

## La Medicina che verrà. La rivoluzione delle biotecnologie in un percorso clinico personalizzato

### F. Belli

*“... solo gli Dei conoscono il futuro  
gli uomini conoscono il presente  
gli uomini di scienza, unici a possedere  
appieno la saggezza delle cose future,  
avvertono e prevedono quelle imminenti...”*

Filostrato d’Atene, II-III sec. D.C.

Da: *“Vita di Apollonio di Tiana”*<sup>1</sup>

*“...Il futuro non si prevede, si inventa  
e agire e creare tecnologie nel presente  
è la sola macchina che abbiamo  
per viaggiare avanti nel tempo...”*

T. Pievani, filosofo della scienza

contemporaneo. Da: *Come saremo*<sup>2</sup>

### Presentazione

La generazione di medici, cui appartiene anche chi scrive, da ormai 50 anni è nel mondo della Sanità, chi in laboratorio, chi in corsia, chi fra carte (oggi come ieri), pc e mille incombenze burocratiche; in mezzo secolo ha visto le proprie competenze rivoluzionate da eventi, scoperte e innovazioni epocali, tant’è che molte di esse hanno occupato le prime pagine dei giornali o sono state annunciate in modo roboante dai notiziari radiotelevisivi, a sottolinearne l’importanza nella vita quotidiana di ciascuno di noi, come ricercatori, o clinici o semplici fruitori. Ricordiamo, vere e proprie “hit” scientifiche e tecnologiche, i primi trapianti di cuore, fegato e midollo negli anni ‘60/’70 del secolo passato, l’individuazione di nuovi patogeni devastanti come HIV e HCV negli anni ‘80, le metodiche di clonazione e le nuove modalità di procreazione in vitro negli

anni ‘90, quindi, nel secolo appena iniziato, il sequenziamento del genoma umano (Human Genome Project) e le tecniche per editarlo e modificarlo<sup>3</sup>. Ma tutto questo è solo la punta dell’iceberg: molto altro (Tab. 1) ha modificato radicalmente la professione medico-sanitaria; è l’iter procedurale clinico, dalla diagnosi alla scelta terapeutica, da un punto di vista teorico-concettuale, nonché operativo e pratico, che negli ultimi anni è stato profondamente mutato, dopo un lunghissimo tempo di immobilismo e arroccamento su posizioni professionali preconcepite rivelatesi off-time e inadeguate ad accogliere la rivoluzione tecnologica. Da una Medicina empirica, basata sui sintomi, che promuove decisioni intuitive, si è passati alla cosiddetta “medicina basata sulle evidenze”, che si avvale di modelli ragionati, per confluire, oggi e ancor più nel prossimo futuro, nella personalizzazione delle procedure diagnostiche e terapeutiche o, meglio definita, in una “Medicina di Precisione”: applicazione di regole, algoritmi e riferimenti, raccolti e consultabili in databases ove discriminare fra i cosiddetti “big data”, a supporto di un ragionamento e azione clinica precisa, specifica ed efficace. Si vengono pertanto a delineare tre fasi: la raccolta dei dati individuali, genetici, molecolari e ultrastrutturali, che trovano nel sequenziamento del genoma e nell’impiego delle nuove discipline -omiche un essenziale fondamento metodologico; l’analisi dei dati raccolti, il confronto con (milioni, miliardi?) di informazioni - big data - conservati e

selezionati mediante i nuovi supporti informatici e la disponibilità di algoritmi e riferimenti decisionali; la traduzione e la conversione in un atto medico personalizzato, “preciso”, che può riguardare la prevenzione, la diagnosi, la cura<sup>4</sup>.

### **Definizione di “Medicina Personalizzata o di Precisione”**

Consiste nell'applicazione delle specificità individuali, oggi a disposizione mediante sequenziamento del genoma e altre caratteristiche molecolari e ultrastrutturali, che le biotecnologie permettono di analizzare, trasferendole dalla teoria e dai laboratori direttamente nella gestione clinico-pratica di un paziente, coinvolgendo le procedure diagnostiche, le terapie e il monitoraggio delle stesse, l'analisi dell'evoluzione della patologia e la formulazione prognostica. Questi dati “innovativi” si coniugano con le peculiarità psico-fisiologiche del singolo, nonché con parametri quali etnia, età e, soprattutto, differenze di genere (marcate, ad es., nelle malattie cardiovascolari, neoplastiche, endocrino-metaboliche e mentali).

Dobbiamo tener conto della diversità genetica inter-individuale insita nei genomi umani (1 nucleotide/800), che comprende SNPs, inserzioni, delezioni, intere sequenze: alcune contribuiscono alla variabilità della risposta terapeutica; come possono riflettersi anche nella diagnosi genetica delle malattie e nell'ottimizzazione dei trattamenti? *“Forse dobbiamo rivedere la definizione stessa di “genoma umano”, uguale come specie ma diverso e variabile negli individui.”*<sup>5</sup> *“Ma qual è il genoma umano? Esiste una base identica comune per tutti da cui partire? Forse dobbiamo parlare di una “rosa” di genomi abbastanza somiglianti fra loro che ci caratterizzano come specie. Si è ormai dissolta la speranza di definirci senza ambiguità dal punto di vista biologico e genetico”*<sup>6</sup>.

Tutto questo vale per la parte di genoma che conosciamo: ma il suo lato oscuro? Il DNA non codificante (ncDNA)? Che ruolo e peso ha nello sviluppo delle malattie (in alcuni casi dimostrato: neuroblastoma, distrofia muscolare, cardiopatie congenite, sono patologie in cui sono coinvolti geni o sequenze situate in ncDNA) e nella risposta individuale ai farmaci? E che dire dei rapporti fra andamento ciclico dell'espressione genica e ritmi circadiani, studiati, ancora poco, dalla cronobiologia? Sarà necessario un monitoraggio personalizzato dei ritmi, per determinare orari ottimali differenziati di somministrazione dei farmaci, in base al profilo di espressione genica nelle 24h?<sup>7</sup>

La Medicina di Precisione non è un concetto nuovo: già è stata applicata, anche solo empiricamente, in infettivologia – antibiogrammi specifici in infezioni individuali-, malattie psichiatriche –farmaci + psicoterapia personale-, oncologia, terapia del dolore (negli ultimi decenni la ricerca ha compiuto notevoli progressi per modularla in funzione delle caratteristiche del paziente). La svolta si è avuta con il Progetto Genoma Umano (HGP) e la possibilità oggi di sequenziare, presto, bene ed economicamente, i nostri genomi, con i progressi delle biotecnologie, le nuove terapie geniche, l'uso delle cellule staminali, che stanno allargando gli orizzonti applicativi della Medicina di Precisione.

Presto potremo avere il DNA e altri dati molecolari e finemente ultrastrutturali nella nostra cartella clinica; l'informatica deve sviluppare strumenti di analisi e calcolo per questi dati, nonché algoritmi di semplice consultazione ma al tempo stesso in grado di coniugare teoria, pratica clinica, esperienza e innovazione; solo così il medico potrà usare correttamente e razionalmente la gran mole di dati che verranno messi a sua disposizione, in tutto l'iter procedurale, dalla diagnosi di una malattia, all'impiego di farmaci personalizzati, alla possibilità di prevedere l'evoluzione del quadro clinico<sup>4</sup>.

La Medicina classica si trasformerà in Medicina preventiva, predittiva, di precisione, in base al profilo genetico, molecolare e ultrastrutturale di ciascun paziente. *“La Medicina a taglia unica che abbiamo conosciuto negli ultimi cento anni cederà il passo ad una Medicina confezionata su misura per ciascun individuo”* (G. Church)<sup>8</sup>.

Ogni campo della Medicina è e sarà interessato in modo trasversale e rivoluzionato dalle moderne biotecnologie, che pertanto si intersecano ampiamente e inevitabilmente con l'odierna, e ancor più prossima, concezione di una Medicina personalizzata, meglio definita “di precisione”. Ogni aspetto della professione medica ne verrà sconvolto, non solo a livello dottrinale e pratico, ma anche e soprattutto etico. Siamo pronti ad affrontare questa rivoluzione epocale? A trasformarla in grande opportunità e ad evitare conflitti fra ipertecnicismo e “*humanitas medendi*”? Sarà necessario investire di più e meglio nell'alfabetizzazione degli operatori sanitari e dell'opinione pubblica, soprattutto in temi quali “inizio e fine vita”, terapia del dolore, privacy, corretto impiego dei dati genetici e personali e quant'altro la tecnologia metterà a disposizione per una fruizione, è auspicabile, allargata e democratica, ma rischiosa e per ora aliena da controlli, normative e “paletti” universalmente concepiti e condivisi. Senza tralasciare gli enormi interessi economici che verranno coinvolti e i conflitti tra pubblico e privato, quasi inevitabili.

Nell'ambito della riforma sanitaria voluta dal Presidente Obama e dalla sua amministrazione, nel 2015, ampio spazio fu dato ad un programma per ampliare la ricerca e la platea di fruitori della Medicina di Precisione, anche e soprattutto con un investimento iniziale di 215 milioni di dollari. Questo, in sintesi, il discorso programmatico del Presidente: *“Un momento storico che segna la nascita della Medicina di Precisione, finora campo di ricerca per pochi scienziati,*

*con l'obiettivo di renderla fruibile da tutti in tutto il mondo. In un futuro a portata di mano la terapia diverrà su misura per ogni singolo paziente, colpendo con precisione il bersaglio, guidata dalla moltitudine di dati che derivano dalla decifrazione del genoma; dati che, correttamente interpretati, permetteranno di comprendere i meccanismi alla base dell'origine e della progressione di ogni malattia e di ogni caso clinico”*<sup>9</sup>.

Infine, riportiamo il pensiero di un altro esperto in materia, S. S. Jamuar: *“Mediante la conoscenza del genoma delle popolazioni umane, stiamo disegnando la Medicina del futuro, cioè una Medicina personalizzata e, giocoforza, di precisione, che dall'attuale modello “one size fits all”, rivelatosi impreciso e approssimativo, avrà più informazioni sulla predisposizione alle malattie, su come prevenirle, su come scegliere i trattamenti migliori paziente per paziente. Oggi, quasi il 40% dei farmaci somministrati risulta inefficace, soprattutto nel campo delle malattie croniche e degenerative, quelle cioè che aumenteranno in una umanità più numerosa e longeva”*<sup>10</sup>.

Tutte le conoscenze emerse nei laboratori dovranno essere realmente portate al servizio dei malati. Per accelerare e migliorare tempi e modi delle terapie, devono essere sviluppati test sempre più accurati, che permettano di prevedere, a partire dalle cellule del paziente, se una molecola funzionerà o meno. Siamo così passati dalle colture cellulari tradizionali, a quelle in 3D, agli organoidi, ai tumoroidi, riproducibili, è auspicabile, in molti laboratori, mediante metodiche standardizzate. A breve disporremo di un organoide-standard per ogni paziente o per gruppi omogenei di pazienti, sì da capire a quale terapia un tumore, o altra patologia d'organo, risponde meglio, tessuti normali e patologici in cui confrontare e sperimentare test diagnostici e terapie innovative.

## ***Come cambia la salute? Nuovi scenari per la Medicina di Precisione***

La Medicina di Precisione trova oggi uno scenario di salute globale in profonda trasformazione, dato di fatto che si accentuerà sempre più nei prossimi decenni: variazioni climatiche, socio-economiche, migrazioni, conflitti sconvolgono il panorama delle malattie umane, note ed emergenti, epidemiologicamente e clinicamente, per cui chi si occupa di ricerca e diffusione del nuovo modello diagnostico e curativo non potrà non tenerne conto.

C. Murray, del *“Global Burden of Disease”*, ha pubblicato nel 2015 una sintesi della situazione e dei cambiamenti più rilevanti su scala planetaria<sup>11</sup>:

- Aumento delle malattie croniche e invalidanti, diminuzione di quelle acute;
- Speranza di vita/media nel mondo: 69 anni per gli uomini, 75 per le donne;
- Decremento significativo della mortalità infantile < 5 anni: 5.8 milioni di morti nel 2015 vs 12.1 nel 1990. In questa fascia di età nello stesso periodo la mortalità per HIV e malaria si è ridotta di 1/3;
- Nel mondo oggi il 70% dei decessi è causato da malattie cardiovascolari, nefrologiche, neurologiche, diabete, tossicodipendenza. Il gap epidemiologico fra paesi benestanti e non si è notevolmente ridotto;
- Molte infezioni tuttavia sono sottostimate: tifo, morbillo, legionellosi, epatiti alimentari, malattie genericamente “tropicali” nei paesi a clima temperato;
- Negli ultimi venti anni, tra i fattori di rischio, sono diminuiti quelli legati all’uso del tabacco, alla denutrizione infantile, all’impiego di acqua non potabile; sono aumentati i fattori legati all’obesità, alle tossicodipendenze e all’alcool, all’iperglicemia e diete incongrue, all’inquinamento, ma soprattutto all’esposizione a cancerogeni nei paesi LMICs (“Low and

Middle Income Countries”), a forte e incontrollata industrializzazione e all’aumento del rilascio di sostanze inquinanti nell’ambiente: quest’ultimo punto vede un drammatico avvicinamento epidemiologico di Cina, India e Brasile a USA, Russia ed Europa per quanto riguarda l’aumento dei tumori;

- La perdita di wellness, in Occidente, è dovuta soprattutto alle conseguenze di artrosi e osteoporosi, calo di vista e udito, depressione, carie dentarie, mentre nei paesi socio-economicamente più sfortunati a tutte le patologie che provocano anemia.

L’OMS ha richiamato l’attenzione su alcune minacce per la salute globale nei prossimi anni, emergenze e priorità da affrontare<sup>12</sup>:

- 1) Emergenze infettive: dengue, Ebola, virus influenza H1N1 potenzialmente pandemico, patogeno X la cui diffusione dipenderà dai cambiamenti climatici;
- 2) Problemi sanitari e socio-economici legati all’HIV;
- 3) Aumento delle antibioticoresistenze, in particolare in alcune infezioni (tubercolosi);
- 4) Conseguenze per esitazione, riluttanza e negligenza ad eseguire le vaccinazioni nell’infanzia e inadeguata copertura; necessità di incrementare in modo deciso le vaccinazioni anti-HPV e anti-morbillo; mancata totale eradicazione di alcune infezioni come la poliomielite;
- 5) Malattie legate alle dipendenze da droghe, alcool, fumo e abitudini quali inattività fisica, sedentarietà e cattiva alimentazione;
- 6) Conseguenze patologiche dovute ai cambiamenti climatici (globale) e all’inquinamento dell’aria da combustibili fossili (paesi ad “economia emergente”);
- 7) Inadeguatezza delle cure primarie;

8) Fragilità delle popolazioni (1.6 miliardi di persone) che vivono in zone di crisi con sistemi sanitari perennemente deboli.

L'Italia vive una situazione particolare, per l'invecchiamento della popolazione, maggiore che altrove e le variazioni climatiche: a causa delle ondate di calore, più frequenti e più lunghe, gli anziani in estate muoiono il 13% in più rispetto all'inverno.

### **Sequenziamento dei genomi**

In meno di 20 anni, dal primo sequenziamento del genoma umano, costi e tempi di esecuzione si sono clamorosamente ridotti: oggi per ottenere la sequenza di un genoma personale, da consegnare all'interessato o al medico curante o da inserire, a breve, nella cartella clinica, sono sufficienti poche centinaia di dollari o euro e alcune ore di lavoro completamente automatizzato. La tendenza è una ulteriore riduzione nei prossimi anni sia della spesa che del tempo impiegato, grazie ai sequenziatori di ultima generazione che tra l'altro possono eseguire più campioni in contemporanea senza problemi di commistione e inquinamento<sup>13</sup>. Ci chiediamo tuttavia se questa corsa alla riduzione dei costi e dei tempi per sequenziare un genoma individuale si accompagni ad un mantenimento, meglio ad un'implementazione degli standard di qualità, soprattutto nelle applicazioni in campo medico; qualche dubbio è più che legittimo (Tab. 2).

In tempi recenti sono stati progettati diversi studi internazionali per screenare geneticamente popolazioni intere o gruppi consistenti; alcuni in prospettiva appaiono interessanti e promettenti nelle conoscenze e ricadute cliniche, altri faraonici e di difficile esecutività, specie da un punto di vista economico, per cui al momento sembrano galleggiare tra sogni e desideri; diamo conto di alcuni in parte già avviati e dei rispettivi promotori.

- deCODE: azienda islandese che si era posta l'obiettivo di sequenziare i genomi di tutti gli abitanti dell'isola (300.000 persone), fallita a metà operazione. Sono state trovate rare mutazioni correlate con la scarsa suscettibilità di una popolazione piccola e quasi segregata alle patologie neurodegenerative e cardiovascolari.
- Beijing Genomics Institute, il più grande istituto al mondo per sequenziamento; 128 macchine "Illumina HiSeq 2000", con una potenzialità superiore a tutti gli USA, 10.000 genomi/anno. Ha finora lavorato poco o nulla, sequenziando il genoma di 1000 batteri del microbiota umano.
- La polizia cinese ha iniziato la schedatura genetica della popolazione; la prima parte del programma riguarda 40 milioni di persone, reclutate fra dissidenti, gruppi islamici, carcerati, migranti, il che ha suscitato aspre polemiche interne e all'estero per il mancato rispetto dei diritti civili e la discriminazione delle minoranze.
- India: progetto per mappare geneticamente 1.300.000.000 di indiani, da parte di "Global Gene Corporation", consorzio privato con l'approvazione delle autorità pubbliche.
- "Earth BioGenome Project": sequenziare i genomi di tutte le specie di eucarioti sulla terra; tempo stimato: 10 anni; costo previsto: 4.7 miliardi \$; numero di specie da analizzare: sconosciuto; specie già sequenziate: 15.000.

Attualmente il 60% del DNA custodito nelle banche-dati genetiche rappresenta solo il 5% delle etnie del mondo, perlopiù caucasiche<sup>14</sup>.

Da quando F. Sanger mise a punto negli anni '70 le prime tecniche per il sequenziamento del DNA (ricevendo il suo secondo premio Nobel), i progressi in questo settore della genetica medica sono stati incredibili: il primo sequenziamento del

nostro genoma, l'automazione quasi completa delle procedure, l'abbattimento di costi e tempi, le prime applicazioni nella Medicina personalizzata e di precisione, dalla diagnostica alla terapia.

La piattaforma d'élite è oggi la "Next Generation Sequencing"<sup>15</sup>, che coniuga velocità e accuratezza: il genoma è frammentato in sequenze corte di 200/300 bp, amplificate su un chip, sequenziate e lette più volte, perlopiù mediante emissione di fluorescenza specifica per ogni nucleotide, riallineate mediante complessi calcoli e procedure bioinformatiche e ricostruite nel DNA intero. È dunque una tecnologia che utilizza più metodiche e professionalità.

Tutte le tecnologie e piattaforme di sequenziamento oggi a disposizione hanno dei limiti, segnaliamo questi punti critici: variabilità dei risultati a seconda del tipo di piattaforma; discordanza fra le diverse procedure nel rilevare le mutazioni, tant'è che nessun metodo finora riconosce tutte le mutazioni possibili; assenza di spiegazione e correlazione con il quadro clinico di numerosi dati, che risentono anche della variabilità di interpretazione a seconda del lettore.

### ***Sequenziamento per screening pre e post-natale: indicazioni, limiti e questioni etiche***

Due sono le proposte innovative che illustriamo<sup>16</sup>.

1) Screening genetico prenatale mediante analisi del DNA fetale circolante nel sangue materno: consente di conoscere varianti genetiche potenzialmente rilevanti e mutazioni associate a malattie genetiche. Ciò è possibile grazie ad una nuova tecnica che esamina gli aplotipi, discriminando fra fetali e materni e identificando quelli di derivazione paterna (ricavati da DNA salivare), dunque isola le sole informazioni genetiche riguardanti il nascituro. Procedendo ad un confronto fra gli aplotipi, le mutazioni assenti nei genomi genitoriali sono ovviamente insorte ex novo nel feto. Vi sono ancora diversi problemi procedurali, specie quando non si conosce il genoma paterno: gli

aplotipi che non compaiono nel genoma materno sono sì del feto, ma possono provenire dal padre o essere dovuti a mutazioni.

2) Screening genetico dei neonati, al fine di rilevare precocemente potenziali fattori di rischio genetico. Tecnicamente e teoricamente è possibile, economicamente assai problematico. I promotori hanno stimato che, iniziando oggi, fra alcuni anni si potrebbe disporre del DNA di tutti i neonati (!?). È stato osservato che la miriade di informazioni genetiche ottenute aiuterebbe genitori e medici nelle cure neo e post-natali, ma aggiungendo anche ansie, difficoltà e costi inutili.

Diversi i problemi e i limiti che si prospettano per questi progetti: i costi elevati; l'interpretazione dei risultati e le correlazioni con le caratteristiche umane e il quadro clinico, talora dubbie e non standardizzate; l'assenza di protocolli e linee-guida sull'utilizzo dei dati; il pericolo che screening indiscriminati ed eccessivi possano suscitare paure, ansie e timori nei genitori. Infine, ci chiediamo, nel caso di individuazione di mutazioni che predispongono a malattie nell'adulto, o che esulano da quanto richiesto nel singolo caso e nel quesito di base: come comportarsi? e con chi il genetista deve rapportarsi, con il clinico e/o i genitori?

In definitiva, sono ancora molti i problemi connessi al sequenziamento dei genomi umani, tecnici, applicativi, etico-deontologici: prima di utilizzare di routine i dati offerti da questa, comunque, grande opportunità nella Medicina di Precisione, serviranno standard procedurali e controlli di qualità prossimi alla perfezione, riflessioni attente e normative condivise. Riassumendo<sup>17</sup>: la corsa sfrenata ad ottenere sequenziamenti a costi sempre più bassi e in tempi ridottissimi, non andrà a discapito della qualità e di un risultato finale che, nelle applicazioni in campo medico, non dovrebbe tollerare errori né imperfezioni? In tema di privacy, a chi appartengono i dati raccolti?

Per quanto tempo, come e da chi vanno conservati? Ripercorreremo gli errori già commessi nell'era pre-digitale e precedente gli screening genetici? L'inevitabile commistione pubblico-privato nei finanziamenti, porterà benefici o anche problemi di gestione? Come interpretare, pubblicizzare e utilizzare dati "sensibili" per definizione? Come comportarsi quando vengono rilevate nuove mutazioni connesse a patologie umane? Come comunicare all'utente dati spesso difficili da spiegare o di dubbia interpretazione? Le potenzialità delle macchine attuali, verranno sfruttate per schedature di massa (Cina docet), e non per finalità prettamente cliniche e mediche? Conoscere informazioni e predisposizioni rilevate nel genoma proprio e dei figli, potrebbe innescare ansie, timori e turbamenti comprensibili. In questi timori rientrano anche i programmi genetici per i futuri nascituri. L'obiettivo è la ricerca di standard scientifici, legali ed etici, per usare nel modo migliore i dati genetici dell'umanità, a garanzia di tutti.

### ***Editing genetico: la rivoluzione delle nuove tecnologie***

Modificare (editare) tratti di un genoma viene eseguito già da alcuni anni con tecniche (vedi oltre) lunghe, costose e di non semplice praticabilità; l'introduzione della CRISPR-Cas9 sta rivoluzionando e semplificando le procedure di manipolazione<sup>18</sup>; nasce come memoria genetica di precedenti infezioni virali, integrata nel genoma di numerosi batteri, un patrimonio acquisito o ereditato dalle proprie ascendenze e utilizzato quale sistema di difesa immunitaria ad ogni nuova infezione. Abbiamo imparato a sfruttare quest'arma naturale per allestire forbici molecolari che tagliano nelle cellule il DNA in un target specifico. Contrariamente ai precedenti metodi di editing, che richiedevano enzimi specifici in ciascuna situazione, il sistema CRISPR-Cas9 utilizza sempre la stessa proteina enzimatica, Cas9, per ogni sequenza molecolare: il solo strumento specifico da costruire ad ogni

impiego è un RNA complementare che guida l'enzima Cas9 nel punto del genoma da tagliare; ma gli RNA sono più facili da preparare e maneggiare sia degli enzimi che del DNA stesso.

Presto sentiremo parlare molto di "Gene-Drive", una procedura ancora sperimentale e applicata solo a insetti e qualche mammifero, ma, in teoria, utilizzabile per il DNA di qualunque essere vivente; fa sì che uno dei due alleli (eventualmente modificato) sia ereditato molto più spesso dell'altro e, nel giro di poche generazioni, diventi predominante, se non esclusivo, in una popolazione. Pertanto altera, aumentando, le probabilità che un allele specifico venga trasmesso alla prole oltre la stima naturale del 50%. Funziona come un acceleratore per la diffusione di geni mutati, come quelli indotti per sterilizzare *Anopheles gambiae*. Normalmente, in accordo con le leggi di Mendel, un gene ha il 50% di probabilità di essere trasmesso da un genitore a un figlio, ma se viene guidato con un drive le sue chance possono essere portate al 100% nel giro di qualche generazione. Il gene programmato per interferire con la riproduttività di una specie nociva può propagarsi con un effetto domino in tutta la popolazione, fino a farla collassare.

Con le nuove tecnologie di editing si sono già realizzate o sono in fase avanzata di studio diverse sperimentazioni in campo biomedico<sup>19</sup>: creazione di piante alimentari resistenti a parassiti e patogeni; riproduzione in modelli animali di malattie umane: m. di Duchenne, tirosinemia; correzione di uno o più geni simultaneamente in: ipercolesterolemia familiare, fibrosi cistica, corea di Huntington, amaurosi di Leber, distrofia corneale di Meesmann; produzione e riprogrammazione in vitro di cellule staminali (staminali indotte) e primi approcci per una cura genetica di emofilia, anemia falciforme e  $\beta$ -talassemia; terapia genica dell'AIDS (mutazione del corecettore CCR5); immunoterapia del cancro (inibizione gene PD-1); "*Anopheles population eradication or*

*replacement*”: modifica genetica dei vettori di malaria e dengue (< fertilità femminile; < accoppiamenti; < capacità di trasmettere i parassiti); creazione di uova ipoallergeniche ottenute da animali editati, ove coltivare virus e allestire vaccini specifici per bambini allergici.

Per quanto riguarda l’applicazione di CRISPR e altre tecniche di editing genetico nelle cellule embrionali e germinali umane, in cui si indurrebbero modificazioni ereditabili dalla progenie e praticamente irreversibili, si rimanda alla conferenza dell’Autore presso l’Accademia Lancisiana e relativi Atti<sup>20</sup>, ove le problematiche metodologiche, etiche e normative sono state ampiamente illustrate.

### ***Mapa delle specificità molecolari e genetiche di tutte le cellule umane***

Le cellule del corpo umano non contengono tutte la stessa sequenza di DNA, né i geni il medesimo livello di espressione: le variazioni genetiche sono tante e tali nei diversi tessuti che si dovrebbe parlare di “mosaico genetico”. Siamo caratterizzati da un ventaglio di cellule con caratteristiche genetiche parzialmente non sovrapponibili, in condizioni basali e fisiologiche, ancor più accentuate in caso di deviazione patologica, conseguenza di mutazioni specifiche nei singoli citotipi, quali e quanti-tative. Le divergenze maggiori si osservano nelle cellule epiteliali, ematiche, dell’epidermide e soprattutto nei neuroni. Lo studio del DNA di un tessuto non rispecchia quanto osservabile in un altro isotipo<sup>21</sup>. Ovviamente questa differenziazione si traduce in altrettante specificità molecolari che caratterizzano ogni singola cellula.

La tecnica che permette di studiare queste specificità è denominata MALBAC, “*Multiple annealing and looping based amplification*”, utilizzata nel progetto internazionale “*GTEX, Genotype-Tissue Expression*”, il cui obiettivo non si limita a ricostruire le specificità genetiche di singole

cellule e tessuti, delineandone le differenze molecolari e nucleotidiche delle sequenze, ma anche di mappare l’espressione genica (produzione dei rispettivi mRNA) e le sequenze regolatorie. Finora sono stati testati 44 isotipi. I dati raccolti confluiscono nella redazione di “*Human Cell Atlas*” e “*Human Protein Atlas*”, disponibili in rete per ricercatori e clinici<sup>22</sup>. Al progetto lavora un Consorzio cui fanno capo 3 gruppi multidisciplinari, americano, svedese e giapponese.

La mole impressionante di dati raccolti, grazie alla bio-informatica e alla biologia computazionale, che permettono di analizzare milioni di cellule e miliardi di molecole, saranno convertiti negli atlanti suddetti; le conoscenze diverranno strumenti indispensabili nella personalizzazione delle terapie.

### ***Biotecnologie in diagnostica: laboratorio e imaging***

**Laboratorio.** Da un punto di vista clinico-pratico, l’individuazione di nuovi biomarcatori è indirizzata in modo da soddisfare una serie di criteri e quesiti essenziali<sup>23</sup>; quando usarli, nella prevenzione, nella diagnosi precoce o nel follow-up in corso di terapia; quali e come impiegarli in diverse situazioni cliniche, se singolarmente, ad alta specificità, o in combinazione differenziata tra loro, o in base alla natura, composizione e target, scegliendo tra molecolari, metabolici e genetici; infine, dove testarli, se in campioni biologici “generici” (sangue), o, più accuratamente, in cellule, tessuti e fluidi “specifici”, a contatto diretto con gli organi malati o intrinseci ad essi.

Le biotecnologie contribuiscono alla miniaturizzazione della strumentazione di laboratorio, ormai una realtà in chimica-clinica, presto anche negli altri settori<sup>24</sup>; la ricerca italiana è in prima linea e ha già portato contributi importanti: diamo alcuni esempi di “lab-on-a-chip” made in Italy. 1) Micro-chip in cui un campo elettrico separa e

intrappola, in migliaia di gabbiette dielettroforetiche, singole cellule, poi analizzate individualmente (tecnologia DEPArray). Le prime applicazioni sono state in oncologia e in test prenatali. 2) Laboratori per analisi chimico-cliniche costituiti da supporti in plastica (isolante ma conduttore di elettricità) in cui sono inseriti numerosi sensori elettronici, tanti quanti i parametri da analizzare. 3) Circuiti come i MEMS (*micro-electro-mechanical systems*), integrati su un substrato di materiale semiconduttore (silicio), coniugano funzioni elettroniche, meccaniche, ottiche, biologiche e di gestione fluidi. Funzionano a cartucce intercambiabili.

**Imaging.** Anche in questo campo le tecnologie bio-mediche stanno apportando numerose offerte innovative, alcune delle quali frutto della ricerca italiana; illustriamo quanto è già disponibile o lo sarà a breve.

**Stimolazione magnetica transcranica<sup>25</sup>.** Tecnica non invasiva per studiare lo status funzionale dei circuiti cerebrali, mediante un campo magnetico applicato sul capo, che modifica per un breve tempo l'attività delle aree del cervello oggetto di studio. Le modificazioni indotte dal campo magnetico sono documentate da una RMN eseguita prima, durante e dopo l'applicazione.

**MRI (Magnetic Resonance Imaging)<sup>26</sup>.** Studia quali aree cerebrali si attivano durante lo svolgimento di una determinata azione e le differenze rispetto ad una condizione basale di scarsa o nessuna attività. Si possono effettuare confronti fra più persone o mappare strutturalmente e funzionalmente ogni singolo cervello.

**Risonanza magnetica funzionale (fRMN) in neurologia<sup>27</sup>.** Impiegata prevalentemente per ricerca e non da tutti ancora accettata e apprezzata, misura le variazioni dell'ossigenazione sanguigna nel tempo (segnale BOLD, *Blood Oxygenation Level Dependent*), legata all'attività neuronale in uno specifico contesto funzionale. Individua, in condizioni normali e patologiche, le aree cerebrali attivate durante stimolazioni motoria e sensoriale, attraverso la generazione di mappe di attivazione che mostrano quali aree sono coinvolte e

correlate al pattern stimolatorio applicato. fRMN sfrutta i cambiamenti di magnetizzazione tra flusso ematico povero e ricco di ossigeno e registrati mediante tecnologie di scansione MRI convenzionali.

**Mini-robot<sup>28</sup>.** Sono in fase di sviluppo capsule robotiche attive, grandi come una pillola, ideate per screening, diagnosi e procedure terapeutiche; contengono microcircuiti che consentono di comandarle a distanza, per muoversi e spostarsi, mediante campi magnetici. Possono incorporare: 1) videocamere spettroscopiche, per effettuare ricognizioni e inviare immagini; 2) pinze per semplici operazioni, suture e biopsie, capaci anche di assemblarsi in bracci chirurgici per interventi più complessi; 3) dispositivi medicati, per rilasciare farmaci in sedi specifiche. Ultima frontiera: Mini-robot a DNA, per diagnostica e terapia individualizzate.

**Microscopia elettronica 4D + programmi di computer-grafica<sup>29</sup>.** Genera immagini e filmati di situazioni e processi che si svolgono alle nano e microscale (NEMS e MEMS) e a intervalli temporali dei femtosecondi; i programmi registrano ed elaborano migliaia di immagini, in sequenza, di fotogrammi ottenuti secondo una scansione temporale definita. Nata come tecnica industriale e in chimica-fisica, trova le prime applicazioni in Medicina per lo studio delle patologie di membrana, degli organuli sub-cellulari (mitocondri, fagosomi), sub-nucleari (nucleolo, cromosomi) e delle proteine (struttura, ripiegamento, assemblaggio).

**ZAP/ZIP<sup>30</sup>.** Viene "perturbata" - zap - mediante stimolazione magnetica transcranica l'attività cerebrale, registrata con EEG prima e dopo ZAP e i dati elaborati e compressi - zip - grazie ad un algoritmo dedicato. Si ricava un indice, PCI (indice di complessità perturbativa), una sorta di "coscienziometro" che, una volta calibrato con un determinato "cut-off", può aiutare a valutare la presenza o meno e i livelli di coscienza residua di malati con gravi danni cerebrali. La procedura è stata messa a punto presso l'Università Statale di Milano.

**REMS (Radiofrequency Echografic Multi Spectrometry)**<sup>31</sup>. Nuova tecnica (brevetto italiano) che consente di valutare la mineralizzazione dell'osso senza radiazioni e di evidenziarne la fragilità in una fase precocissima. Impiega ultrasuoni e radiofrequenze e si è rivelata sovrapponibile nei risultati ai metodi convenzionali.

**Optogenetica**<sup>32</sup>. Combina ingegneria genetica e ottica, per studiare e controllare in maniera non invasiva i circuiti cerebrali. L'inserimento di geni che codificano per proteine sensibili alla luce, in siti specifici, consente di seguire strutture, funzioni e circuiti in determinate aree del cervello. La tecnica, sperimentata nei mammiferi, diverrà sicura anche nell'uomo quando si supereranno i problemi legati all'introduzione di geni (vedi anche nel capitolo: "terapia genica") per proteine fotosensibili nei neuroni, mediante vettori virali. Di recente è stata ingegnerizzata una proteina fotosensibile di derivazione batterica, chiamata Jaws: è un'opsina sensibile alla luce rossa, che attiva o sopprime i segnali elettrici dei circuiti neuronali a comando, dopo aver ricevuto un impulso luminoso. Oltre che nella ricerca e nella diagnostica, si intravedono possibilità applicative anche nella terapia di quelle patologie epilettiche e neurodegenerative, in cui si conosca un target molecolare o un circuito da poter attivare o spegnere geneticamente. Si riaprono comunque questioni etiche: si potrebbero modificare anche funzioni cognitive, pensieri, ricordi, affetti, pulsioni, in coloro ai quali venisse applicata questa tecnologia di "modulazione cerebrale", come già accaduto con alcuni psicofarmaci?

### ***Nuove tecnologie per una terapia personalizzata***

È stato stimato che circa il 40% dei farmaci che vengono prescritti provoca interazioni molecolari, dalle conseguenze ora ininfluenti, ma talora significative, dettate da geni o nella loro forma "wild type" o in conseguenza di mutazioni, che conosciamo solo in una piccolissima percentuale di situazioni. La ricerca sta approfondendo il settore della farmacogenomica e mette a disposizione un numero crescente di test (in epatologia, analgesia<sup>a</sup>, neuropsichiatria, emostasi, ad es.), peraltro ancora costosi e a diffusione limitata; ci chiediamo quanto siano affidabili, come e da chi vanno interpretati, quanto pesano in termine di privacy, economia e fattibilità clinica nella gestione pratica dei singoli casi clinici, senza tralasciare il pericolo di cadere in una situazione di uso e abuso. È innegabile comunque che il futuro delle terapie mediche sarà profondamente orientato e condizionato dall'assetto genetico di ciascun paziente: anzi, possiamo affermare che il target prioritario della Medicina di Precisione è proprio l'individuazione di una cura personalizzata e mirata in ogni singolo caso, inteso come persona nella sua specificità e unicità psichica, fisica e genetica.

**Nuove tecnologie per progettare e preparare farmaci e vaccini.** Riportiamo alcuni esempi. Farmaci, ma soprattutto vaccini a DNA: plasmidi sono veicolati all'interno di cellule dell'epidermide dell'ospite, indotte da geni specifici a produrre proteine (antigeni) di un determinato microrganismo, presentati ad APC, che stimolano il sistema immunitario ad una risposta anticorpale e/o cellulare in caso di infezione. Mediante questa procedura, sono in sperimentazione vaccini anti-

---

<sup>a</sup> Un esempio: Il gene CYP2D6 condiziona la conversione della codeina in morfina, a seconda se presente in una o più copie e quanto enzima codifica. La sua valutazione permette pertanto di dosare il farmaco analgesico per evitare di darne troppo o troppo poco<sup>33</sup>.

influenza, HCV, HIV<sup>34</sup> e nell'immunoterapia di melanoma ed epatocarcinoma. Modelli computazionali, algoritmi "*mechanism learning*" accelerano la ricerca di farmaci e materiali nuovi, analizzando milioni di dati e scegliendo la molecola giusta da sperimentare fra migliaia esaminate, in breve tempo. È la nuova via, ad es., per antibiotici, antivirali e antitumorali innovativi. Ci affideremo all'Intelligenza Artificiale? Impianti di cellule immunocompatibili o immunoelusive, che producono *in situ* farmaci o sostanze mancanti (es., cellule pancreatiche per insulina). Sono in progetto cellule da IPS o sintetiche.

**Nuove tecnologie per somministrare farmaci e vaccini<sup>35</sup>.** Anche in questo caso riportiamo alcuni esempi. Farmaci e vaccini a DNA: obiettivi sono un miglior assorbimento in situ (elettroporazione), una produzione di proteine più efficiente, mediante l'aggiunta di geni adiuvanti e purificando gli antigeni, una stimolazione più robusta del sistema immunitario tramite adiuvanti naturali. Ingegnerizzazione di nanoparticelle, costruite su base molecolare, per veicolare vaccini e adiuvanti direttamente nei linfonodi, o di involucro nanoscopico, in grado di eludere i sistemi di allarme delle cellule immunitarie e trasportare gli antitumorali direttamente entro i tumori solidi. Infine, l'allestimento di nanorobot a DNA (DNA walking) per indirizzare farmaci su bersagli specifici, basandosi sulle interazioni tra sequenze complementari di materiale genetico poste sul vettore e sulla cellula-target.

### **Terapia genica**

Il primo intervento coronato da successo è del 1990, in un bambino affetto da S.C.I.D. Sono seguiti anni di insuccessi e ripensamenti, dovuti soprattutto all'imprecisione e alla fallibilità delle prime tecniche di manipolazione genica e alla delicata scelta dei vettori virali, finché nel

2016 una leucemia linfoide acuta infantile è stata guarita ingegnerizzando i linfociti T.

La base di ogni terapia genica consiste nell'introdurre nelle cellule bersaglio un tratto di DNA con il gene corretto, dopo aver modificato o sostituito quello alterato (o assente o comunque difettoso), con una delle tecniche di editing genetico convenzionali – ZFN, TALEN – o innovative, CRISPR-Cas9, mediante un vettore virale (adenovirus, retrovirus apatogeni, AAVV) plasmidico. Potenziale target sono tutte le patologie umane perlopiù riconducibili a SNPs<sup>36</sup>. A seconda delle cellule interessate, parliamo di terapia genica somatica o germinale: in questo secondo caso la correzione introdotta si trasmetterà alla progenie.

Gli approcci terapeutici coronati da successo si stanno moltiplicando, indicazioni e prospettive coprono ormai numerosi campi della patologia umana<sup>37</sup>. Sono state approvate e attuate con successo, in Europa e USA, terapie geniche per: deficienza di lipoprotein-lipasi (2012); amaurosi congenita di Leber, deficienza immunitaria di ADA, adrenoleucodistrofia (2014); emofilia A (2016); cecità congenita associata a retinopatia (diverse forme), neuropatia assonale gigante del midollo spinale, atrofia muscolare spinale, malattia di Lou-Gehring, alcune forme di leucemie e linfomi mediante le cellule CAR-T, SCID-X1 – Telethon – (2016-2019); prima terapia mediante silenziamento genico da interferenza a RNA, nella neuropatia da amiloidosi hATTR (2018). Sono in corso di approvazione diversi brevetti italiani per la terapia genica di: leucodistrofia metacromatica e sindrome di Wiskott-Aldrich, impiegando, quali vettori, retrovirus apatogeni e anemia falciforme.

I numerosi problemi che hanno rallentato o persino fatto fallire negli anni passati più di una terapia genica possiamo sintetizzarli in tre punti essenziali, oggi, dopo quasi trent'anni, in parte risolti:

**1) Scelta del vettore virale.** Adenovirus: a causa della loro grande diffusione e pregresse infezioni, possono scatenare una reazione immune o auto-immune, che elimina le cellule introdotte e devasta l'organismo. Oggi sono sperimentati sierotipi più sicuri e meno diffusi nell'uomo. Lentivirus e retrovirus: pur resi apatogeni, privati dei geni che codificano per i fattori di virulenza e le molecole di penetrazione, hanno causato tumori e leucemie, inoltre i pazienti sono riluttanti a farsi iniettare questo tipo di virus. I più usati oggi sono AAVV, virus adeno-associati, integrati nelle nostre cellule e dunque non soggetti a risposta immunitaria. Non esiste un vettore universale: virus diversi sono adatti per tipi cellulari diversi ove devono entrare e rilasciare il macchinario genetico (AAVV2 per gli occhi, AAVV8 per il fegato, AAVV9 per cuore e cervello).

**2) Scelta delle tecniche di editing.** Le "vecchie" metodiche (dita di zinco, ZFN, TALEN) sono superate in resa cellulare e specificità da CRISPR-Cas9, ma sono state ancora utilizzate con successo in alcune recenti terapie geniche, come ZFN per ottenere linfociti CAR-T e Cd4+ CCR5Δ32. Il futuro comunque dell'editing sembra appannaggio di CRISPR, nonostante anch'essa presenti ancora problemi di sicurezza, precisione, resa cellulare e maneggevolezza.

**3) Controllo dei geni trapiantati.** Spesso in passato i geni modificati sfuggivano ai controlli e iniziavano a funzionare autonomamente; oggi si inizia ad affiancarli a veri e propri "controller", interruttori molecolari in grado di regolare l'attivazione o lo spegnimento in modo programmato, ad es. con l'aggiunta o la sospensione in un secondo tempo di un ormone specifico (ecdisona) o di farmaci<sup>38</sup>.

In prospettiva, numerose sono le patologie in cui da anni si studia la possibilità di applicare la terapia genica, che potrebbe

risultare risolutiva qualora fossero superate le difficoltà tecniche che ne hanno finora limitato l'applicazione<sup>39</sup>; la ricerca italiana, e in particolare i progetti finanziati da "Telethon", sono all'avanguardia in tre gruppi di malattie congenite: metaboliche (m. di Pompe, m. di Fabry, m. di Austin, mucopolisaccaridosi I e VI); ematologiche ( $\beta$ -talassemia, emofilia B); muscolari (m. di Duchenne, in cui, a causa del fallimento dell'approccio con cellule modificate, si sperimenta una nuova via, riattivando anziché sostituendo i geni difettosi, distrofia facio-scapolo-omeroale, dei cingoli, miotonie, m. di Ullrich, m. di Charcot-Marie-Tooth).

Sono allo studio terapie geniche anche per la fibrosi cistica, malattia nella quale la difficoltà maggiore è rappresentata dalla breve vita delle cellule modificate nei polmoni e nelle vie aeree; ma la vera novità è di estendere la terapia genica a patologie in cui sono implicati difetti genetici non più solo congeniti, ma acquisiti nel corso della vita: alcune forme di leucemia linfoblastica acuta dei bambini resistenti alla chemioterapia, malattie neurodegenerative, epidermolisi bollosa.

Infine, tre progetti in fase sperimentale, per altrettante situazioni morbose, in cui la terapia genica potrebbe rivoluzionare cure e prognosi in alcuni casi selezionati<sup>40</sup>:

- **HIV:** replicare la rara mutazione di CCR5 (delta32) che rende i linfociti Cd4+ non infettabili da parte di HIV (modifica del gene che codifica per il recettore con ZFN, si da renderlo uguale ai mutanti naturali). Sono in preparazione anche vaccini preventivi o farmaci curativi che mascherano il recettore stesso.
- **Sindrome di Down:** in colture cellulari (da staminali pluripotenti prelevate a pazienti con s. di Down) è stata disattivata la copia in eccesso del cromosoma 21; è la prima volta che viene silenziato, con una procedura completamente nuova, non un solo gene, ma un intero cromosoma. È stato usato il gene XIST, che di solito "spegne" molti geni del cromosoma X

umano: più copie del gene hanno “ricoperto” il cromosoma in eccesso, disattivandolo.

- Trapianto di cellule midollari non compatibili, manipolando ed eliminando antigeni di superficie ed HLA e/o rendendoli il più simile possibile a quelli del ricevente. È un approccio innovativo per leucemie e linfomi pediatrici e immunodeficienze congenite, attuato con successo in alcuni bambini presso il “Bambino Gesù” di Roma da F. Locatelli.

### ***Impiego clinico delle cellule staminali***

Non è facile districarsi nella congerie di cellule staminali, embrionali, in particolare; di continuo vengono segnalate varianti più o meno specifiche, anche se poche alla prova delle sperimentazioni possono poi essere utilizzate per finalità bio-mediche<sup>41</sup>. In estrema sintesi, ricordiamo come le cellule della morula (i blastomeri) e quelle del nodo embrionale della blastocisti vengono dette pluripotenti; totipotente è considerato il solo zigote. Con il passare del tempo la pluripotenza diminuisce mentre aumenta la specializzazione: si passa ad uno stadio di multipotenza; cellule staminali multipotenti si possono ricavare dai tessuti già formati e sono capaci di replicare solo cellule di un tessuto od organo: ad esempio le varie cellule della pelle o le staminali emopoietiche. Cellule staminali progenitrici sono quelle la cui progenie terminalmente differenziata consiste in un sol tipo cellulare.

Nell’adulto, cellule staminali già specializzate si trovano in quantità nel midollo osseo, nel cervello, nel derma, nella polpa dentaria. Sorgente ricchissima di staminali è il cordone ombelicale, nonché il liquido amniotico. In Italia, con la cosiddetta “legge 40”, si è posto un divieto assoluto all’utilizzo di embrioni soprannumerari per ricerca scientifica, inclusa dunque qualunque sperimentazione, manipolazione e impiego delle cellule staminali.

Le cellule staminali pluripotenti ottenute mediante clonazione riguardano tuttora diverse specie animali, mentre hanno fallito nella linea umana.

S. Yamanaka e J. Gurdon hanno messo a punto la tecnica per riprogrammare cellule già differenziate dell’adulto<sup>42</sup>, come quelle cutanee: le cellule staminali indotte pluripotenti (IPS), dalle quali ottenere successivamente uno fra le centinaia di citotipi differenziati di elementi adulti, come e più delle staminali embrionali; si aprono nuovi scenari nella Medicina sostitutiva (trapianti) e rigenerativa.

IPS hanno pertanto le potenzialità di quelle embrionali ma derivano da cellule somatiche adulte dapprima differenziate e poi private di questa prerogativa, mediante induzione di un programma genetico di retro o s-differenziamento. Per modificare struttura e funzioni di una cellula, al punto di differenziarla in staminale, occorre rivoluzionare il suo piano di programmazione genetica: spegnere geni che erano attivati, accenderne altri che erano repressi; lo si può fare agendo sui fattori di trascrizione (TF), proteine situate nel nucleo e capaci di legarsi a sequenze specifiche di geni (Oct, Sox2, Klf4, c-Myc), regolandone (+/-) il grado di espressione. I TF sono codificati da famiglie di geni o “*master control gene*”, come OCT1/4, diffusi in tutti gli animali superiori, che fungono da supercontrollori: possiamo interagire anche con questi per modificare il destino genetico della cellula. Importante è anche la “resa cellulare”: è stato individuato un gene, Mbd3, che codifica per una proteina che “fa da freno” alla trasformazione delle cellule in IPS; inibendo il gene o bloccando la proteina, si ottengono staminali in numero assai maggiore. Nel differenziamento delle cellule staminali in adulte e nella riprogrammazione di queste in IPS, importante è il ruolo dei miRNA, favorevoli (let-7) o inibenti (ESCC) la condizione di staminalità.

Nella Tab. 3 illustriamo alcune applicazioni di cellule e tessuti, da vari tipi di staminali, IPS incluse, nella Medicina sostitutiva e rigenerativa, che sono già una realtà, indicando le cellule di provenienza, quelle ottenute e le modalità tecniche nelle procedure. Ancora una volta sottolineiamo i risultati della ricerca italiana.

Un ulteriore filone di studi utilizza le staminali in vitro per indagare numerose condizioni patologiche, dall'eziopatogenesi alla sperimentazione di nuovi farmaci<sup>43</sup>. Ecco alcuni esempi.

- Neuroni ottenuti da IPS: si interviene in coltura sulle modalità di trasmissione dei segnali nervosi, in modo da riprodurre le condizioni tipiche del m. di Parkinson; successivamente si interviene con nuove molecole al fine di trovare farmaci utilizzabili nella patologia.
- IPS, ottenute da fibroblasti cutanei riprogrammati, da pazienti con SLA, sono indotti in coltura a differenziarsi in neuroni che esibiscono le stesse caratteristiche e alterazioni della malattia: su queste cellule possiamo testare nuovi farmaci. Lo stesso approccio è stato effettuato in una variante dell'autismo, la sindrome di Timothy e nella degenerazione neuronale di Machado-Joseph.
- Cellule staminali embrionali sono state testate in vitro per studiare due patologie oculari, la degenerazione maculare e la distrofia maculare di Stargardt; i dati ottenuti hanno permesso il passaggio alle applicazioni in vivo, mediante introduzione delle stesse cellule nell'epitelio pigmentato della retina, con ottimi risultati visivi.
- Cellule staminali embrionali e fetali sono utilizzate per studiare in vitro diverse malattie neurodegenerative e cognitive: m. di Parkinson, m. di Alzheimer, SLA, c. di Huntington, atrofia muscolare spinale.

Da ultimo, alla luce di recenti, inquietanti risultati sperimentali, ci chiediamo quale sarà

nel prossimo futuro il ruolo delle cellule staminali nella procreazione, nonché il destino della procreazione stessa. H. Greely, del Center for Law and Biosciences alla Stanford University, in un articolo intitolato *"La fine del sesso?"*, afferma: *"Per procreare, fare sesso diventerà sempre meno necessario e obsoleto; fra pochi anni saremo in grado di ottenere spermatozoi e ovuli da cellule staminali, ad es. da cellule della pelle di genitori infertili e riprogrammarli per una fecondazione in vitro corretta. Questo ci porterà, inoltre, a fare una diagnosi genetica preimpianto sull'embrione e a modificare, mediante editing, il genoma per coloro che vogliono embrioni editati invece che semplicemente selezionati?"*<sup>44</sup>.

Da staminali embrionali e IPS si sono già ottenuti, in topi e altri animali, gameti maturi; nella nostra specie da IPS si sono generate cellule germinali primordiali e si prevede che si potranno ottenere entro 5 anni gameti maschili e femminili maturi, in grado, teoricamente, di guidare lo sviluppo di un embrione trapiantabile in utero. Le nuove procedure di procreazione sollevano le stesse questioni etiche, irrisolte, poste dalla ricerca e dall'editing genomico sugli embrioni umani. Le future, ma non troppo, tipologie di genitorialità necessitano di un'approfondita, razionale e non preconcetta discussione.

### **Medicina di Precisione, Biotecnologie e Malattie Infettive**

L'impiego delle biotecnologie in una Medicina di Precisione nelle malattie infettive deve tener conto di due emergenze globali che nei prossimi anni marcheranno sempre più la nostra vita: le variazioni quanti/qualitative del panorama microbiologico, conseguenza, anche e soprattutto, dei cambiamenti climatici e l'aumento del fenomeno delle antibioticoresistenze.

Riguardo al primo punto, riportiamo alcuni eventi drammaticamente attuali. Lo scioglimento dei ghiacci polari, con l'innalzamento dei mari e lo sversamento di detriti dalla terraferma agli oceani, e del

permafrost, sono fra le cause dell'immissione in tutti gli ambienti di microrganismi finora mai rilevati. Negli ultimi anni le specie virali negli oceani sono aumentate di > 100 volte. La loro distribuzione non è uniforme: le nuove specie sono state trovate soprattutto nelle acque superficiali dell'emisfero nord e nei mari artici, conseguenza diretta dello scioglimento dei ghiacci attorno al polo nord<sup>45</sup>.

Per batteri e parassiti la situazione è meno chiara ma altrettanto insolita: le temperature in aumento aiutano i patogeni per uomini e animali a diffondersi dove prima non erano mai arrivati. Esempi: malattie trasmesse dalle zanzare e dalle zecche in zone extra-tropicali e "temperate", tularemia in Svezia, TBE in Siberia, dengue in Europa centro-settentrionale.

Altri fattori causali sono le migrazioni e gli spostamenti di animali vettori verso terre e mari dal clima più mite, tanto a nord quanto a sud, per sfuggire al caldo, all'aridità e alla mancanza di cibo.

L'OMS ha diffuso una tabella dei microrganismi che, nei prossimi anni, saranno responsabili di nuove emergenze infettivologiche<sup>46</sup>. VIRUS: Zika, Ebola, Febbri emorragiche di Congo-Crimea, Lassa e Marburg, Nipah, Febbre della Rift-Valley, SARS e MERS, sindrome grave con febbre e trombocitopenia, Chikungunya, virus influenzale ancora sconosciuto e non assemblato. BATTERI: micobatteri, gruppi e ceppi più virulenti e MDR (Pechino, ma non solo); clostridi, salmonelle, *Pseudomonas*, legionelle, *V. colerae*, *Y. pestis* pluriresistenti. PARASSITI: plasmodi vecchi e nuovi adattati ad habitat e climi "temperati" e resistenti ai farmaci convenzionali. ZONOSI, il 75% delle attuali e prossime emergenze infettivologiche. I patogeni trasmessi dagli animali sono anche quelli che risentono maggiormente del clima e delle variazioni dei parametri di umidità, piovosità e concentrazione del particolato atmosferico. I microrganismi, specie virus, vecchi e nuovi, più frequenti e pericolosi sono trasmessi da chiroteri in sud e centro-America e da

primati in Africa e sud-est asiatico: effettuano il "salto di specie" per motivi ecologici, genetici, evolutivi o conseguenti ad abitudini umane. Ma il vettore nemico pubblico numero 1 è e resterà la zanzara, verso cui va intensificata la lotta.

Negli ultimi anni, a livello mondiale, morbilità e mortalità per malattie infettive sono diminuite, ma dal 1980 in poi sono aumentati i focolai epidemici e pandemici (circa 11.000), non solo da un punto di vista quantitativo, ma anche qualitativo; cambiano dunque l'epidemiologia e le modalità di diffusione degli agenti patogeni, che colpiscono perlopiù provocando epidemie locali medio-grandi (batteri) o pandemie globali (virus, parassiti).

Passiamo al secondo problema, le antibioticoresistenze: alcuni dati rendono conto dell'entità del fenomeno<sup>47</sup>. È stata segnalata la diffusione planetaria di superbatteri portatori di geni, come blaNDM-1, connessi alla MDR. Nuove specie batteriche scoperte di recente presentano geni e meccanismi di poliresistenza (superbugs) finora sconosciuti, trasmissibili anche a specie patogene comuni. È stato dimostrato che la trasmissione delle resistenze fra batteri anche di specie diverse, avviene per trasferimento di geni sia verticalmente che orizzontalmente (ad es., da attinobatteri a gram-), ma anche dall'ambiente. Nel mondo, sono ovunque in crescita le resistenze di *E. coli*, salmonelle, *Cl. difficile*, micobatteri tubercolari e non, spesso MDR. L'Italia, con Grecia e Romania, è il paese europeo con la maggior presenza di batteri resistenti negli isolati ospedalieri; *St. aureus* MRSA: prevalenza 30% (20% Francia e Germania, <5% Scandinavia); *Klebsiella* res. Carbapemini: 30%, 5% resto d'Europa.

Alla luce dei recenti cambiamenti dell'epidemiologia e del quadro clinico delle malattie infettive e dei relativi patogeni, dobbiamo probabilmente prendere in considerazione nuove strategie terapeutiche, superando l'approccio solo con chemioterapici e antibiotici convenzionali; è necessario che le biotecnologie, oltre a

individuare molecole differenti e modalità di somministrazione alternative, recuperino idee frettolosamente abbandonate e rivolgano uno sguardo più attento alle interazioni microrganismo-ospite, alle difese immunitarie di quest'ultimo e ai sistemi di elusione dei patogeni, in sintesi ai percorsi fisiopatologici che osserviamo in natura<sup>48</sup>. Proponiamo 4 sviluppi: 1) programmare nuovi antibiotici diretti non contro specifiche molecole o funzioni dei batteri, ma interrompendo la loro "comunicazione" (un esempio: l'azitromicina) e la trasmissione di dati genetici, come le resistenze ai farmaci. 2) Riprodurre e simulare mutazioni che rendono più efficiente la risposta immune di alcuni soggetti: mutazioni di HLA nei "controllori d'élite" (1/300) nell'HIV, che potenziano l'azione dei Cd8+ contro le cellule infettate, o del corecettore CCR5 che impedisce al virus di entrare nei Cd4+; mutazione del gene ISG15 (1/1.000.000) che limita la replicazione di virus influenzali, erpetici e Zika mediante una robusta risposta infiammatoria. 3) Riprendere un'idea di cento anni fa: usare fagi contro i batteri. Sono stati sperimentati fagi produttori di molecole a base di lisina contro *S. aureus* MRSA. 4) Conoscere i meccanismi molecolari e genici con cui i microrganismi eludono le difese immunitarie dell'ospite: potranno diventare altrettanti bersagli di nuovi farmaci (virstatina), andando oltre il concetto attuale di "antibiotico".

### **Medicina di Precisione, Biotecnologie e Tumori**

Gli Oncologi non considerano più ciascun tipo di cancro come una malattia omogenea: ogni caso è un'entità a sé stante; il sequenziamento e la miglior conoscenza del genoma delle cellule neoplastiche non fa che confermare questa considerazione, fondamentale per le future terapie. Gli alberi evolutivi e la mappatura delle mutazioni genetiche ricostruiscono lo sviluppo dei tumori e la parentela tra cellule tumorali anche di tessuti diversi. Le mutazioni precoci di alcuni geni driver sarebbero responsabili della formazione sia del tumore primario che delle metastasi<sup>49</sup>: le terapie oncologiche

mirate contro questi geni rispondono ai canoni di una "Medicina di Precisione" e rappresentano una strategia soprattutto nelle forme resistenti ai trattamenti chemioterapici convenzionali. Geni-driver entrati in una prospettiva terapeutica sono: KRAS (pancreas), P-53 (molti tumori solidi), EGFR (polmone), HER2 (mammella), FGFR+TACC (glioblastoma), BRAF (melanoma).

Gli approcci terapeutici innovativi in oncologia, nell'ottica di una personalizzazione delle cure e dei risultati ottenuti dalla genomica, sono numerosi, soprattutto cominciamo ad avere buoni riscontri dall'immunoterapia. Nel 2010 FDA approvò il primo vaccino terapeutico, nel carcinoma prostatico avanzato; altri ne sono seguiti nell'ultimo decennio, per tumori di rene, polmone, pancreas e melanoma. Si basano su:

- cellule dendritiche prelevate dal paziente, immunizzate contro antigeni tumorali, amplificate e reinfuse (esperienza di R.M. Steinman su se stesso, nel carcinoma del pancreas)<sup>50</sup>;
- antigeni sintetici tumorali, somministrati al paziente per stimolare il sistema immune contro gli omologhi delle cellule neoplastiche;
- cellule tumorali prelevate dal paziente, irradiate e trattate in modo da aumentare la carica antigenica, reinfuse e stimolanti l'immunità;
- anticorpi anti-PD1 e CTLA-4 (ipilimumab), inibitori dei checkpoint: contrastano molecole che frenano la risposta immune anti-tumorale.

Altre proposte terapeutiche innovative sono: impiego di miRNA coniugati con nanoparticelle, in grado di inibire e bloccare la sintesi di proteine dannose all'organismo da parte di geni delle cellule neoplastiche; radioterapia intraoperatoria con acceleratori di elettroni; virus ingegnerizzati "anti-cancro", per stimolare il sistema immune contro il tumore, o resi capaci di infettare e lisare le cellule neoplastiche.

Concludiamo questa breve rassegna con due successi della ricerca italiana. Il primo riguarda le ormai famose cellule CAR-T<sup>51</sup>, nuova frontiera dell'immunoterapia di alcune forme di leucemie e linfomi, che vede in prima linea il gruppo di L. Naldini di Telethon e premiato da "Nature" nel 2011 come "Metodo dell'anno". Il recettore naturale dei linfociti T, TCR, viene "editato" e sostituito, tramite un vettore virale, da uno costruito su misura per ogni paziente in modo da riconoscere antigeni specifici di superficie delle cellule tumorali (ad es.: Cd19+) e distruggerle. TCR ingegnerizzato è detto "Chimeric Antigen Receptor". La nuova tecnica prevede il prelievo delle T cells, l'editing del recettore mediante ZFN, l'amplificazione delle cellule modificate e l'infusione nel paziente. Diverse forme di leucemie e linfomi sono state trattate con successo.

La seconda ricerca è del gruppo "*Metis Precision Medicine*", coordinato da P. Comoglio dell'Università di Torino<sup>52</sup>; obiettivo dello studio è l'oncogene MET, le cui mutazioni sono correlate con lo sviluppo di molte forme di tumore (2-3%, 300.000 casi di nuove forme / l'anno al mondo), specie il cancro gastrico. MET nelle cellule staminali stimola la proliferazione; promuove la riparazione tessutale; nelle cellule neoplastiche forme mutate contribuiscono alla crescita cellulare, all'angiogenesi e alla diffusione metastatica. Gli Autori hanno sviluppato un farmaco di precisione basato su un anticorpo monoclonale umanizzato (hOA-DN30) che neutralizza MET e blocca la crescita di alcuni tumori e la diffusione delle metastasi.

### ***Medicina di Precisione, Biotecnologie e Patologie Neuro-Cognitive***

Segnaliamo innanzitutto una serie di progetti internazionali, alcuni ritenuti "off-limits" e quindi non sappiamo quanto pienamente realizzabili, che si avvalgono delle nuove biotecnologie, dei "big data" e di modelli computazionali d'indagine per

mappare aspetti fondamentali della fisiologia cerebrale e sviluppare ulteriori strumenti di analisi. Ne citiamo i principali<sup>53</sup>.

- "Human Brain Project": si propone di riprodurre e simulare al computer il funzionamento del cervello umano (o almeno di alcune aree specifiche), per studiare funzioni e patologie ad un livello crescente di complessità: molecolare, cellulare, circuitale, regionale, cerebrale in toto; fondi stanziati: 1.6 miliardi € / 10 anni.
- "BRAIN (Brain Research through Advancing Innovative Neurotechnology) Project": si propone la costruzione di nuovi strumenti di indagine, per registrare segnali e connessioni fra neuroni e singole aree e nuove tecnologie di cura delle patologie cerebrali. Fondi: 300 milioni \$, per iniziare.
- "Human Connectome Project": l'obiettivo è di ottenere una banca-dati di riferimento dei circuiti neuronali umani, combinando imaging, genetica e profili comportamentali.
- Altri progetti: SyNAPSE, Non-Human Primate and Human Brain Atlas, BigBrain, EyeWire.
- Nuove tecnologie da implementare: fRMN, optogenetica e optochimica, "voltage imaging".

Numerosi, negli ultimi anni, i progressi della ricerca riguardo l'eziopatogenesi, l'assetto genetico, i percorsi diagnostici e le ricadute terapeutiche nelle più diffuse patologie neurologiche e della sfera cognitiva; ne diamo una breve sintesi, anche in prospettiva di applicare le nuove conoscenze nella Medicina di Precisione nell'immediato futuro.

**Spettro autistico.** Così definito per l'eterogeneità delle forme e inquadrato quale disturbo dello sviluppo del cervello causato da una combinazione di fattori genetici e ambientali.

Sono più numerosi i geni comuni implicati in altre e diverse patologie neuropsichiche e del comportamento che quelli specifici di ogni singola forma nosografica: così sono stati individuati ben 45 geni comuni ad autismo, ADHD, dislessia e schizofrenia, che codificano per proteine indispensabili nella crescita dei neuroni e nella comunicazione inter-neuronale. Tuttavia, più gruppi di geni sembrano predisporre o correlare con i disturbi propri dell'autismo: per ognuno sono state trovate CNV o SNP's. Sono geni (circa 800) coinvolti nell'adesione tra neuroni (NLGN1, ASTN2), nella formazione di sinapsi (SHANK2, SYNGAP1, DLGAP2, DDX53-PTCHD1) e nella sintesi dell'ubiquitina (UBE3A, PARK2, RFW2, FBO40). In molti casi intere sequenze codificanti e non sono soppresse o duplicate<sup>54</sup>.

Auspicabile è l'ottimizzazione delle tecniche di neuroimaging: una diagnosi precoce (pre/neonatale) in bambini con alta indicazione genetica all'autismo non è un'utopia, da quando sono stati messi in evidenza difetti nell'organizzazione e nella comunicazione tra neuroni e nell'architettura corticale pre-frontale e temporale già nel feto, a seguito di disordini dovuti a più cause, in parte, ma non solo, genetiche. Terapie correlate con i difetti genetici sono invece ancora futuribili, ancor più sperare a breve di personalizzare le cure solo su una base genetica e biologica, tant'è che a oggi caposaldi nel trattamento rimangono gli approcci comportamentali e psicologici.

**Morbo di Alzheimer.** In questa e in altre malattie neurodegenerative è stato scoperto un evento in comune: meccanismi imperfetti di riparazione di alterazioni verificatesi durante la duplicazione del DNA, specie, ma non solo, nei neuroni. Sono implicate mutazioni di 2 geni, XRCC1 e PARP, che codificano per enzimi che normalmente tagliano sequenze di DNA mal codificate. In studi di popolazione, è stata rilevata un'alta incidenza di Alzheimer nei colombiani (PSEN1-E280A o Paisa mutation+, variante

predisponente gene APOE2/4+omozigote), bassa negli islandesi (gene "protettivo": variante gene APP che inibisce la generazione dei peptidi  $\beta$ -amiloide).

Gli accumuli di  $\beta$ -amiloide e le conseguenti alterazioni cerebrali iniziano anni prima la comparsa dei sintomi; ci chiediamo se e come sia possibile rilevarli per tempo, per una diagnosi precoce: spesso le terapie falliscono perché utilizzate troppo tardi. Sono in sperimentazione farmaci (crenezumab) e vaccini anti-amiloide e anti-tau in soggetti geneticamente predisposti (variante APOE4+ omozigote). È stato proposto un pannello di biomarcatori e imaging sia per individuare pazienti a rischio che per monitorarli, a malattia conclamata, in corso di terapia. I test messi a punto sono diversi. PIB-PET: un tracciante radioattivo, PIB, si lega all'amiloide nel cervello e può essere individuato molto precocemente mediante PET. RMN volumetrica: valuta un precoce e iniziale restringimento del cervello, per la morte dei neuroni, e va associata ad un *cognitive impairment* anch'esso precoce. LIQUOR: segni sfavorevoli di progressione della malattia sono un aumento delle proteine TAU, supporto dei neuroni e formanti maxiaggregati intra ed extra-cellulari nell'Alzheimer, una riduzione di  $\beta$ -amiloide, per accumulo nel cervello ed un aumento di TREM2, proteina associata alla microglia e indice di infiammazione locale<sup>55</sup>.

#### **SLA e altre malattie neurodegenerative.**

Per SLA, morbo di Alzheimer, malattia di Parkinson e Corea di Huntington sono in corso di elaborazione altrettanti atlanti genetici, mediante un nuovo approccio di sequenziamento + software, denominato "Trascrittomica spaziale". Sono stati esaminati nei neuroni del midollo spinale 12.000 geni in persone decedute e in topi (modello murino di SLA), a confronto, quindi tracciata una mappa delle alterazioni genetiche, da quelle precocissime non rilevabili con altre metodiche, a quelle successive, fino alle fasi finali. La SLA può essere divisa, in base alle anomalie

genetiche, in 4 fasi progressive. Perlopiù le mutazioni genetiche all'esordio e nelle fasi tardive sono diverse, così come diversi i gradi di espressione genica nelle cellule midollari. Una mutazione frequente è a carico del gene C9ORF72, nei malati e familiari di SLA, associata a meccanismi di danno dei motoneuroni<sup>56</sup>.

Mutazioni genetiche, coinvolte nella degenerazione delle cellule e nella disfunzione dei circuiti nervosi, sono state dimostrate anche nella depressione maggiore e nella schizofrenia: rimangono comunque condizioni poligeniche e polifattoriali, non vi è mai un solo gene cui imputare tutta l'eziopatogenesi. Le conoscenze potranno tradursi nella costituzione di mappe e nel delineare fenotipi di malattia, personalizzando il più possibile i trattamenti terapeutici (ad es., silenziando il gene C9ORF72 o distruggendo mRNA o le proteine codificate con oligonucleotidi antisenso).

### ***Medicina di Precisione e Biotecnologie. Miscellanea***

**Diabete tipo I.** Diverse sono le opzioni terapeutiche innovative e alternative. 1) Impedire la distruzione delle cellule  $\beta$  con diversi meccanismi immunologici: inibizione di APC; somministrazione di IL10 o anticorpi che bloccano i Cd4+; incremento dei T-regolatori che inibiscono i Cd8+ citotossici. 2) Trapianto di cellule  $\beta$  ottenute da staminali pancreatiche o staminali embrionali pluripotenti o IPS<sup>57</sup>. 3) Vaccino-profilassi e terapia: se confermata l'ipotesi di un'origine virale (polio, enterovirus) per alcune forme, si potrebbe allestire un vaccino preventivo o curativo.

**Diabete tipo II.** Numerosi sono i geni "di suscettibilità" (CMAH, GIP, HMGA1), le cui varianti possono predisporre al diabete: nessuno è tuttavia determinante o patognomonico, per cui a oggi valutare il rischio di ammalarsi, personalizzare diagnosi e terapie o prevedere il decorso della malattia, solo sulle indicazioni della genetica, appare prematuro. Le mutazioni genetiche

sono concause insieme a numerosi altri fattori, noti e/o sconosciuti.

**Ischemia del miocardio.** Anche il tessuto miocardico infartuato e danneggiato entra nell'orbita di una possibile Medicina riparativa e rigenerativa. La Timosina-- $\beta$ -4 può attivare le cellule progenitrici cardiache a differenziarsi in miocardiociti che sostituiscono morfo-funzionalmente il tessuto necrotizzato; la molecola ha funzione angiogenetica e miocardiotropica positiva. Una ricerca tutta italiana, condotta da M. Giacca e A. Eulalio, di Pavia<sup>58</sup>, ha dimostrato che alcuni miRNA (590, 199.a), introdotti in miocardiociti sani in aree peri-infartuate nell'adulto, li stimolano a riprodursi occupando e riparando il tessuto lesa. Infine, nuovi miocardiociti potrebbero essere ottenuti anche da cellule staminali embrionali o IPS, o mediante terapia genica con il trasferimento alle cellule cardiache di molecole e attivatori genici della proliferazione cellulare: si tratta per ora solo di ipotesi di lavoro.

### ***La frontiera estrema delle Biotecnologie nella Medicina Riparativa: "Organi di ricambio" coltivati in vitro o sintetici***

Fattori di crescita, nuovi terreni di coltura arricchiti, cellule staminali, capacità di intervenire e modificare i geni, supporti informatici e bio-elettronici: l'armamentario che le nuove tecnologie offrono per ottenere nuovi organi in laboratorio, persino in parte o totalmente sintetici, è talmente ricco e vario e continuamente in aggiornamento, che darne anche solo una sintesi diventa arduo. La Medicina riparativa e rigenerativa se ne sta avvantaggiando oltre ogni limite. Vediamo pertanto qualche risultato raggiunto<sup>41,43</sup>.

#### **Organi e tessuti da cellule coltivate in vitro.**

- **Cellule ematiche:** da IPS o direttamente da fibroblasti, interagendo con i geni OCT, capaci di esprimere Cd45+, marcatore di superficie dei blasti

progenitori delle diverse linee maturative.

- Polmone artificiale: cellule prelevate da polmoni sani sono coltivate in vitro e fungono da impalcatura sulla quale far crescere le nuove cellule, rispettando tutti i citotipi e l'architettura polmonare. Le strutture cresciute, trapiantate in ratti, svolgono correttamente gli scambi gassosi.
- Retina embrionale: cellule staminali embrionali in coltura, con terreno SFEBQq, contenente GF neurogeni embrionali, si ripiegano e adottano i giusti movimenti per formare il calice ottico, precursore della retina, ove vanno poi a differenziarsi e posizionarsi i diversi tipi cellulari.
- Abbozzi tiroidei funzionanti: sono stati ottenuti da cellule staminali embrionali in coltura, aggiungendo due TF: NKX2-1 e PAX8 e tireotropina.
- B-cells da staminali pancreatiche o embrionali o IPS, per trapianto in pazienti con diabete tipo I.
- Parete intestinale interna, comprensiva dei villi, da staminali umane, fatta crescere su un chip, quale supporto elettronico-guida.
- Mini cervelli o singole aree cerebrali, dette "organoidi", utilizzabili per la ricerca, soprattutto nel campo delle malattie neurodegenerative.

Definiamo organoidi<sup>59</sup> (termine inizialmente riferito solo a mini-cervelli cresciuti in vitro, poi esteso a ogni altro organo siffatto e, per analogia, alle forme neoplastiche, i tumoroidi) "strutture tridimensionali simili ad un organo, coltivate in vitro da staminali o altri precursori; devono contenere più tipi di cellule di un organo, con organizzazione 3D simile all'originale e capaci di alcune delle sue funzioni specifiche". Sono già stati assemblati rene, intestino, retina, fegato e cervello: quest'ultimo, complesso e poco conosciuto, richiederà ancora a lungo un'enorme quantità di ricerca.

Un prototipo di organoide cerebrale (pochi mm) è costituito da un'impalcatura di fili di seta e proteine della matrice, popolate di neuroni corticali da IPS, il tutto strutturato in compartimenti ove le cellule sono indotte a organizzarsi in circuiti simili a quelli cerebrali naturali, con separazione fra sostanza grigia e bianca e disposizione a sei strati cellulari, tipica della corteccia umana. Organoidi hanno già preso contatto spontaneamente con un midollo spinale preformato! La speranza è che gli "organoidi o mini-cervelli" costruiti in vitro ci aiutino a studiare e trattare malattie come quelle neurodegenerative, che aumenteranno parallelamente all'incremento dell'età delle popolazioni. Ma la bioetica si interroga: se si sviluppassero al punto di elaborare una mente, una coscienza, sensazioni, emozioni, o...? Le probabilità ora sono pari a 0, ma domani? È solo fantascienza o un timore giustificato?

**La biologia sintetica: dalle cellule a...**La "creazione" di vita sintetica ha trovato, per ora, il suo approdo più alto nei lavori di C. Venter: 2010, un micoplasma, Synthia, formato da un genoma totalmente artificiale, ottenuto assemblando geni di altri micoplasmi, impiantato in una cellula naturale anucleata: è stato chiamato *M. micoides Jcv1-syn 1.0*; una versione modificata di Synthia, 3.0, prodotta nel 2016, funziona con soli 473 geni: la cosiddetta "cellula minima", in grado di dividersi e moltiplicarsi<sup>60</sup>.

In campo bio-medico segnaliamo alcune "creazioni" totalmente sintetiche: eritrociti di idrogel, con forma, dimensioni e flessibilità, in vivo, di quelli naturali; allo studio le capacità di trasporto di gas e molecole. Piastrine: microparticelle costituite da speciali pellicole. Retina artificiale: chip con fotosensori impiantato nella macula, o composta da fotorecettori organici in cui l'impulso luminoso diventa stimolo nervoso

(proprietà opto-elettroniche). Batteri sintetici: micoplasmi, salmonelle, *E. coli* (G. Church, F. Romesberg), resi apatogeni, in grado di produrre e liberare farmaci (antibiotici, antitumorali) in sede di lesione, o di agire come biosensori ecologici, o come mezzi diagnostici su base genetica o immunitaria.

### **Conclusioni**

Lo “Human Genome Project” non ha ancora dato i miracoli medici promessi venti anni fa: che cosa non ha funzionato? Troppe aspettative? Elabora una gran mole di dati per una Medicina di Precisione, che sappiamo interpretare e utilizzare ancora solo in parte. Sebbene molte scoperte abbiano rivoluzionato la ricerca biomedica, le applicazioni in clinica sono state inferiori alle aspettative iniziali. Ma la Medicina di oggi e del futuro non è solo questo, né può essere legata esclusivamente al dato genetico individuale! Abbiamo visto come le biotecnologie apportano una vera rivoluzione (nonostante il pericolo di ipertecnicismo e di disumanizzare professione e approccio al paziente-uomo), e quelle di ultima generazione per lo studio del genoma possono risolvere controversie e far progredire la ricerca sulle basi genetiche e bio-molecolari delle malattie. L’ipotesi della “variante comune” è messa in discussione: la definizione di gene significativo dal punto di vista medico deve fare i conti con molteplici livelli di complessità.

Persistono forti disuguaglianze nei Sistemi Sanitari, la disparità fra i diversi paesi è abissale, prevenzione e cura delle malattie più diffuse sono insufficienti anche in alcune nazioni ad alto reddito. Le maggiori criticità riguardano sempre Asia e Africa, grandi paesi come Cina, Turchia ed Etiopia hanno fatto progressi notevoli, che si registrano soprattutto nella prevenzione delle malattie infettive dell’infanzia mediante i vaccini. Ma nel 2020, nel mondo, persistono disuguaglianze sociali

nell’impiego dei vaccini! Persino nazioni progredite quali USA e Australia risentono di strutture socio-sanitarie particolari e diversificate che penalizzano le classi sociali più deboli e fragili, evidenziando situazioni non ottimali e forti sperequazioni nella gestione delle malattie cardiovascolari, neoplastiche e infettive.

Stante queste disuguaglianze, pensare di rendere fruibile la Medicina di Precisione su scala globale e in tutte le classi sociali rimane, a breve, un’utopia.

In conclusione, lo “stato dell’arte” della Medicina di Precisione può essere sintetizzato in alcuni punti essenziali, positivi o meno.

Benefici: possibilità per i clinici di utilizzare dati genetici (e/o molecolari) individuali nella pratica medica di routine e nella gestione terapeutica del paziente; possibilità di prevenire e diagnosticare un numero sempre più ampio di malattie, sia congenite che acquisite; rendere patologie critiche, come i tumori, trattabili individualmente e maggiormente gestibili per i pazienti; maggiore comprensione dei meccanismi genetici, molecolari e ultrastrutturali alla base di svariate malattie; condivisione dei dati tra professionisti, per la creazione di percorsi diagnostici e terapeutici largamente condivisi; possibilità da parte dei pazienti di contribuire ai progressi della ricerca scientifica.

Limiti: necessità di comprendere appieno le basi teoriche e applicative delle tecnologie molecolari impiegate, anche da parte dei clinici; definizione e standardizzazione dei processi di acquisizione e gestione dei dati individuali e protezione degli stessi; interpretazione dei dati; notevole implementazione dei costi, in diversi casi al limite della sostenibilità, per le tecnologie utilizzate e per le terapie personalizzate; limiti di natura etica e legale e assenza di legislatura e normative universalmente accettate e condivise.

**Tab. 1: 50 anni di invenzioni, scoperte e applicazioni innovative nelle scienze biomediche**

PERIODO	INVENZIONI, SCOPERTE e NUOVE APPLICAZIONI
Anni '60 e '70 del XX secolo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TRAPIANTI: midollo osseo, cuore, fegato</li> <li>• Struttura degli ANTICORPI e sintesi degli ANTICORPI MONOCLONALI</li> <li>• Ruolo e proprietà dell'IMMUNITA' CELLULO-MEDIATA</li> <li>• FECONDAZIONE in vitro di ovociti umani.</li> <li>• Nascita della prima bambina "in provetta"</li> <li>• Struttura e replicazione dei RETROVIRUS</li> <li>• DNA ricombinante. Batteri modificati producono INSULINA</li> <li>• Prime applicazioni della TAC e della RMN, primo scanner sperimentale per la PET</li> <li>• Prime tecniche di SEQUenziAMENTO e primo sequenziamento di un genoma: VIRUS MS2</li> <li>• Scoperti i PROTO-ONCOGENI</li> <li>• Differenziazione nel DNA fra sequenze CODIFICANTI e non-CODIFICANTI</li> </ul>
Anni '80 del XX secolo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eradicazione completa del VAIOLO e quasi completa della POLIOMIELITE; vaccino anti-EPATITE B</li> <li>• TRAPIANTI: cuore-polmone</li> <li>• Coltivate CELLULE STAMINALI di topo</li> <li>• Identificati nuovi patogeni: PRIONI, <i>H. pylori</i>, HIV-1, HCV</li> <li>• PCR e altre tecniche di amplificazione del materiale genetico</li> <li>• Svelati i meccanismi dell'APOPTOSI</li> <li>• Primi passi dell'EPIGENETICA</li> <li>• Creazione dei primi topi KNOCK-OUT</li> <li>• Scoperta la mutazione genetica alla base della FIBROSI CISTICA</li> </ul>
Anni '90 del XX secolo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fRMN per studiare il cervello</li> <li>• Scoperti i NEURONI SPECCHIO nella corteccia premotoria</li> <li>• Primo bambino concepito con tecnica di FECONDAZIONE in vitro ICSI</li> <li>• Identificati i geni coinvolti nella COREA di HUNTINGTON e il gene BRCA1 nel CARCINOMA della MAMMELLA</li> <li>• Immunità innata: scoperti i RECETTORI TLR</li> <li>• Nasce il primo mammifero CLONATO, la pecora Dolly</li> <li>• Primo SEQUenziAMENTO del genoma di un eucariote: <i>S. cerevisiae</i> e di un CROMOSOMA UMANO (22) completo</li> <li>• Prima operazione sul cuore assistita con la ROBOTICA</li> <li>• Dimostrati alcuni casi di NEUROGENESI nell'adulto</li> </ul>
Prima decade del XXI secolo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Completato il primo SEQUenziAMENTO di un GENOMA UMANO</li> <li>• TRAPIANTI: parziale di faccia</li> <li>• Prime sperimentazioni dell'OPTOGENETICA</li> <li>• Mediante CELLULE STAMINALI, è creato un organo (organoide) in vitro: un mini-FEGATO</li> <li>• CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE da cellule umane adulte</li> <li>• VENTER sintetizza un intero CROMOSOMA batterico</li> </ul>

## Anni '10 del XXI secolo

VENTER crea in laboratorio SYNTHIA 3.0, un MICOPLASMA interamente sintetico

- EDITING del GENOMA: la rivoluzione di CRISPR/Cas9\*
- Una stampante 3D riproduce un organo umano (FEGATO) ricreato da CELLULE STAMINALI
- Progressi delle TERAPIE GENICHE, applicate con successo in diverse PATOLOGIE CONGENITE
- Cambia il panorama delle MALATTIE INFETTIVE nel mondo: Zika, Ebola, Chikungunya, nuovi virus influenzali. 1° imputato: IL CAMBIAMENTO CLIMATICO
- Curiamo infezioni letali come l'AIDS e guariamo l'EPATITE C, ma non siamo in grado ancora di arginare l'aumento delle ANTIBIOTICORESISTENZE

\*CRISPR/Cas9 si rivela in grado di correggere mutazioni genetiche patogene in EMBRIONI UMANI VITALI. Ora e ancor più in futuro s'infiama il DIBATTITO ETICO

**Tab. 2: Sequenziamento del genoma umano: come sono cambiati in trent'anni tempi e costi di esecuzione**

**COSTI**

2000: 2.7 miliardi \$ 1° sequenziamento

2003: 300 milioni \$

2007: 1 milione \$

2008: 60.000 \$

2009: 40.000 \$

2010: 15.000 \$

2015: 5000 \$

2019: 1000 \$

2025: 500 \$

**TEMPI**

2000-2010: da settimane a molti giorni

2010-2015: alcuni giorni

2015-2019: 1/3 giorni

A breve: più genomi < 24 h



**Tab. 3: Tessuti e cellule da staminali: la nuova frontiera della Medicina sostitutiva e riparativa. Prime applicazioni**

<b>CELLULE di PARTENZA</b>	<b>MODALITÀ e NOTE TECNICHE</b>	<b>CELLULE OTTENUTE</b>
Fibroblasti	Induzione attiva di OCT4	Cellule del sangue Cd45+
Cellule della pelle	Mediante fatt. trascr. "BAMN"	Neuroni
Cellule staminali embrionali	Aggiungendo 2 TF: NKX2-1 e PAX8 e TSH	Tireociti
Cellule staminali embrionali	+ SFEBq, terreno di coltura con sostanze di crescita proteiche neurogene embrionali	Retina
Cellule staminali corneali adulte	Brevetto Università Modena/R.Em.	Cornea
Cellule staminali epidermiche adulte	Brevetto Università Modena/R.Em.	Epidermide
Cellule staminali mesenchimali adulte	Brevetto "Bambino Gesù", Roma	Condrociti, osteociti, adipociti, cellule del sangue
Fibroblasti, cellule della pelle	Agendo su geni OCT +LIN28	IPS
IPS	Agendo su geni OCT e altri specifici	Retina
IPS o staminali dall'epitelio dell'amnios della placenta	Aggiungendo staminali mesenchimali e cellule endoteliali primarie	Colonie di epatociti e mini-fegati (organoidi)

## BIBLIOGRAFIA

1. Filostrato. Vita di Apollonio di Tiana. Milano: Adelphi, 1978.
2. Pievani T. Come saremo. Torino: Codice, 2016.
3. Cosmacini G. L'arte lunga. Storia della medicina dall'antichità ad oggi. Bari: Laterza, 2011.
4. Brunham LR, Hayden MR. Medicine. Whole-genome sequencing: the new standard of care? *Science* 2012; 336: 112-3.
5. Cavalli-Sforza LL, Pievani T. Homo sapiens. La grande storia della diversità umana. Torino: Codice, 2011.
6. Boncinelli E. Idee per diventare genetista. Geni, genomi ed evoluzione. Bologna: Zanichelli, 2006.
7. Cugini P. Cronobiologia. Principi, metodi, applicazioni. Roma: Società Editrice Universo, 2012.
8. Church G, Zoltick ES, Linderman MD et al. Predispositional genome sequencing in healthy adults: design, participant characteristics, and early outcomes of the PeopleSeq Consortium. *Genome Med* 2019; 1: 1-11.
9. Obama B. United States health care reform: progress to date and next steps. *JAMA* 2016; 316: 525-32.
10. Hulsen T, Jamuar SS, Moody AR et al. From big data to precision medicine. *Front Med* 2019; 6: 34.
11. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; 385: 117-71.
12. [www.saluteglobale.it](http://www.saluteglobale.it).
13. [www.pikaia.eu](http://www.pikaia.eu).
14. Kaiser J, Gibbons A. Biology in the bank. *Science* 2019; 363: 18-20.
15. Beck TF, Mullikin JC, Biesecker LG. Systematic evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing variants. *Clin Chem* 2016; 62: 647-54.
16. Stoler JM. Prenatal and postnatal genetic testing: why, how, and when? *Pediatr Ann* 2017; 46: 423-7.
17. Lamoril J, Bogard M. Direct to consumer genetic testing: is it the moment?. *Ann Biol Clin* 2016; 74: 29-54.
18. Doudna J, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346: 1077-84.
19. Torres-Ruiz R, Rodrigues-Perales S. CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling. *Brief Funct Genomics* 2017; 16: 4-12.
20. Belli F. Dal laboratorio alla clinica: le nuove scienze bio-mediche tra etica, creatività e tecnologia. *Atti Acc Lanc* 2018; 62: 147-64.
21. Andersson R, Gebhardt C, Miguel-Escalada I et al. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* 2014; 507: 455-61.
22. Regev A, Teichman SA, Lander ES et al. The Human Cell Atlas. *Elife* 2017; 6: e27041. doi: 10.7554/eLife.27041.
23. Carney SL. Mark Chandler discusses rules-based medicine and multi-analyte profiling. *Drug Discov Today* 2003; 8: 874-5.
24. Gorjikhah F, Davaran S, Salehi R et al. Improving "lab-on-a-chip" techniques using biomedical nanotechnology: a review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2016; 44: 1609-14.
25. Rossi S, Hallett M, Rossini PM et al. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophys* 2009, 120: 2008-39.
26. Tavor I, Parker-Jones O, Mars RB et al. Task-free MRI predicts individual differences in brain activity during task performance. *Science* 2016; 352: 216-20.
27. Gabriellil JDR. Prediction as a humanitarian and pragmatic contribution from human cognitive neuroscience. *Neuron* 2015; 85: 11-26.
28. Moglia A, Mencias A, Schurr MO et al. Wireless capsule endoscopy: from diagnostic devices to multipurpose robotic systems. *Biom Microd* 2006; 9: 235-43.
29. Flannigan DJ, Barwick B, Zewail AH. Biological imaging with 4-D ultrafast electron microscopy. *PNAS* 2010; 107: 9933-7.

30. Casarotto S. Stratification of unresponsive patients by an independently validated index of brain complexity. *Ann Neurol* 2016; 80: 718-29.
31. Di Paola M, Gatti D, Viapiana O et al. Radiofrequency ecographic multispectrometry compared with dual X-ray adsortimetry for osteoporosis diagnosis on lumbar spine and femoral neck. *Osteoporos Int* 2018; doi.org/10.1007/s00198-018-4686-3.
32. Zhang F. Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structure. *Nat Prot* 2010; 5: 439-56.
33. Haufroid V, Hantson P. CYP2D6 genetic polymorphisms and their relevance for poisoning due to amfetamines, opioid analgesics and antidepressants. *Clin Toxicol* 2015; 53: 501-10.
34. Hokey DA, Weiner DB. DNA vaccines for HIV: challenges and opportunities. *Springer Sem Immunopath* 2006; 28: 267-79.
35. Relling MV, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature* 2015; 526: 343-50.
36. Lewis R. The forever fix: gene therapy and the boy who saved it. New York: St. Martin's Press, 2012.
37. Colella P, Auricchio A. Gene therapy of inherited retinopathies: a long and successful road from viral vectors to patients. *Human Gene Therapy* 2012; 8: 796-807.
38. Lapenna S. Semi-synthetic ecdysteroids as gene-switch actuators: synthesis, structure-activities relationships and prospective ADME properties. *Chem Med Chem* 2009; 4: 55-68.
39. Ribeil JA, Hacein-Bey-Alina S, Cavazzana M et al. Gene therapy in a patient with sickle cell disease. *New England J Med* 2017; 376: 848-55.
40. Perez EE. Establishment of HIV-1 resistance in Cd4+ T cells genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotech* 2008; 26: 808-16.
41. Park A. The stem cell hope. How stem cell medicine can change our lives. New York: Hudson Street Press, 2012.
42. Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 678-84.
43. Scudellari M. How the IPS cells changed the world. *Nature* 2016; 534: 310-2.
44. Greely H, Baltimore D, Berg P et al. Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science* 2015; 348: 36-8.
45. Goldstein T. Phocine distemper virus in northern sea otters in the Pacific Ocean, Alaska, USA. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 925-7.
46. Gire SK. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 2014; 345: 1369-72.
47. Xinglin J, Hashim Ellabaan MM, Charusanti P et al. Dissemination of antibiotic resistance genes from antibiotic producers to pathogens. *Nat Comm* 2017; 8: 1-7.
48. Kruse A, Sjodt K, Dobihal G et al. Structure of the peptidoglycan polymerase RodA resolved by evolutionary coupling analysis. *Nature* 2018; 556: 118-21.
49. Zhao ZM. Early and multiple origins of metastatic lineages within primary tumors. *PNAS* 2016; 113: 2140-5.
50. Steinman RM, Bauer C. Dendritic cell-based vaccination of patients with advanced pancreatic carcinoma: results of a pilot study. *Cancer Imm Immunoth* 2011; 60: 1097-107.
51. Naldini L, Provasi E, Genovese P et al. Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat Med* 2012; 18: 807-15.
52. Comoglio PM, Trusolino L, Boccaccio C. Known and novel roles of the MET oncogene in cancer: a coherent approach to targeted therapy. *Nat Rev Cancer* 2018; 18: 341-58.
53. Hawrylycz MJ. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* 2012; 489: 391-9.
54. Taerlungeanu DC, Novarino G. Genomics in neurodevelopmental disorders: an avenue to personalized medicine. *Exp Mol Med* 2018; 50: 100. doi: 10.1038/s12276-018-0129-7.
55. Suarez-Calvet M, Araque Caballero MA, Kleinberger G et al. Early changes in CSF sTREM2 in dominantly inherited Alzheimer's disease occur after amyloid deposition and neuronal injury. *Science Transl Med* 2016; 8: 369-78.

56. Lai JD, Ichida JK. C9ORF72 protein function and immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 2019; 713:134523. doi: 10.1016.
57. Soria B. Using stem cells to produce insulin. *Exp Op Biol Ther* 2015; 15: 1459-89.
58. Giacca M, Torrini C, Eulalio A et al. Common regulatory pathways mediate activity of MicroRNAs inducing cardiomyocyte proliferation. *Cell Rep* 2019; 27: 2759-71.
59. Lopez-Tobon A, Villa CE, Cattaneo E et al. Human cortical organoids expose a differential function of GSK3 on cortical neurogenesis. *Stem Cell Reports* 2019; S2213-6711(19)30334-0. doi: 10.1016.
60. Lopez-Tobon A, Villa CE, Cattaneo E et al. Venter JC. *Il disegno della vita*. Milano: Rizzoli, 2014.

Prof. Francesco Belli, Accademico della Accademia Lanciaiana, già Dirigente Medico di Microbiologia e Virologia A.O. San Camillo-Forlanini, Roma; Docente di Immunologia C.d.L. Biotecnologie, "Sapienza" Università di Roma.

Per la corrispondenza: [f.belli11@virgilio.it](mailto:f.belli11@virgilio.it)