

Biotechnologie per la salute

Biotecnologie e salute

Ogni condizione patologica umana dipende in ultima analisi dall'espressione di geni:

- nei tumori o nelle malattie ereditarie, si tratta di **geni difettosi**;
- nelle malattie infettive sono coinvolti sia i **geni del patogeno** sia quelli dell'ospite.

Con le biotecnologie è possibile **intervenire direttamente sulle cause molecolari** delle malattie. Inoltre queste offrono nuovi e **potenti strumenti di diagnosi e produzione di farmaci**.

I. Terapia genica

Per **terapia genica** si intende la possibilità **di sostituire la copia difettosa di un gene** responsabile di una malattia, con una **copia funzionale**.

Le tecniche alla base della terapia genica sono **il clonaggio** e **il genome editing**.

La terapia genetica può essere effettuata su:

- 1. cellule somatiche** (correggendo il difetto in una specifica popolazione cellulare)
- 2. cellule embrionali** (modificando tutte le cellule dell'organismo e future generazioni).

Terapia genica somatica ex-vivo

Il protocollo per la **terapia genica somatica** prevede:

- il **clonaggio** del gene di interesse nella sua forma funzionale in un opportuno **vettore**;
- Il **prelievo** dal paziente **di cellule** con il gene difettoso;
- L'**inserimento del gene** funzionale al posto di quello difettoso nelle cellule coltivate in vitro;
- La **reinfusione** delle cellule “curate” nel paziente.

Due strategie principali

Tipo di terapia genica	Dove avviene la modifica genetica?	Come funziona?	Esempi
In vivo	Direttamente all'interno del corpo del paziente	Il gene terapeutico viene iniettato (con vettori virali o nanoparticelle) nel tessuto bersaglio	Terapia per la retina, atrofia muscolare spinale (SMA)
Ex vivo	Fuori dal corpo , in laboratorio	Le cellule del paziente vengono prelevate , modificate geneticamente e poi reinfuse	CAR-T per leucemie, terapia per talassemia

1. Terapia genica in vivo

- Il vettore (es. virus modificato) viene **iniettato nel sangue, muscoli o organi specifici**.
- La modifica genetica avviene **direttamente nel corpo**.
- **Vantaggi**: meno invasiva, più rapida da applicare.
- **Svantaggi**: meno controllo sulla precisione e sull'efficienza; possibili **effetti collaterali sistemici**.

2. Terapia genica ex vivo

- Si prelevano **cellule specifiche del paziente** (es. cellule staminali, linfociti T).
- In laboratorio si modifica il DNA delle cellule usando **vettori virali o CRISPR**.
- Le cellule corrette vengono **coltivate e poi reintrodotte** nel paziente.

Vantaggi:

- Maggiore controllo sul processo
- Possibilità di selezionare solo le cellule modificate con successo

Svantaggi:

- Richiede strutture e tempi più complessi
- Può essere più costosa

Principali malattie oggetto di terapia genica

Malattie	Deficit	Incidenza	Cellule bersaglio
GENETICHE			
SCID	Adenosina deaminasi IL-2R gamma	Rara	Midollo osseo Linfociti T
Emofilia A e B	Fattori VIII o IX	1:10,000 maschi	Fegato, muscolo
Ipercolesterolemia familiare	Recettore per LDL	1:1,000,000	Fegato
Fibrosi cistica (MONOGENICA)	Gene CFTR	1:3,000 caucasici	Vie respiratorie
Emoglobinopatie (tal., SCA)	Difetti in α - o β -globina	Fino a 1:600	Midollo osseo
Enfisema ereditario	α 1-antitripsina	1:3,500	Polmoni, fegato
ACQUISITE			
Cancro	Vari	> 1 milione/anno	Vari tipi
Malattie neurologiche	Parkinson, Alzheimer, SLA	1 milione/anno	Neuroni, glia
Malattie infettive	AIDS , epatite C	1 milione/anno	CellT, MF, feg.
Malattie dell'occhio	Retinopatia diabetica Degenerazione maculare	1 milione/anno	Epitelio retinico

Tuttavia ad oggi, la terapia genica **non ha ancora raggiunto un livello di applicabilità clinica** per le numerose difficoltà tecniche.

RIFLESSIONI sulla Terapia GENICA

1. Interventi sulla linea somatica sono paragonabili ad altri interventi terapeutici
2. Interventi sulla linea germinale sono pre-embrione: problema etico legato al principio di intangibilità del patrimonio ereditario.

Rischi:

- a. conseguenze non prevedibili
- b. variazione struttura genetica della popolazione: accettabile per mutazioni deleterie ma non per mutazioni additive

Cellule staminali sono impiegate nella terapia genica

Le **cellule staminali** sono precursori in grado di differenziarsi in diversi tipi di cellule specializzate.

In base al grado di "potenza":

CLASSIFICAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali possono essere classificate in base alla loro capacità di generare un solo tipo di cellule, molti o tutti i tipi di cellule:

Cellule staminali totipotenti **Organismo intero**

Presenti solo nelle prime fasi di formazione dell'embrione, sono in grado di dare origine a un intero organismo. Le staminali totipotenti possono formare anche tessuti extra-embryonari, come la placenta. Lo zigote, ovvero la prima cellula formata dopo la fecondazione, e le cellule dell'embrione fino allo stadio ad 8 cellule, sono staminali totipotenti.

Cellule staminali pluripotenti **Tutte le cellule del corpo**

Hanno una capacità di specializzarsi simile alle totipotenti (possono formare qualunque tipo di cellule), ma non possono formare un organismo intero, così come non possono generare tessuti esterni all'embrione. L'embrione, prima della formazione dei tre foglietti embrionali è formato principalmente da cellule di questo tipo.

Cellule staminali multipotenti **Cellule del sangue**

Conservano una certa capacità di specializzarsi, ma inferiore alle pluripotenti: possono infatti dare origine a tipi di cellule tipiche di un dato tessuto. Ad esempio, le staminali ematopoietiche sono in grado di differenziarsi solo in cellule del sangue, e non in cellule del tessuto muscolare o nervoso.

Cellule staminali unipotenti **Cellule della pelle**

Possono essere considerate staminali in senso lato: sebbene siano in grado di formare un unico tipo di cellule, conservano la capacità di autorinnovamento, possono quindi replicarsi all'infinito per rinnovare un tessuto. Un esempio è fornito dalle staminali della pelle.

STAMINALI TOTIPOTENTI

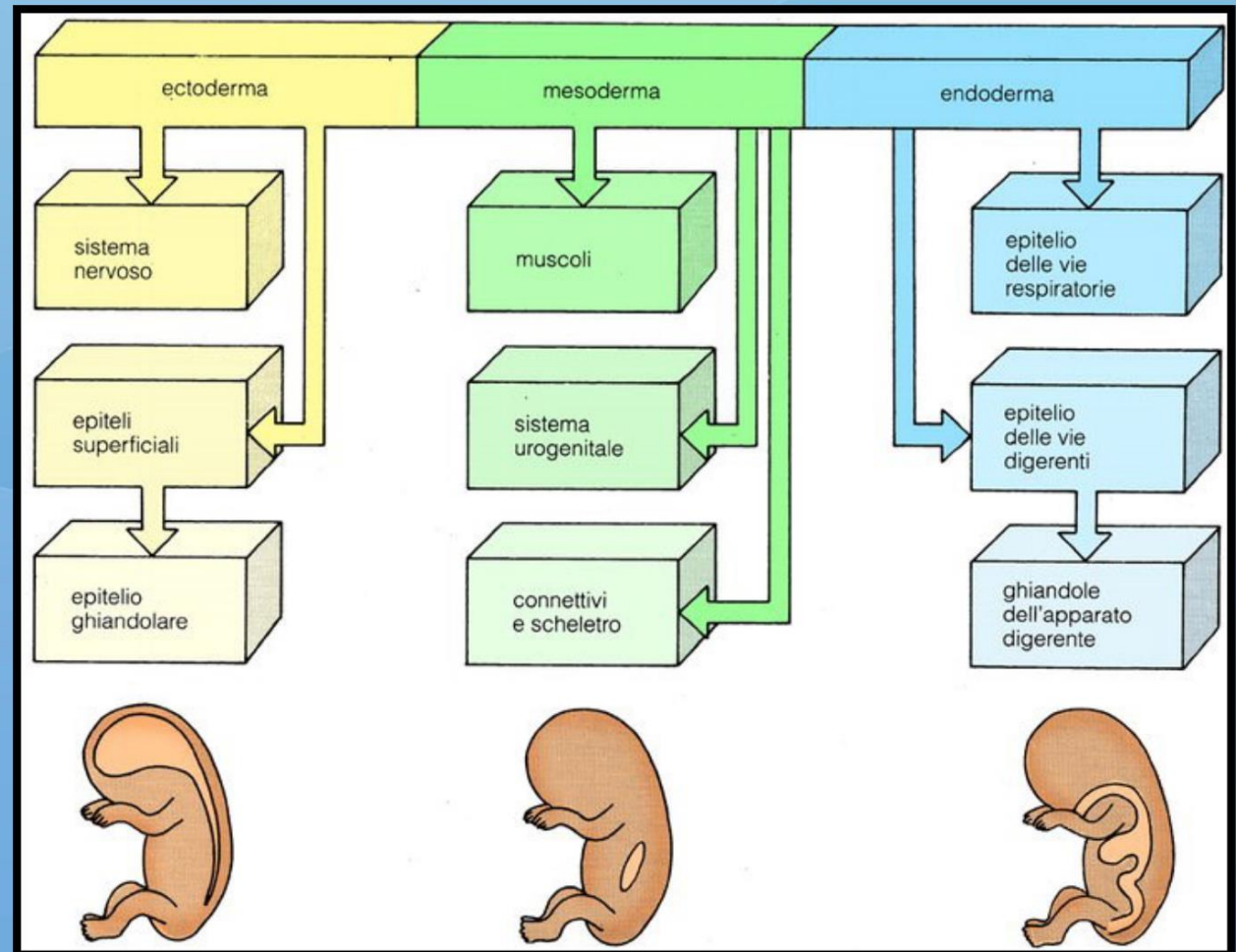
Cellule capaci di dividersi e produrre tutte le cellule differenziate in un organismo, compresi i tessuti extraembrionali. Sono cellule staminali totipotenti lo zigote e l'embrione fino a 2-4 cellule.



STAMINALI PLURIPOTENTI

Cellule capaci di dividersi e di differenziarsi in uno qualsiasi dei tre foglietti germinali:

- Ectoderma
- Mesoderma
- Endoderma

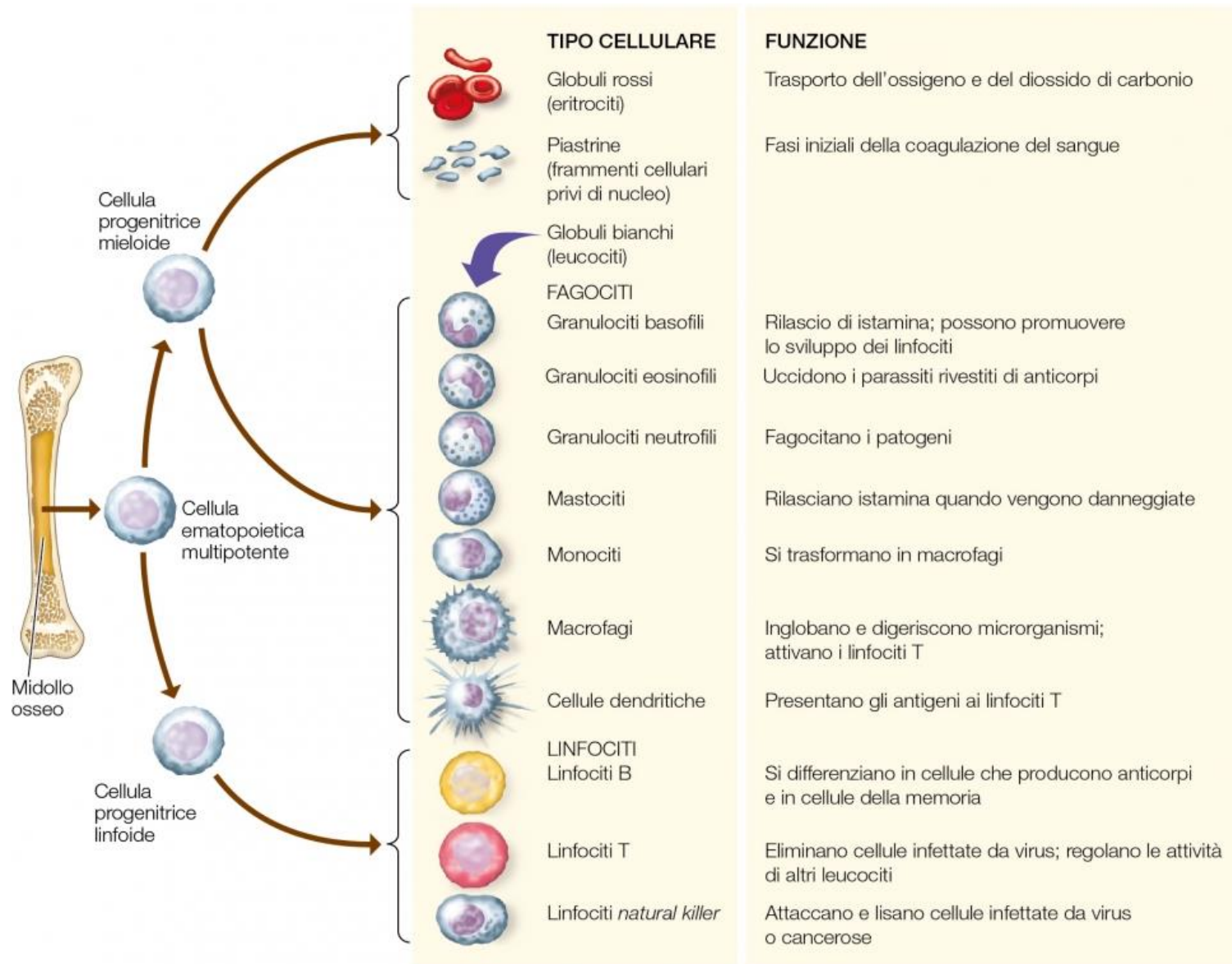


Cellule staminali adulte

- Le cellule **staminali adulte**, sono **precursori** presenti in diversi tessuti dell'organismo adulto, utilizzate per rimpiazzare le cellule vecchie.
- Le staminali adulte sono **multipotenti**, ovvero possono differenziarsi solo **in alcuni tipi cellulari**.

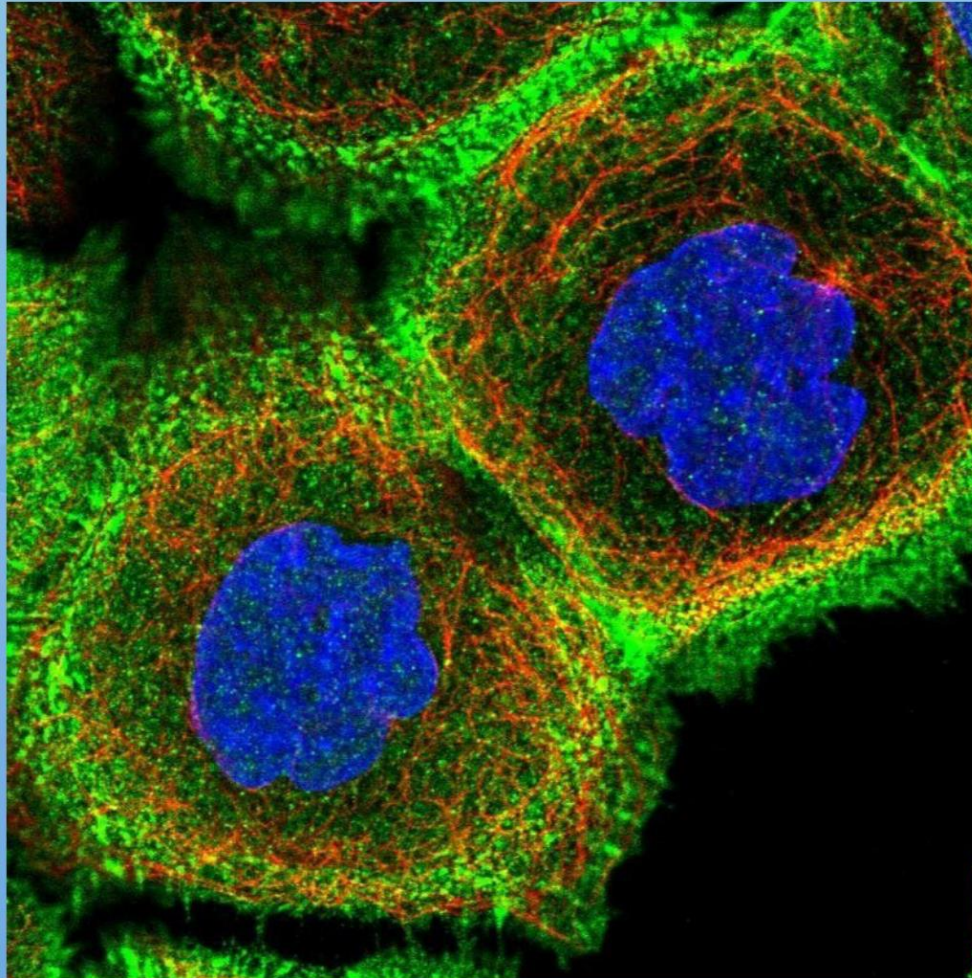
Cellule staminali ematopoietiche

Tipi cellulari prodotti dalle cellule staminali ematopoietiche



STAMINALI UNIPOTENTI

Cellule capaci di differenziarsi in un singolo tipo di cellula; sono anche dette «cellule precursori». Cellule staminali unipotenti sono gli epatociti.



Cellule staminali embrionali (II)

Per ottenere ESC è necessario **generare un embrione attraverso la fecondazione artificiale.**

Gli embrioni vengono fatti crescere fino allo stadio di **blastocisti** (c.a. 5 gg). L'embrione viene quindi sacrificato per prelevare lo strato di cellule interne (ESC).

Le ESC vengono **poi coltivate in vitro** in opportune condizioni.

Le ESC possono essere **indotte a differenziarsi** nei tipi cellulari desiderati, mediante aggiunta di specifici fattori di crescita.

Cellule staminali sono impiegate nella terapia genica

Le **cellule staminali** sono precursori in grado di differenziarsi in diversi tipi di cellule specializzate.

In ambito biotecnologico si utilizzano:

1. cellule staminali **embrionali pluripotenti (ESC)**: problema etico per lo sviluppo di embrioni/ difficoltà tecniche di coltivazione in vitro
2. cellule staminali **adulte multipotenti (SSC)**: limitate a pochi tessuti
3. cellule staminali **pluripotenti indotte (iPSC o Induced Pluripotent Stem Cells)**: cellule adulte differenziate vengono riprogrammate introducendo geni espressi nelle ESC che riportano le cellule ad uno stadio pluripotente de-differenziato.

Cellule staminali pluripotenti indotte (II)

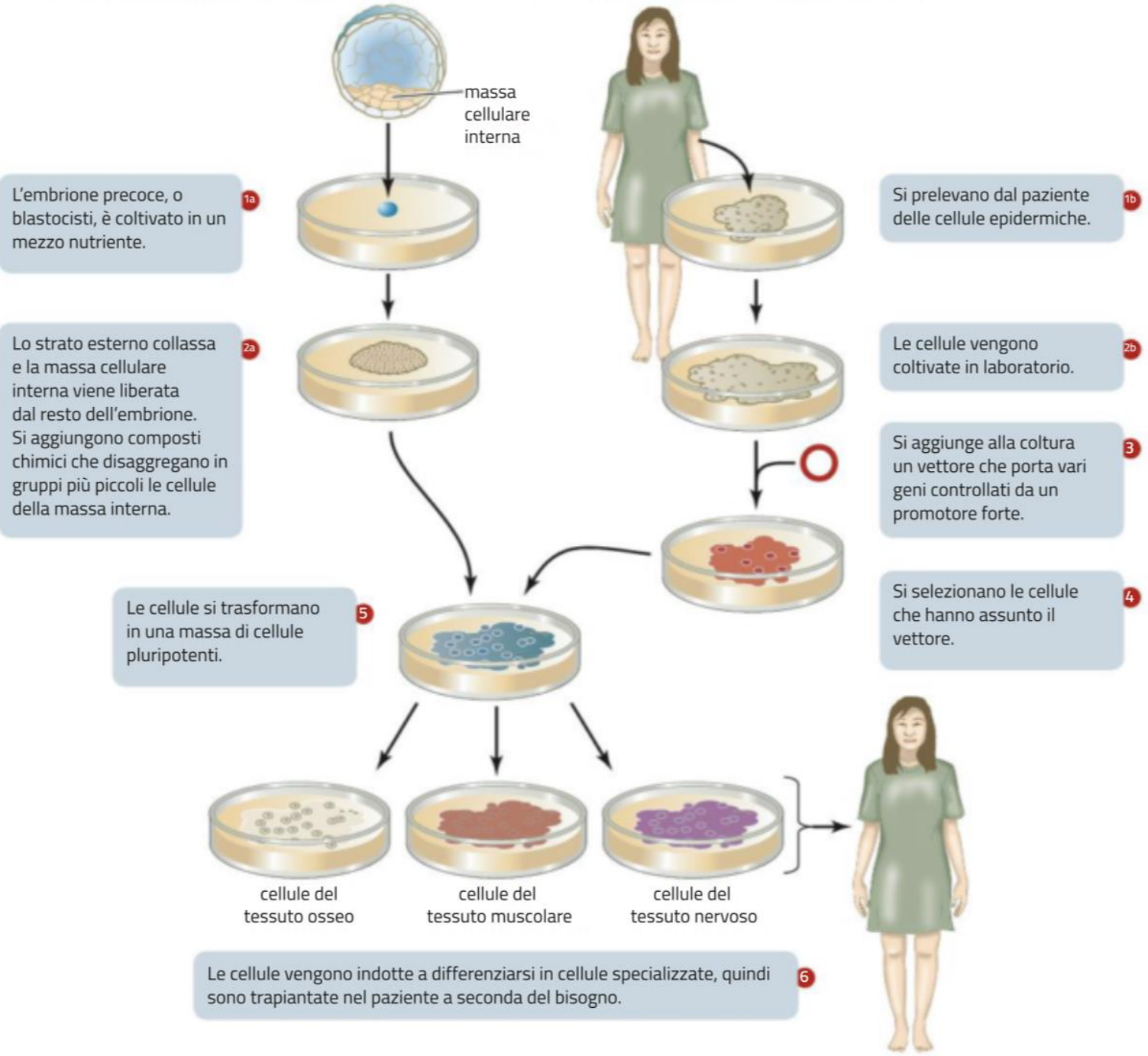
La tecnica prevede di **invertire il programma di differenziamento**, riportando le cellule già differenziate ad uno stato pluripotente simile a quello delle ESC.

Per ottenere questo scopo, si devono **introdurre** nelle cellule adulte i geni per **4 fattori trascrizionali** caratteristici delle ESC.

L'espressione di questi geni causa il **de-differenziamento cellulare**. Le iPSC possono poi essere fatte re-differenziare in tipi cellulari diversi da quello di partenza.

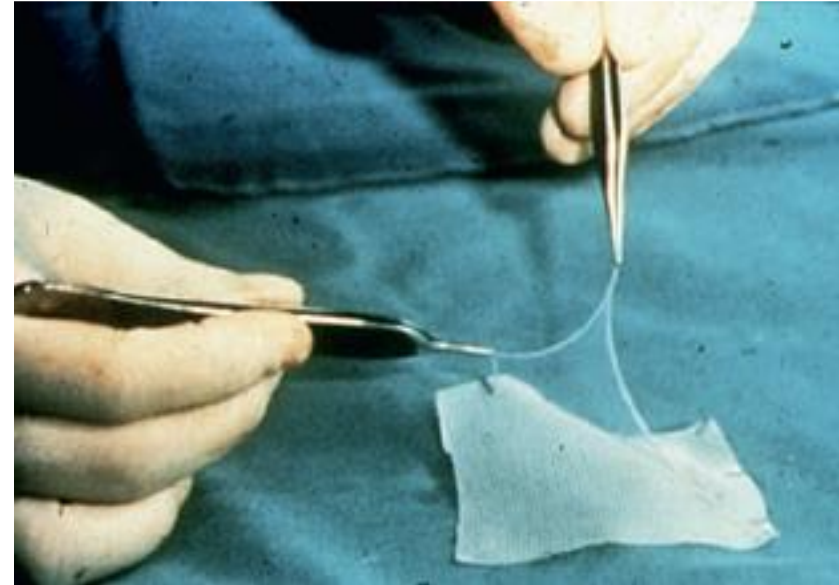
A cellule staminali embrionali (ESC)

B cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)



Cellule staminali: applicazioni in medicina rigenerativa

- Nei **trapianti** per sostituire cellule malate (ad es. le staminali ematopoietiche vengono utilizzate per rigenerare il midollo in pazienti affetti da **leucemia**).
- Per **rigenerare tessuti sani** da impiantare nell'ospite al posto di quelli malati (ad es. per curare il **morbo di Parkinson** o il **diabete**).
- Per **riparare tessuti danneggiati** (ad es. la pelle ustionata o il tessuto cardiaco danneggiato da un infarto).
- Per riprodurre mini organi 3D che consentono di studiare l'effetto di farmaci e successivamente potranno essere trapiantati: è l'era degli **ORGANOIDI**



Un lembo di pelle generato in laboratorio grazie alle staminali

II. Produzione di farmaci

Grazie alle biotecnologie è possibile **fare esprimere** il gene per **una proteina di interesse terapeutico** in un ospite adatto, consentendone la produzione in grandi quantità.

Gli ospiti produttori possono essere **microrganismi** (batteri) oppure **animali** (mucche, capre, suini) o anche **piante** (tabacco).

Con questa tecnologia vengono prodotti molti farmaci come **l'insulina**, i fattori VIII/IX della **coagulazione**, **l'ormone della crescita**, fattori **anticoagulanti**.

Produzione di farmaci in animali

La **produzione di farmaci in animali** da allevamento prende il nome di **pharming**.

La tecnologia è basata sulla generazione di **animali transgenici** esprimenti il gene per la proteina di interesse.

Spesso il gene è sotto il controllo di un **promotore tessuto-specifico**, così che la proteina venga espressa **solo in certe cellule** (ad es. nelle ghiandole mammarie così da essere secreta nel latte) facilitandone la raccolta.

Il pharming **NON prevede il sacrificio dell'animale** ma consente il recupero del prodotto desiderato per tutta la vita dell'animale produttore.

Animali transgenici

Per generare un **animale transgenico** si inserisce il gene esogeno nell'embrione. Esistono due tecniche principali:

- **microiniezione** nello **zigote**, che non consente di controllare il sito di inserimento;
- **genome editing** delle ESC e **impianto embrionale** che consente di inserire il gene in un sito specifico.

Animali transgenici: microiniezione

La **microiniezione** prevede l'inserimento, tramite una micropipetta, del gene di interesse inserito in un apposito vettore, nel nucleo dello zigote (cellula uovo fecondata).

Il gene si **integrerà a caso** nel genoma e sarà presente in tutte le cellule dell'organismo.

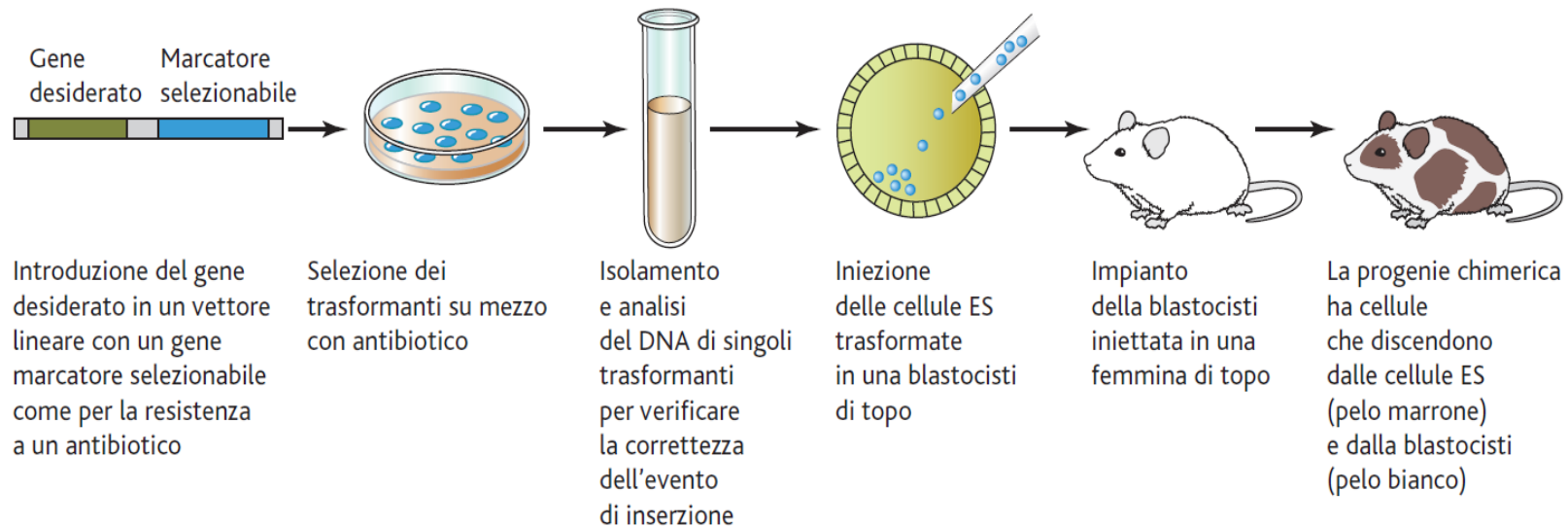
Lo zigote viene fatto crescere fino ai primi stadi e poi l'embrione impiantato in una **madre surrogata** per portare a termine la gestazione.



Animali transgenici: ESC (I)

Il gene di interesse viene **inserito in una posizione specifica** con le tecniche del genome editing, in ESC precedentemente isolate.

Le ESC trasformate vengono **iniettate nell'embrione** allo stadio di blastocisti e questo viene impiantato nell'utero femminile.



Animali transgenici: ESC (II)

La progenie sarà una **chimera**: alcune cellule conterranno il transgene, altre no.

L'incrocio di due **individui transgenici** consentirà di ottenere una **linea pura** (tutte le cellule contengono il transgene).



Un topo chimerico con la sua prole, priva del transgene.

Animali transgenici per la ricerca

Con le tecniche descritte è possibile generare animali sia mancanti di un gene (**knock out**) che esprimenti geni esogeni (**knock in**).

Topolini knock out e knock in sono molto importanti per la ricerca, in quanto consentono di studiare **l'effetto di geni implicati in numerose malattie**, dai tumori alle malattie ereditarie.

Gli animali transgenici sono oggi **l'unico metodo** per studiare gli effetti dei geni a livello di un organismo vivente e per provare **l'efficacia di nuovi farmaci**.