore circa dalla raccolta (Figura 10).



Figura 10. Sacca di raccolta e stoccaggio di sangue cordonale (<http://www.cellulestaminalicordoneombelicale.it/>)

7.3 Estrazione delle cellule mononucleate mediante gradiente di Ficoll-Hystopaque

Le cellule mononucleate, e quindi le cellule staminali CD34+, da sangue di cordone ombelicale sono state ottenute da campioni di sangue fresco eparinato mediante centrifugazione su gradiente di *Ficoll/HypaqueTM* (F/H, Sigma Aldrich, Italia). Tale metodica sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate rispetto agli altri elementi corpuscolati del sangue. Le cellule mononucleate e gli elementi a minore densità, si concentrano sopra lo strato di F/H; viceversa, i globuli rossi (RBC) e i granulociti (PMN) si raccolgono sul fondo della provetta (Fig.). Il sangue di cordone ombelicale è stato prima diluito in rapporto 1:2 con sodio cloruro 0,9% (p/v) (soluzione fisiologica, Bieffe Medical, Italia) a temperatura ambiente e, solo successivamente, stratificato lentamente sopra la soluzione di F/H. Dopo centrifugazione a 2500 rpm per 30 minuti a 20°C, senza freno, l'anello di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia F/H è stato aspirato e sottoposto a due successivi lavaggi con soluzione fisiologica mediante centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti a 20°C, con freno, per eliminare gli elementi contaminanti; il pellet cellulare è stato risospeso in soluzione fisiologica all'interno di una falcon, fino ad ottenere un volume finale di 2 mL. La separazione cellulare è stata effettuata in condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare. I campioni di cellule sono stati sottoposti a separazione immunomagnetica delle cellule CD34+ (Figura 11).

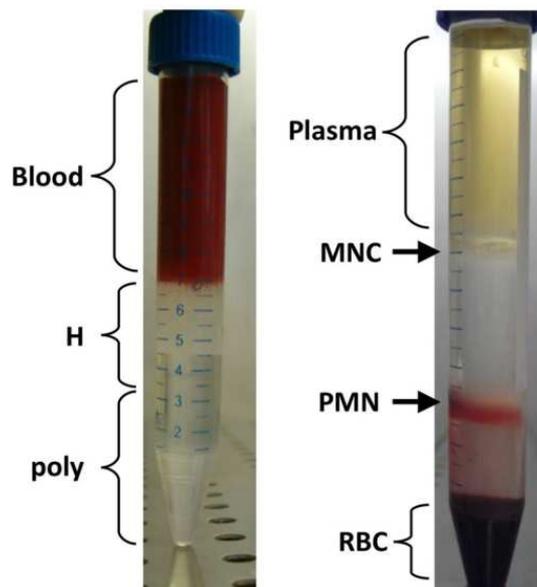


Figura 11. Purificazione di sangue periferico tramite *Ficoll/Hypaque*TM. Nel pannello di sinistra sangue intero diluito con PBS 1X. Nel pannello di destra si notano le diverse stratificazioni cellulari (Rondelli *et al.*, 2013).

7.4 Isolamento delle cellule staminali CD34+ tramite biglie magnetiche

Al fine di ottenere una sottopopolazione cellulare arricchita in cellule staminali CD34+, i campioni cellulari, ottenuti mediante centrifugazione su densità, sono stati sottoposti ad immunoseparazione positiva mediante biglie magnetiche condizionate con anticorpo anti-CD34 (Miltenyi Biotec, Italia). Dopo centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti, il pellet è stato nuovamente risospeso in 10 mL di tampone e fatto passare attraverso un filtro di preselezione, al fine di eliminare eventuali agglomerati cellulari che potrebbero interferire con la selezione. A questo punto è stata effettuata una conta cellulare tramite contatore automatico e si è proceduto alla immunoselezione

secondo il kit di separazione MACS[®]: alla soluzione cellulare di 1×10^6 cellule/mL, sono stati aggiunti 100 μ L di FcR Blocking Reagent e 100 μ L di CD34 MicroBeads magnetiche (Miltenyi Biotech, Italia). Il tutto è stato miscelato e incubato per 30 minuti al buio, a 4° C. Dopodichè, le cellule sono state lavate con soluzione tampone, 5 mL, e sono state centrifugate a 1500 rpm per 10 minuti. Eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 500 μ L di soluzione tampone e tutta la sospensione cellulare è stata inserita nella colonna, precedentemente eluita con soluzione tampone e posizionata sul campo magnetico. Dopo 15 minuti di azione del campo magnetico, la colonna è stata rimossa dal separatore e posta su un tubo di raccolta. Il surnatante, contenente la frazione negativa, è stato prelevato e scartato. La frazione positiva, composta dalle cellule legate alle biglie e che pertanto restano nella provetta posta sul magnete, è stata allontanata dal campo magnetico e risospesa in soluzione PBS 1X (Tampone fosfato salino) (Figura 12.).

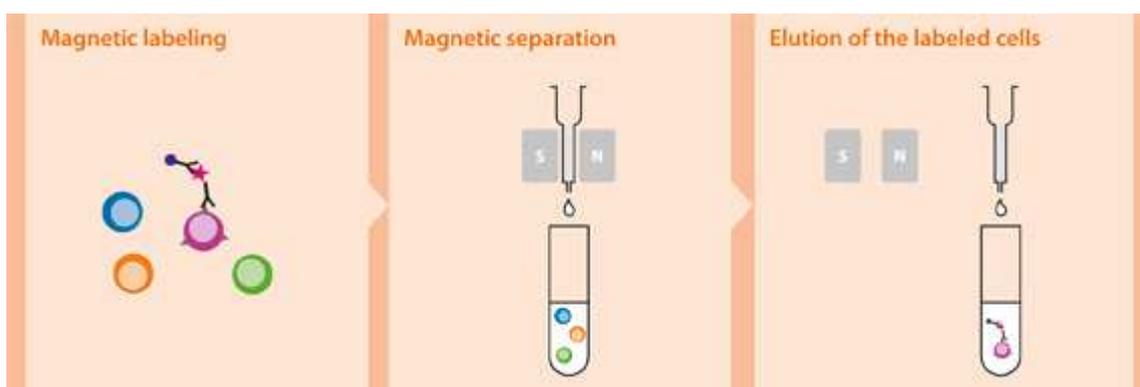


Figura12. Separazione positiva cellulare tramite biglie magnetiche (www.miltenyibiotec.com)

7.5 Valutazione quantitativa e qualitativa delle cellule CD34⁺ isolate mediante citometria a flusso.

Dopo selezione positiva, è stata eseguita una valutazione quantitativa e qualitativa della soluzione cellulare, mediante citofluorimetro (fluorescent-activated cell sorter-BD FACSAria II) utilizzando il software BD FACSDiva. L'acquisizione del campione mediante citofluorimetro avviene secondo il protocollo ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) che prevede l'utilizzo di un contaglobuli per ottenere il numero assoluto di cellule CD34⁺. L'analisi secondo la metodica ISHAGE si basa sulla correlazione dei parametri SSC e FSC, già citati, in una serie di logical gate sequenziali la cui associazione permette di purificare ed isolare progressivamente la popolazione di cellule staminali.

7.6 Trattamento dei campioni: congelamento con rMnSOD

Le cellule CD34⁺ sono state centrifugate e il pellet risospeso in un volume di terreno RPMI (Sigma Aldrich, USA) sufficiente da ottenere la concentrazione ottimale per il congelamento (500 µL). Alle cellule è stata aggiunta una soluzione di congelamento con 40% di FBS e 10% di DMSO. Circa 1 mL di campione è stato posto nelle provette da congelamento (*criotubes*) e congelato. A 3 dei campioni da crioconservare con soluzione di congelamento sono state aggiunte concentrazioni crescenti di rMnSOD, mentre uno dei campioni è stato crioconservato con sola rMnSOD in assenza di DMSO.

I campioni e le concentrazioni di rMnSOD utilizzate sono schematizzati qui di seguito:

- 1) Controllo: campione cellulare 500 μ L + soluzione di congelamento 10% DMSO
- 2) 500 μ L di campione + 500 μ L di soluzione di congelamento 10%DMSO + 20nM rMnSOD
- 3) 500 μ L di campione + 500 μ L di soluzione di congelamento 10%DMSO + 40nM rMnSOD
- 4) 500 μ L di campione + 500 μ L di soluzione di congelamento 10%DMSO + 80nM rMnSOD
- 5) 500 μ L di campione + 80nM rMnSOD (senza soluzione congelamento 10% DMSO)

I campioni così ottenuti sono stati posti prima al congelatore con temperatura -20 °C per 15 minuti, in seguito hanno subito un passaggio in congelatore a -80°C. Le cellule in queste condizioni hanno raggiunto la temperatura dei vapori dell'azoto liquido (-80°C) in circa 3 ore. Trascorse le 3h, le cellule sono state poste in azoto liquido, alla temperatura di -196°C.

7.7 Scongelo dei campioni e determinazione della percentuale vitalità di cellule CD34+

Trascorse due settimane, i campioni conservati in azoto liquido sono stati scongelati per procedere all'analisi citofluorimetrica della vitalità delle cellule CD 34+. La citometria a flusso è stata utilizzata per identificare, elencare e valutare la vitalità delle diverse popolazioni cellulari che esprimono marcatori specifici. Questa tecnica comporta la direzione di un fascio laser su un flusso liquido contenente le cellule. A

contatto con le cellule il fascio luminoso è diretto su una serie di rivelatori. Il forward scatter (FSC) è rivelatore della luce riflessa dalla cellula che è direttamente proporzionale alle sue dimensioni. Il side scatter (SSC) rileva la luce riflessa dalle componenti interne della cellula (quali il nucleo), acquisendo pertanto la complessità struttura cellulare. Gli anticorpi legati ai fluorocromi possono legarsi ai marker cellulari superficiali o interni (CD cluster of differentiation). Quando un fascio di luce di una particolare lunghezza colpisce il fluorocromo, esso si eccita rilasciando energia sotto forma di luce ad una determinata lunghezza d'onda. L'analisi citofluorimetrica effettuata sui campioni scongelati è stata effettuata per l'identificazione e la vitalità delle cellule CD34+, valutando anche la quota cellulare delle CD 45+ e delle cellule CD34+CD45+. La vitalità cellulare viene valutata tramite il colorante 7-AAD. I campioni sono stati analizzati secondo le linee guida del protocollo ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering). Gli anticorpi utilizzati per tale analisi citofluorimetrica sono stati anti-CD34 PE (phycoerythrin), CD 45 Viol blue, 7-AAD, (Milteny Biotec, Germany).

I campioni sono stati posti rapidamente mediante immersione delle provette in bagnomaria ad una temperatura di 37 °C. Il contenuto di ciascuna provetta è stato riversato in Eppendorf e, ad esse, è stato aggiunto PBS 1X fino ad un volume finale di 3 mL. Sono stati effettuati due lavaggi consecutivi della durata di 5 minuti ciascuno a 1500 rpm, in modo da allontanare il crioprotettore, ove presente, che, altrimenti, avrebbe potuto danneggiare notevolmente le cellule. Terminati i lavaggi, è stato risospeso il pellet con 200 µL di PBS 1X Ai campioni sono stati aggiunti 5 µL di anticorpo anti-CD34 PE (phycoerythrin), 5 µL di anticorpo anti-CD 45 Viol Blu e 5µL

di 7-AAD (7-Amino-actinomycin D, 1 μ g/mL). Gli anticorpi sono stati incubati per circa 30 minuti. Trascorso il tempo di incubazione è stato effettuato un lavaggio dei campioni con 2 mL di PBS 1X per ogni campione. Ogni lavaggio ha avuto la durata di 5 minuti a 1500 rpm. I pellet ottenuti sono stati risospesi con 500 μ L di PBS 1X per la lettura al citofluorimetro.

CAPITOLO 8.

RISULTATI

Estrazione delle cellule mononucleate mediante gradiente di Ficoll-Hystopaque

I risultati ottenuti dall'estrazione delle cellule mononucleate mediante gradiente di Ficoll-Hystopaque, hanno mostrato, tramite lettura citofluorimetrica, una resa cellulare dell'1,3% di cellule CD 34+, percentuale nella media riportata dalla letteratura scientifica (Nimgaonkar *et al.*, 1995).

Trattamento dei campioni: congelamento con rMnSOD e scongelamento dei campioni e determinazione della percentuale vitalità di cellule CD34+

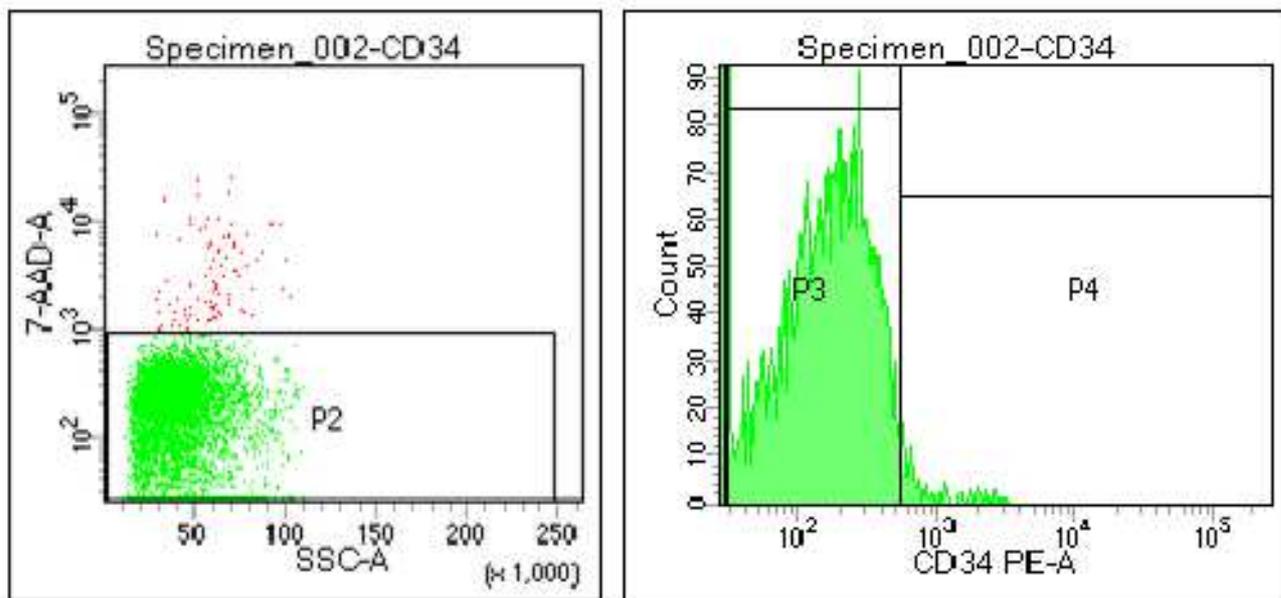
Dopo selezione positiva e lettura al citofluorimetro, si è proceduto al congelamento seguendo il protocollo (cfr. 7.7). Dati molto interessanti sono stati forniti dallo studio della vitalità cellulare delle CD34+ dopo scongelamento. Dai risultati ottenuti si evince che sia la selezione positiva sia la serie di manipolazioni che hanno portato ad essa, non influenzano la vitalità cellulare dei campioni. Per la vitalità media della intera popolazione cellulare mononucleata dei controlli, estrapolata tenendo conto dei parametri citofluorimetrici di complessità cellulare, si è ottenuto un valore del 98,6% (Tabella 1, Figura 13 istogramma A, regione P2). Per quanto riguarda la vitalità delle cellule staminali CD 34+ del campione di controllo, i dati ottenuti con la 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) mostrano una vitalità cellulare media del 4,2% (Figura 13,

istogramma B, regione P4). I valori indicati nell'istogramma B nella regione P3 (Figura 13, istogramma B,) indicano la vitalità della popolazione cellulare marcata CD 34-, e pertanto la vitalità della popolazione cellulare non staminale. I dati che emergono dall'analisi citofluorimetrica, riportati in Tabella 1, mostrano che il trattamento con 20 nM (0,8 μ L), 40nM (1,6 μ L) ed 80nM (3,2 μ L) di rMnSOD presentano percentuali di vitalità delle CD34+ superiori rispetto al controllo (Figure 14; 15; 16, istogramma B, regione P4). Inoltre, l'intera popolazione di cellule mononucleate mantiene alti valori di vitalità cellulare, anche nei campioni trattati con le differenti concentrazioni di rMnSOD (Figure 14; 15; 16, istogramma A, regione P2).

Il trattamento con sola rMnSOD alla concentrazione di 80nM, senza aggiunta di alcun crioprotettore, ha riportato risultati interessanti. Nonostante l'intera popolazione cellulare mononucleata presenti una vitalità inferiore rispetto ai campioni congelati con DMSO 10% (Figura 17, istogramma A, regione P2), la resa cellulare di CD34+ vitali appare essere nettamente superiore rispetto ai campioni crioconservati con aggiunta di DMSO 10% (Figura 17, istogramma B, regione P4). Questo risultato conferma che l'aggiunta di una sostanza bioantiossidante alla soluzione di congelamento convenzionale, migliora la conservazione delle cellule CD34 congelate, diminuendo la concentrazione di ROS che si generano nella cellula durante il normale processo di congelamento.

CAMPIONE	VITALITA' POPOLAZIONE CELLULE MNC	VITALITA' CELLULE CD34-	VITALITA' CELLULE CD34+
Controllo	98,6%	57,3%	2,2%
20nM	94,7%	55,9%	4,9%
40nM	95,6%	54,5%	3,8%
80nM	97,5%	50,1%	4,2%
80nM senza DMSO 10%	55,4%	77,6%	15,2%

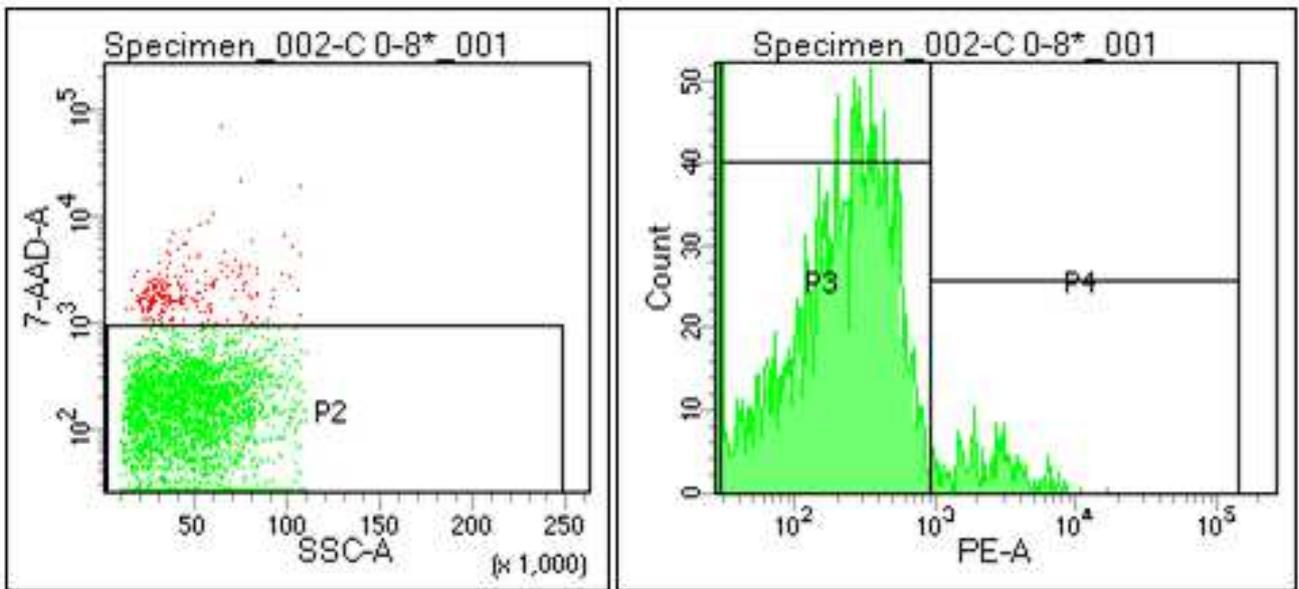
TABELLA 1: Percentuale di vitalità della intera popolazione cellulare, e delle cellule CD34- e CD34+, in seguito a scongelamento dopo crioconservazione per un campione di controllo e per campioni trattati con aggiunta di rMnSOD sia soluzione di congelamento e sia in assenza di crioprotettore.



A)

B)

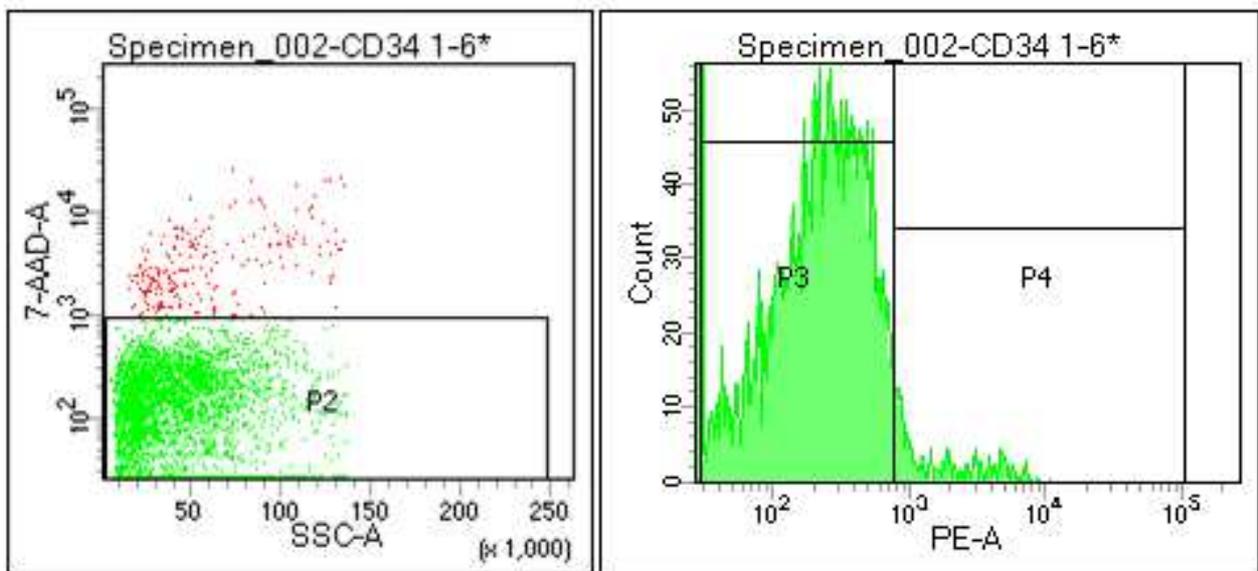
Figura 13. Dot Plot sulla vitalità cellulare espressa dalla 7-AAD per il campione di controllo. Nell'istogramma A) viene indicata la vitalità tramite 7-AAD in funzione della complessità cellulare, isolando in tal modo la popolazione delle cellule mononucleate in base a parametri citofluorimetrici. La regione P2 indica una percentuale di vitalità di tale popolazione intorno al 98,6%. Nell'istogramma B) viene indicata la percentuale di vitalità delle cellule selezionate mediante anticorpi anti CD34 PE. La regione P3 indica la quota delle cellule CD 34-. Mentre la regione P4 indica la % di vitalità delle cellule CD34+.



A)

B)

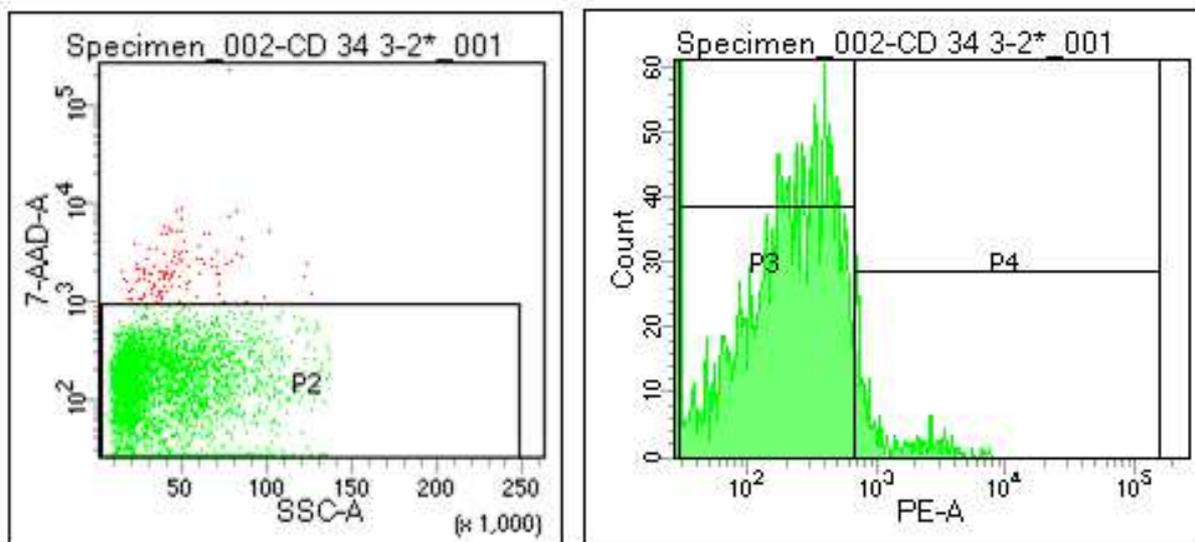
Figura 14. Dot Plot sulla vitalità cellulare espressa dalla 7-AAD per il campione crioconservato con 20nM (0,8 μ L) di rMnSOD e soluzione di congelamento con DMSO al 10%. Nell'istogramma A) viene indicata la vitalità tramite 7-AAD in funzione della complessità cellulare, isolando in tal modo la popolazione delle cellule mononucleate in base a parametri citofluorimetrici. La regione P2 indica una percentuale di vitalità di tale popolazione intorno al 94,7%. Nell'istogramma B) viene indicata la percentuale di vitalità delle cellule selezionate mediante anticorpi anti CD34 PE. La regione P3 indica la quota delle cellule CD 34-. Mentre la regione P4 indica la % di vitalità delle cellule CD34+.



A)

B)

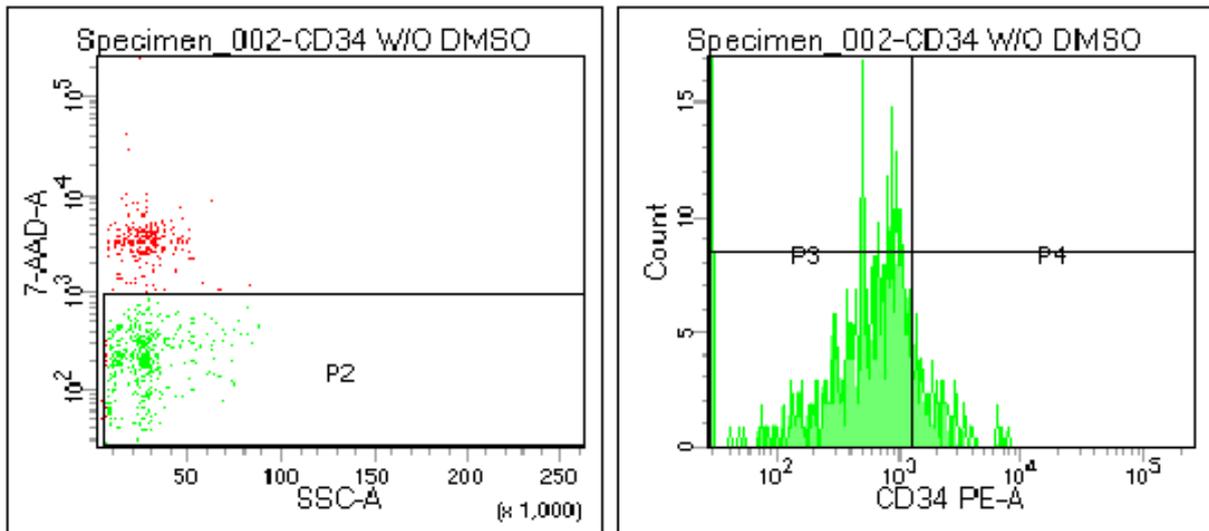
Figura 15. Dot Plot sulla vitalità cellulare espressa dalla 7-AAD per il campione crioconservato con 40nM (1,6 μ L) di rMnSOD e soluzione di congelamento con DMSO al 10%. Nell'istogramma A) viene indicata la vitalità tramite 7-AAD in funzione della complessità cellulare, isolando in tal modo la popolazione delle cellule mononucleate in base a parametri citofluorimetrici. La regione P2 indica una percentuale di vitalità di tale popolazione intorno al 95,6%. Nell'istogramma B) viene indicata la percentuale di vitalità delle cellule selezionate mediante anticorpi anti CD34 PE. La regione P3 indica la quota delle cellule CD34-. Mentre la regione P4 indica la % di vitalità delle cellule CD34+.



A)

B)

Figura 16. Dot Plot sulla vitalità cellulare espressa dalla 7-AAD per il campione crioconservato con 80nM (3,2 μ L) di rMnSOD e soluzione di congelamento con DMSO al 10%. Nell'istogramma A) viene indicata la vitalità tramite 7-AAD in funzione della complessità cellulare, isolando in tal modo la popolazione delle cellule mononucleate in base a parametri citofluorimetrici. La regione P2 indica una percentuale di vitalità di tale popolazione intorno al 97,5%. Nell'istogramma B) viene indicata la quota di vitalità delle cellule selezionate mediante anticorpi anti CD34 PE. La regione P3 indica la percentuale delle cellule CD 34-. Mentre la regione P4 indica la % di vitalità delle cellule CD34+.



A)

B)

Figura 17. Dot Plot sulla vitalità cellulare espressa dalla 7-AAD per il campione crioconservato con 80nM (3,2 μ L) di rMnSOD e in assenza di alcun tipo di crioprotettore. Nell'istogramma A) viene indicata la vitalità tramite 7-AAD in funzione della complessità cellulare, isolando in tal modo la popolazione delle cellule mononucleate in base a parametri citofluorimetrici. La regione P2 indica una percentuale di vitalità di tale popolazione intorno al 55,4%. Nell'istogramma B) viene indicata la percentuale di vitalità delle cellule selezionate mediante anticorpi anti CD34 PE. La regione P3 indica la quota delle cellule CD 34-. Mentre la regione P4 indica la % di vitalità delle cellule CD34+.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI SPERIMENTALI

Per una banca cordonale è necessario ottenere le migliori rese cellulari in seguito a selezione positiva di cellule CD34+ da sangue di cordone ombelicale, per un pieno attecchimento midollare post- trapianto. La tecnica di congelamento seguita dalla maggioranza delle banche, tende ad evitare manipolazioni pre-congelamento, onde evitare di impoverire ulteriormente il campione. Non effettuando alcuna manipolazione, si rischia di non allontanare la popolazione cellulare non staminale, che non solo non è utile per il trapianto ma che, al contrario, potrebbe interferire con esso. Per tale motivo è necessaria una selezione positiva delle cellule CD34+ che saranno sottoposte al protocollo di criopreservazione e bancate anche a lungo termine per futuri usi terapeutici. Per permettere questo stoccaggio prolungato, le cellule staminali ematopoietiche sono sottoposte a congelamento lento e stoccate a -196°C. Per prevenire la formazione di cristalli di ghiaccio che inducono la rottura della membrana cellulare, i protocolli di congelamento prevedono l'utilizzo di uno o più crioprotettori, quali il dimetilsolfossido (DMSO) che è un composto polare igroscopico utilizzato precedentemente come solvente chimico. L'innesto di cellule staminali crioconservate con DMSO è stato associato alla comparsa di effetti collaterali, quali nausea, dispnea e aritmia cardiaca, soprattutto nei pazienti pediatrici con bassa massa corporea (Alessandrino *et al.*, 1999). Il gruppo di ricerca di Limaye (1997) ha mostrato come l'aggiunta molecole biossidanti ha migliorato la resa di vitalità dopo scongelamento e siccome la crioconservazione è indispensabile nelle banche ai fini trapiantologi, l'ottimizzazione del protocollo di congelamento rappresenta un obiettivo eticamente necessario da raggiungere. Per tale motivazione la ricerca scientifica si è

focalizzata sull'aggiunta di bioantiossidanti di origine naturale alle soluzioni di congelamento quali, il saccarosio e il trealosio utilizzabili in qualità di crioprotettori naturali contro gli effetti di disidratazione durante il congelamento (Rodrigues *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2010). Pertanto, è di grande interesse biologico la ricerca di nuovi agenti criopreservanti che riducano massimamente le modificazioni della membrana cellulare, causati dalla formazione di cristalli di ghiaccio durante il congelamento ed il danno cellulare prodotto dai ROS durante lo stoccaggio. Essendo accertato scientificamente che l'utilizzo di bioantiossidanti migliora la stabilità della membrana cellulare, in questo lavoro si è scelto di utilizzare una molecola di recente scoperta, la manganese superossido dimustasi ottenuta in forma ricombinante, rMnSOD, ad azione antiossidante sia aggiunta ai convenzionali protocolli di congelamento sia utilizzata quale unico agente di conservazione. In questo lavoro le cellule staminali CD34+, isolate da cordoni ombelicali mediante separazione immunomagnetica, sono state congelate con DMSO al 10% con aggiunta di 20nM, 40nM e 80nM di rMnSOD e con sola soluzione di congelamento con 10% di DMSO, quale controllo. Inoltre un campione cellulare è stato congelato in assenza di DMSO e con la sola aggiunta di 80nM di rMnSOD. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'aggiunta di rMnSOD alla soluzione standard di congelamento migliora l'efficienza di crioncoservazione. In particolare, il campione crioconservato con sola rMnSOD, in assenza di DMSO, ha mostrato percentuali di cellule CD34+vitali dopo scongelamento superiori al controllo. Tale procedura pertanto potrebbe affiancare le metodiche classiche di crioconservazione, garantendo alle cellule staminali isolate da cordone ombelicale, un fattore di protezione verso i danni causati dai ROS durante il congelamento. La riuscita

dell'attecchimento delle cellule staminali trapiantate è , infatti, direttamente correlato al numero di cellule staminali CD34+ infuse in condizioni di vitalità e quest'ultimo alla superficie dell'organismo ricevente. L'aumento della resa di cellule vitali consentirebbe anche la riuscita dei trapianti su organismi adulti che necessitano di un maggior numero di cellule staminali rispetto ai bambini

I risultati ottenuti rappresentano pertanto un punto di partenza incoraggiante e giustificano le ulteriori sperimentazioni tuttora in corso.

CONCLUSIONI FINALI

Il desiderio di oltrepassare le verità del *sensu comune* ha mostrato in ogni aspetto il fascino dell'insieme delle cellule staminali. Il viaggio virtuale all'interno del loro mondo ha permesso di acquisire consapevolezza che tali cellule sono preziose, ma non miracolose e che nessun tipo di cellula staminale può essere ritenuta la *cellula donatrice universale*, capace di guarire e salvare l'umanità dalle malattie. Scientificamente è emerso che sono già in atto numerose terapie che fanno uso delle cellule staminali cordonali, mentre le criticità etiche sollevate riguardano in particolar modo lo stoccaggio e la possibilità di scelta tra banche pubbliche private. Occorre ricordare che non esiste alcun argomento etico determinante contro la possibilità di crioconservare il cordone in tali banche da parte di una coppia donatrice che intende avvalersi del proprio diritto di autonomia e libertà personale, diritto rafforzato da prospettive terapeutiche e della medicina rigenerativa.

L'arte medica è sempre stata diretta alla tutela della salute. L'art.32 della Costituzione Italiana sancisce il diritto della salute come fondamentale diritto dell'individuo, ma non prerogativa esclusiva dell'individuo ma della collettività. La salute riguarda il singolo perché gli consente di vivere la propria vita e di svolgere le sue attività, ma anche la collettività perché il benessere del singolo individuo coinvolge la società intera. Così anche il tema delle cellule staminali cordonali e delle biobanche entra a pieno titolo in questi temi sociali in quanto coinvolti alcuni diritti fondamentali della persona. E' necessario bilanciare gli interessi del singolo, quali la volontaria partecipazione del prelievo di materiale biologico, la riservatezza e il controllo delle informazioni e l'interesse collettivo. È per questo bilanciamento che a parere della scrivente, le biobanche debbano essere enti senza scopo di lucro, cioè non deve esserci la possibilità di porre un costo alle unità prelevate e conservate al loro interno, e per questo appare preferibile una conservazione di esclusiva degli enti pubblici, e come tale accessibile a tutti. Il cittadino, quindi, dovrebbe essere educato e sensibilizzato a tale tematica, che andrebbe incoraggiata tramite una informazione priva di qualsiasi secondi fini lucrativi, finalizzata unicamente al bene e all'interesse del singolo e della collettività. Nella Giornata Mondiale del Donatore di Sangue del 2004, San Giovanni Paolo II, che ha sempre richiamato al valore della donazione, pronunciò queste parole: *“Dare il proprio sangue volontariamente e come dono gratuito è un atto di grande valore morale e civico. Si tratta di 'un dono per la vita'”*. Per questo motivo, le norme politiche che sensibilizzano le donne a donare il cordone ombelicale andrebbero incoraggiate, incrementando la cultura della donazione, anche attraverso campagne informative adeguate: questo rappresenta la maniera eticamente più attuabile per

garantire ad ogni persona la possibilità di scelte responsabili per la società e per promuovere la donazione come un atto nobile di solidarietà umana.

BIBLIOGRAFIA

- Agazzi, E. L'Essere Umano Come Persona, "Per La Filosofia", 1992, 25, Pp. 28-39
- Alessandrino P. Bernasconi D. Caldera A. Colombo M. Bonfichi L. Malcovati C., Klersy G. Martinelli M. Maiocchi G. Pagnucco M. Varettoni C. Perotti C. Bernasconi. Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases, Bone Marrow Transplant. 1999; 23, 533–537.
- American Society for Blood and Marrow Transplantation Committee Report on "Collection and Preservation of Cord Blood for Personal Use," Biology of Blood and Marrow Transplantation 2008; 14, 356-363.
- Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Monoclonal antibody 12.8 recognises a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony forming cells and their precursors. Blood 1986, 67:842-5.
- Annas GJ. Waste and longing. The legal status of placental-blood banking. New Engl J Med 1999; 340: 1521-4.

- Ardigò A, & Garelli F. Valori, scienza e trascendenza. Una ricerca empirica sulla dimensione etica e religiosa fra gli scienziati italiani. 1989; Ed. della Fondazione Giovanni Agnelli, Torino.
- Arien-Zakay H, Lazarovici P, Nagler A. Tissue regeneration potential in human umbilical cord blood. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010;23(2):291-303.
- Aristotele, *De generatione animalium*, II, 3: 736 a 32 - b 29. (trad. italiana di D. Lanza in ARISTOTELE, *Opere biologiche*, Utet, Torino 1971, pp. 892-894
- Armitage S. Cord Blood Banking Standards: Autologous Versus Altruistic *Front Med (Lausanne)*; 2016 8;2:94.
- Assemblea Parlamentare del Consiglio d'Europa, "Recommendation 1100 (1989) on the use of human embryos and foetuses in scientific research".
- Ballen K. Challenges in umbilical cord blood stem cell banking for stem cell reviews and reports. *Stem Cell Rev.* 2010;6(1):8-14.
- Barnes DWH, Loutit JF. The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parkes technique. *Journal of the National Cancer Institute.* 1955;15(4):901-5.

- Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Bucke AM. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc Natl Acad Sci* ,1992, 89(7):2804-8.
- Beauchamp TL, Childress JF. *Principles of Biomedical Ethics.*, 2001; 5th ed, New York, Oxford University Press.
- Becker AJ, McCullough EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197: 452-454.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*.2003; 114: 763-77.
- Benveniste E. *Il vocabolario delle istituzioni indoeuropee*, 1969. Ed it. a cura di M.Liborio, Ed. Einaudi, Torino 2001, p 48.
- Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells, *Am. J. Hematol*. 2007; 82; 1–8.

- Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 2004; 22, 625-634.
- Bio ethikkommission Bundeskanzleramt (Austrian Bioethics Commission at the Federal Chancellery). Cord blood banking. 19 May 2008. <http://www.bka.gv.at/docview.axd?cobid=31001>. Accessed on 01/11/2011.
- Biswas A & Hutchins R. Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007;16(2):213-22.
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999; 283: 534-537.
- Blum B & Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res.* 2008;100:133-58.
- Bone Marrow Donors Worldwide. Number of donors/CBU's per registry in BMDW. http://www.bmdw.org/index.php?id=number_donors0&no_cache=1.

- Bordet S, Minh NT, Knoppers BM, Isasi R. Use of umbilical cord blood for stem cell research. *J Obstet Gynaecol Can* 2010; 32: 58-61.
- Borowiak M, Melton DA. How to make beta cells? *Curr Opin Cell Biol.* 2009; 21:727-32.
- Borrelli A, Schiattarella A, Bonelli P, Tucillo FM, Buonaguro FM, Mancini A. The Functional Role of MnSOD as a Biomarker of Human Diseases and Therapeutic Potential of a New Isoform of a Human Recombinant MnSOD. *BioMed Research International.* 2014; 2014:476789.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science.* 2000; 290: 1775-1779.
- Broxmeyer HE. Umbilical cord transplantation: Epilogue, *Seminars in Hematology* 2010; 47: 97-103.
- Bryder D, Rossi DJ and Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am. J. Pathol.* 2006; 169, 338–346.
- Caillé A. *Critique de la raison utilitaire.* Paris, LaDecouverte; 1989.

- Carlo Stella C, Mangoni L, Piovani G, Garau D, Alrnici C, Vittorio Rizzoli
Identification of Philadelphia-negative granulocyte-macrophage colony-forming units generated by stroma-adherent cells from chronic myelogenous leukemia patients. *Blood* 1994, 83 : 1373.
- Caspar P. *Penser l'embryon - D'Hippocrate à nos jours*, 1991. Éditions Universitaires, Paris,.
- Chien KR. Lost and found: cardiac stem cell therapy revisited. *J Clin Invest.*; 2006; 116:1838-40.
- Chien KR. Regenerative medicine and human models of human disease. *Nature*. 2008; 453:302-5.
- Cocchia N, Pasolini MP, Mancini R, Petrazzuolo O, Cristofaro I, Rosapane I, Sica A, Tortora G, Lorizio R, Paraggio G, Mancini A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 2011;75(7):1201-10.
- Comitato nazionale per la bioetica CNB. Identità e statuto dell'embrione umano, 22 giugno 1996
- Comitato Nazionale di Bioetica, , Parere sull'impiego terapeutico delle cellule staminali 27 Ottobre 2000.

- Comitato Nazionale di Bioetica, Parere su ricerche utilizzando embrioni umani e cellule staminali, 11 Aprile 2003.
- Comitato Nazionale per la Bioetica (National Bioethics Committee). Mozione del Comitato Nazionale per la Bioetica sulla raccolta e la conservazione di cellule staminali derivate da cordone ombelicale, 13 Luglio 2007.
- Comité Consultatif de Bioéthique de Belgique (Belgia Advisory Committee on Bioethics). Avis n. 42 du 16 avril 2007 relatif aux banques de sang de cordon ombilical. 16 April 2007.
- Comité Consultatif National d'Éthique pour les sciences de la vie et de la santé (National Ethics Advisory Committee for the Life Sciences and Health). Opinion 74 - Umbilical cord blood banks for autologous use or for research. 12 December 2002. <http://www.ccne-ethique.fr/docs/en/avis074.pdf>. Accessed on 01/11/2011.
- Consiglio d'Europa, "Convention on Human Rights and Biomedicine", art. 18, 1996
- Consiglio d'Europa, Texts of the Council of Europe on bioethical Matters (Strasbourg: Directorate of Legal Affairs, 1997), p. 22 preamble par. 3

- Corsano B, Sacchini D, Šuleková M, Minacori R, Refolo P, Spagnolo AG
Allogeneic versus Autologous: ethical issues in umbilical cord blood use.
JAHR; 2015; 6/1,11: 67-85.
- Cossu G, Bianco P. Mesoangioblasts--vascular progenitors for extravascular
mesodermal tissues. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; 3(5):537-42.
- Cyprus: Cyprus National Bioethics Committee. Opinion of the Cyprus National
Bioethics Committee regarding bioethical dilemmas of umbilical cord blood
banking by private profit making companies. 24 September 2004.
- De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L,
Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A.
Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.*
2007; 25(1):100-6.
- Decreto 18 novembre 2009: “Disposizioni in materia di conservazione delle
cellule staminali da sangue del cordone ombelicale per uso autologo-dedicato”
- Derrida J. *Donner le Temps: la Fausse Monnaie*, 1991, Paris, Éditions Galilée.
- De Robbio A & Corradi A. Biobanche in bilico tra proprietà privata e beni
comuni: brevetti o open data sharing? *JLIS.*, 2010; 1, 2.

- Di Sciascio G, Tambone V, Sacchini D, Sull'utilizzo delle cellule staminali a fini terapeutici e le fonti della moralità, Clin Ter, 2007, 158: 21-5.
- Dyson SC, Barker RA. Cell-based therapies for Parkinson's disease. Expert Rev Neurother. 2011;11: 831-44.
- Dziadosz M, Basch RS, Young BK. Human amniotic fluid: a source of stem cells for possible therapeutic use. Am J Obstet Gynecol. 2016; 214(3):321-7.
- Editorial. Umbilical cord blood banking Richard Branson's way. Lancet 2007; 369: 437.
- Ende M & Ende N, Hematopoietic transplantation by means of feta (cord) blood. A new Method, Virginia Medical Monthly 1972; 99(3): 276-280.
- Escalón MP & Komanduri K. Cord blood transplantation: evolving strategies to improve engraftment and immune reconstitution, Curr Opin Oncol, 2010, 22: 122-9.
- Evans MJ & Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos Nature 1981; 292 154-156.

- Fahy GM. Analysis of "solution effects" injury. Equations for calculating phase-diagram information for the ternary-systems NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. *Biophysical Journal*. 1980;32(2):837-50.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984;21:407-426.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.
- Ferreira E, Pasternak J, Bacal N, de Campos Guerra JC, Mitie Watanabe F. Autologous cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 1041.
- Fogel A. *Infancy: Infant, Family and Society*. 1991. Ed West Group, USA, 2thed.
- France: Comité Consultatif National d'Éthique pour les sciences de la vie et de la santé (National Ethics Advisory Committee for the Life Sciences and Health) Opinion 74 - Umbilical cord blood banks for autologous use or for research. 12 December 2002.

- Fruchtman SM, Hurllet A, Dracker R, Isola L, Goldman B, Schneider BL, Emre S. “The successful treatment of severe aplastic anemia with autologous cord blood transplantation.” *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 741-2.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004; 116: 769-778.
- Fukui T & Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function and diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 1583–606.
- Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, Greaves MF. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots.”, *Proc Natl Acad Sci USA*; 1997 94(25):13950-4.
- Galli D, Innocenzi A, Staszewsky L, Zanetta L, Sampaolesi M, Bai A, Martinoli E, Carlo E, Balconi G, Fiordaliso F, Chimenti S, Cusella G, Dejana E, Cossu G. Mesoangioblasts, vessel-associated multipotent stem cells, repair the infarcted heart by multiple cellular mechanisms. A comparison with bone marrow progenitors, fibroblasts, and endothelial cells *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 692-697.

- Gao D & Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR*. 2000; 41(4):187-96.
- Giovanni Paolo II, Discorso Di Giovanni Paolo II Ai Partecipanti A Due Congressi Su Matrimonio, Famiglia e Fertilità 1984.
- Gluckman E. European organization for cord blood banking *Blood Cells*. 1994;20(2-3):601-8.
- Gluckman E, Ruggeri A, Rocha V, Baudoux E, Boo M, Kurtzberg J, Welte K, Navarrete C, van Walraven SM. Eurocord, Netcord, World Marrow Donor Association and National Marrow Donor Program. Family-directed umbilical cord blood banking. *Haematologica*. 2011; 96(11):1700-7.
- Godbout JT & Caillé A. *L'Esprit du Don*. Paris, 1992; La Decouverte.
- Gosden R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. *Fertil Steril*. 2011; 96(2): 266-267.
- Greaves MF, Brown J, Molgaard HV, Spurr NK, Robertson D, Delia D, Sutherland DR.. Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia* 1992, 6 : 31.

- Guillot PV, O'Donoghue K, Kurata H, Fisk NM. Fetal stem cells: betwixt and between. *Semin Reprod Med* 2006; 24: 340-347.
- Gutteridge JM & Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. NY Acad. Sci.* 2000.; 899: 136-147.
- Haeckel E. *Natürliche Schöpfungsgeschichte*, (1868) G. Reimer, Berlin.
- Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, Kanold J, Gembara P, Boiret N, Rapatel C, Berger M, Travade P, Angielski S, Bonhomme J, Deméocq F. Uncontrolled-rate freezing and storage at 80 °C with only 3.5%DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral bloodprogenitor cell transplantations, *Transfusion* 2001; 41, 667–673.
- Haller MJ, Viener HL, Wasserfall C, Brusko T, Atkinson MA, Schatz DA. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp Hematol.* 2008;36(6):710-5.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press Oxford. 1989, 2^a edizione.
- Harris DT . Non-haematological uses of cord blood stem cells. *Br J Haematol.* 2009; 147(2):177-84.

- Hayani A, Lampeter E, Viswanatha D, Morgan D, Salvi SN. First report of autologous cord blood transplantation in the treatment of a child with leukemia. *Pediatrics*, 2007, 119: e296–e300.
- Hénaff M. *La prix de la Vérité. Le Don, l'Argent, la Philosophie*, 2002; Paris, Seuil.
- Henig RM. Clonazione umana: un vaso di Pandora? *Le Scienze* 2003; 419: 30-37.
- Howard DH, Maiers M, Kollman C, Logan B, Gragert L, Setterholm M. A cost-benefit analysis of increasing cord blood inventory levels: An analysis prepared for the Committee on Establishing a National Cord Blood Stem Cell Bank. Washington, DC: Institute of Medicine; 2005:221–2.
- Hubel A. Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfusion Medicine Reviews*. 1997;11(3):224-33.
- Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004; 303(5664):1669-74.

- Irish Council for Bioethics: “Stem cell research: hope or hype? Exploration of ethical questions.”2008.
- Kant. Grundlegung zur Metaphysik der Sitten, 1785.
- Katkov II, Katkova N, Critser JK, Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations, *Cryobiology* 37 (1998) 325–338.
- Katkov II, Kim MS, Karpova NS, Lulat AGM, Cao C, Levine F, Terskikh AV, Loring JF, Snyder EY. Cryobiology for stem cell therapy: Research overview. *Cryobiology*. 2006;53(3):369-370.
- Kearney JN. Evaluation of proteinase inhibitors and free radical inhibitors/scavengers in reducing post-thaw viability loss of cryopreserved skin, *Burns* 24 (1998) 507–512.
- Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cells counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry*, 1998; 34: 61-70.

- Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Smith DM, Weisenburger DD. Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy, *Science* 1988; 71(3): 723-727.
- Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*. 2006 ;444(7118):481-. Erratum in: *Nature*. 2006 Nov 23;444(7118):512. *Nature*.
- Kmiecik TE, Keller JR, Rosen E, Vande Woude GF. Hepatocyte growth factor is a synergistic factor for the growth of hematopoietic cells. *Blood* 1992, 80 : 2454.
- Knudtzon, S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*, 1974; 43(3), 357-361.
- Kogler G, Critser P, Trapp T, Yoder M. Future of cord blood for non-oncology uses. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44: 683-97.
- Kurtzberg J. Umbilical cord blood: a novel alternative source of hematopoietic stem cells for bone marrow transplantation. *J Hematother*. 1996;5(2):95-6.

- Landis GN & Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* 2005.; 126: 365–379.
- Landry W & Zucker A. Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells. *J Clin Invest.* 2004 ;114(9):1184-6.
- Lanza F, Bi S, Castoldi GL, Goldman JM. Abnormal expression of N-CAM (CD56) adhesion molecule on myeloid and progenitor cells from Chronic Myeloid leukemia. *Leukemia* 1993, 7 : 1570.
- Latini R. Mesoangioblasts, vessel-associated multipotent stem cells, repair the infarcted heart by multiple cellular mechanisms: a comparison with bone marrow progenitors, fibroblasts, and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:692-697.
- Leary A & Ogawa M. Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood*,1987; 69(3), 953-956.
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103(5):1669-7.

- Leibo SP, Thomas B, Pool, D. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures and rate changes. 2011; 96(2): 269-271.
- Li N, Oberley T.D., Oberley LW, Zhong W. Overexpression of manganese superoxide dismutase in DU145 human prostate carcinoma cells has multiple effects on cell phenotype. *Prostate*; 1998; 35, 3, 221–233
- Li Y, Ma T. Bioprocessing of Cryopreservation for Large-Scale Banking of Human Pluripotent Stem Cells. *Biores* 2012;1(5):205-14. doi: 10.1089/biores.2012.0224.
- Liang XY & Wong YR. Study on the effect of cryopreservation of cord blood hematopoietic stem cells using low concentration of vitrification liquor by vitrification. *Cell Biology International* 2008; 32, S1-S3.
- Limaye LS & Kale VP. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium, *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2001; 10 : 709–718.

- Lindvall O, Kokaia Z and Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders—how to make it work. *Nat. Med.* 2004; 10, S42–S50.
- Liu G, Ye X, Zhu Y, Li Y, Sun J, Cui L and Cao Y. Osteogenic differentiation of GFP-labeled human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells after cryopreservation. *Cryobiology* 2011; 63, 125-128.
- Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med (Berl)*. 1996;74(6):297-312.
- Lovelock JE & Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide, *Nature*, (1959); 183:1394–1395.
- MacFarlane DR. Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. *Cryobiology* 1987;24:181-195.
- Makino S, Harada M, Akashi K, Taniguchi S, Shibuya T, Inaba S, Niho Y. A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 degrees C without rate-controlled freezing. *Bone Marrow Transplant*. 1991; 8(4):239-44.
- Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, Fasano S, Occhiello A, Pica A, Sehr P, Tommasino M, Nuesch JP, Rommelaere J. Tumor suppressive activity of a

variant isoform of manganese superoxide dismutase released by a human liposarcoma cell line. *Int J Cancer*; 2006.;119:932-43.

- Mates JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.*; 1999; 32(8):595-603.
- Mauss M. *Essai sur le Don. Forme et Raison de l'Échange dans les Sociétés Archaiques.* Paris, Presses Universitaires de France; 2001 (1st ed.: 1924).
- McCord JM. & Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *J Biol Chem*; 1969;. 244: 6049–55.
- McGrath JJ. Membrane transport properties. In: McGrath JJ, Diller KR, editors. *Low temperature biotechnology.* New York, NY: ASME; 1988.
- McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science.* 1997; 276: 66-71.
- Menasche P. Cardiac cell therapy: lessons from clinical trials. *J Mol Cell Cardiol.* 2011.;50:258-65.
- Miller RH & Mazur P. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. *Cryobiology.* 1976;13(4):404-14.

- Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82(3):252-64.
- Mimeault M & Batra SK. Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* 2006;24, 2319–2345.
- Ministero della salute. Ordinanza 11 gennaio 2002. “Misure urgenti in materia di cellule staminali da cordone ombelicale”. *Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana –serie generale n. 31 del 2 giugno 2002.*
- Motta JP, Gomes BE, Bouzas LF, Paraguassú-Braga FH, Porto LC. Evaluations of bioantioxidants in cryopreservation of umbilical cord blood using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology.* 2010; 60(3):301-7.
- Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 2006; 441(7097):1068-74.
- Muller-Sieburg, CE., Cho RH., Thoman M., Adkins B. and Sieburg HB. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood,* 2002; 100, 1302-1309.

- National Bioethics Commission – Greece: “Opinion on umbilical cord blood banking.”, 1 Aprile2007.
- Nicol A, Nieda M, Donaldson C, Denning Kendall P, Truman C, Bradley B, Cryopreserved human bone marrow stroma is fully functional in vitro. *British Journal of Haematology*; 1996; 94(2):258-65.
- Nimgaonkar MT, Roscoe RA, Persichetti J, Rybka WB, Winkelstein A, Ball ED. A unique population of CD34+ cells in cord blood. *Stem Cells*. 1995 Mar;13(2):158-66.
- O’Donoghue K, Fisk NM. Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004;18: 853-875.
- Oberley LW. Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2005; 59, 4, 143–148.
- Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*. 1988;10:63-76.

- Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, Peterson QP, Greiner D, Melton DA. Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell*, 2014; 159(2):428-39.
- Passier R, van Laake LW, Mummery CL. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*. 2008.; 453:322-9.
- Petrini C. Umbilical cord blood collection, storage and use: ethical issues. *Blood Transfus* 2010; 8:139-48.
- Petrini C. Umbilical cord blood banking: from personal donation to international public registries to global bioeconomy. *J Blood Med*. 2014;5:87-97.
- Petros TJ, Tyson JA, Anderson SA. Pluripotent stem cells for the study of CNS development. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:30.
- Pica A, Di Santi A, D'angelo V, Iannotta A, Ramaglia M, Di Martino M, Pollio ML, Schiattarella A, Borrelli A, Mancini A, Indolfi P, Casale F. Effect of rMnSOD on Survival Signaling in Pediatric High Risk T-Cell Acute Lymphoblastic Leukaemia. *J Cell Physiol* 2015; 230(5): 1086-93.
- Ponnusamy MP . Stem Cell Research and Cancer Stem Cells. *J Tissue* 2010; Sci Eng 2: 104.

- Querol S. Cord blood banking: current status. *Hematology*, 2012 ;17 S1:S185-8.
- Haspel RL & Miller KB. Hematopoietic stem cells: source matters, *Curr. Stem Cell Res. Ther* 2008; 3, 229–236.
- Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 2010; 363:147-55.
- Rauen U, de Groot H. Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells. *Free Radic Biol Med*. 1998;24:1316–1323.
- Robbins & Cotran. 2010. Le basi patologiche delle malattie. *Patologia generale*. Elsevier. Milano. 8^a edizione.
- Rocha V, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant*, 2008, 41: 207–14.
- Rochat A, Claudinot S, Nicolas M, Barrandon Y. Stem cells and skin engineering. *Swiss Med Wkly*. 2007; 155:49S-54S.

- Rodrigues JP, Paraguassú-Braga FH, Carvalho L, Abdelhay E, Bouzas LF, Porto LC. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology* 2008; 56(2):144-51.
- Rosenthal J, Woolfrey AE, Pawlowska A, Thomas SH, Appelbaum F, Forman S. Hematopoietic cell transplantation with autologous cord blood in patients with severe aplastic anemia: an opportunity to revisit the controversy regarding cord blood banking for private use. *Pediatr Blood Cancer*. 2011; 56(7):1009-12.
- Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, Taylor PE, Stevens CE. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(22):10119-22.
- Ruiz M, Cosenza S, Maumus M, Jorgensen C, Noël D. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther*. 2016;16(1):33-42.
- Samuel GN, Kerridge IH, O'Brien TA. Umbilical cord blood banking. *MJA*, 2008, 188:533-5.
- Shahriyari L & Komarova N Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? *PLoS One*. 2013 ;8(10):e76195.

- Sherman JF. Cryopreservation of human semen. In “Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility”. Keel B, Webster BW. CRC Press Boca Raton Ann Arbor Boston. 1990: 229-260.
- Sirchia G, Rebulli P, Tibaldi S, Lecchi L. Cost of umbilical cord blood units released for transplantation. *Transfusion*. 1999;39(6):645–650.
- Slatter, MA, Bhattacharya A, Flood TJ, Abinun M, Cant AJ and Gennery, AR. Use of two unrelated umbilical cord stem cell units in stem cell transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatric Blood Cancer*, 2006; 47, 332-334.
- Smith FO. Why do parents engage in private cord blood banking: fear, realistic hope or a sense of control? *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56: 1003-4.
- Stiff PJ, Koester AR, Weidner MK, Dvorak K, Fisher RI. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-rate freezing. *Blood*. 1987;70(4):974-8.
- Sun J, Allison J, McLaughlin C, Sledge L, Waters-Pick B, Wease S, Kurtzberg J. Differences in quality between privately and publicly banked umbilical cord blood units: a pilot study of autologous cord blood infusion in children with acquired autologous disorders, *Transfusion* 2010; 50: 1980-1987.

- Sutherland RD, Keating A. The Cd34 antigen: structure, biology and potential clinical applications. *J Hematother* 1992, 1:115.
- Tedesco FS & Cossu G. Stem cell therapies for muscle disorders. *Curr Opin Neurol.* 2012;25(5):597-603.
- Teo AKK. & Vallier L. Emerging use of stem cells in regenerative medicine. *Biochem. J.* 2010; 428: 11-23.
- Tertulliano. *De anima.* 212 d.C.
- Thompson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.
- Till JE & McCullough EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 1961; 14: 213-222.
- Titmuss RM. *The Gift Relationship: from Human Blood to Social Policy*, 1970; London, Allen and Unwin.

- Tomasini F. Imagining Human Enhancement: Whose Future, Which Rationality?, *Theoretical Medicine and Bioethics*,. 2007; 28,(6), 497-507.
- Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Bearzi C, Boni A, Bolli R, Kajstura J, Anversa P, Leri A. Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(24):9226-31.
- Wagner JE & Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation: The first 20 years, *Seminars in Hematology* 2010; 47: 3-12.
- Wang L, Liu L, Ma H, Sheng Z. Intensified Therapy Followed by Autologous Stem-Cell Transplantation (ASCT) versus Conventional Therapy as First-Line Treatment of Follicular Lymphoma. *J Stem Cell Res Ther* 2011;S2: 002.
- World Marrow Donor Association: “Policy Statement for the Utility of Autologous or Family Cord Blood Unit Storage”. 2006.
- World Medical Association, World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects adopted by the 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000 in <http://www.wma.net/e/policy/17-ce.html>

- Wood KJ, Issa F, Hester J. Understanding Stem Cell Immunogenicity in Therapeutic Applications. *Trends Immunol.* 2016; 37(1):5-16.
- Xu H, Yi BA, Chien KR. Shortcuts to making cardiomyocytes. *Nat Cell Biol* 2011;13:191-3.
- Xu X, Cowley S, Flaim CJ, James W, Seymour L, Cui Z. The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnol Prog.* 2010; 26:827–837.
- Zelko I, Mariani TJ, Folz R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33 (3): 337-349.
- Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, Igura K, Satoh H, Yokomi I, Nishimura T, Yamaguchi S, Yoshimura K, Rubinstein P and Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared

to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2011; 112, 1206-1218.

- Zhao Y, Mazzone T. Human cord blood stem cells and the journey to a cure for type 1 diabetes. *Autoimmun Rev.* 2010;10(2):103-7.
- Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S, Cooke M, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells.* 2006; 24(12):2669-76.