

## **PONTIFICIA ACCADEMIA PER LA VITA**

# **DICHIARAZIONE SULLA PRODUZIONE E SULL' USO SCIENTIFICO E TERAPEUTICO DELLE CELLULE STAMINALI EMBRIONALI UMANE**

La finalità di questo documento è di portare un contributo al dibattito che si sta sviluppando e ampliando nella letteratura scientifica ed etica e nell'opinione pubblica sulla produzione e utilizzazione delle *cellule staminali embrionali*. A seguito, infatti, della crescente rilevanza che va assumendo il dibattito sui loro limiti e liceità, si impone, una riflessione che ne ponga in luce le implicazioni etiche.

In una prima parte, saranno esposti molto brevemente i dati più recenti offerti dalla scienza sulle cellule staminali, e dalla biotecnologia sulla loro produzione e uso. In una seconda parte, si richiamerà l'attenzione sopra i più rilevanti problemi etici sollevati da queste nuove scoperte e applicazioni.

### **Aspetti scientifici**

Una *definizione* comunemente accettata di «cellula staminale» - anche se alcuni aspetti richiedono ancora un maggior approfondimento - è quella di una cellula che ha due caratteristiche: 1) la *capacità di auto-rinnovamento illimitato* o prolungato, cioè di riprodursi a lungo senza differenziarsi; e 2) la *capacità di dare origine a cellule progenitrici di transito*, con capacità proliferativa limitata, dalle quali discendono *popolazioni di cellule altamente differenziate* (nervose, muscolari, ematiche, ecc.). Da circa 30 anni queste cellule hanno costituito un ampio campo di ricerca sia in tessuti adulti [i], sia in tessuti embrionali e in colture in vitro di cellule staminali embrionali di animali da esperimento [ii]. Ma l'attenzione pubblica ad esse è stata richiamata recentemente da un nuovo traguardo raggiunto: la produzione di *cellule staminali embrionali umane*.

### **Le cellule staminali embrionali umane**

La *preparazione di cellule staminali embrionali umane* (ES, ESc, Embryo Stem cells) implica oggi [iii]:

- 1) 1) la *produzione di embrioni umani e/o la utilizzazione* di quelli soprannumerari da fecondazione *in vitro* o crioconservati;
- 2) 2) il loro *sviluppo* fino allo stadio di iniziale blastociste;
- 3) 3) il *prelevamento* delle cellule dell'embrioblasto o massa cellulare interna (ICM) - operazione che implica la *distruzione dell'embrione*;
- 4) 4) la *messa in coltura* di tali cellule su un strato di fibroblasti di topo irradiati (feeder) e in adatto terreno, dove si moltiplicano e confluiscono fino alla formazione di colonie dette *embrioidi* (EBs, embryooid bodies);
- 5) ripetute *messe in coltura* delle cellule delle colonie ottenute, che portano alla formazione di *linee cellulari* capaci di moltiplicarsi indefinitamente conservando le caratteristiche di cellule staminali (ES) per mesi e anni.

Queste, tuttavia, costituiscono soltanto il punto di partenza per la preparazione delle *linee cellulari differenziate*, ossia di cellule le quali possiedono le caratteristiche che assumono nei diversi tessuti (muscolari, nervose, epiteliali, ematiche, germinali, ecc). I metodi per ottenerle sono ancora in studio[iv]; ma la inoculazione delle ES umane in animali da esperimento (topo), e la loro coltura *in vitro* in terreno condizionato fino alla confluenza, hanno dimostrato che esse sono capaci di dare origine a cellule differenziate che deriverebbero, nello sviluppo normale, dai tre diversi foglietti embrionali: endoderma (epitelio intestinale), mesoderma (cartilagine, osso, muscolo liscio e striato), ed esoderma (epitelio neurale, epitelio squamoso)[v].

Questi risultati hanno scosso il mondo sia scientifico, sia biotecnologico - in particolare medico e farmacologico - e non meno il mondo commerciale e massmediale: apparivano grandi le speranze che le applicazioni che ne sarebbero seguite avrebbero aperto nuove e più sicure vie

per la terapia di gravi malattie; vie che già da anni si stanno cercando[vi]. Ma soprattutto fu scosso il mondo politico[vii]. Negli Stati Uniti, in particolare, al Congresso, che già da anni si opponeva a sostenere con fondi federali ricerche in cui venissero distrutti embrioni umani, risposero tra l'altro le forti pressioni del NIH (*National Institutes of Health*) per ottenere fondi almeno per utilizzare le cellule staminali prodotte da gruppi privati; e le raccomandazioni da parte del NBAC (*National Bioethics Advisory Committee*), istituito dal Governo Federale per lo studio del problema, affinché siano dati fondi pubblici non soltanto per la ricerca sulle cellule staminali embrionali, ma anche per la loro produzione; anzi si insiste che sia rescisso definitivamente il bando vigente per legge sull'uso di fondi federali per la ricerca su embrioni umani.

Spinte nella stessa direzione si hanno anche in Inghilterra, Giappone, Australia.

### **La clonazione terapeutica**

Era apparso evidente che l'uso terapeutico delle ES, come tali, aveva dei rischi notevoli, essendo – come si era constatato nella sperimentazione sul topo – tumorigeniche. Sarebbe stato, quindi, necessario preparare linee specializzate di *cellule differenziate* a seconda della necessità; e il tempo richiesto per ottenerle non appariva breve. Ma, anche se si fosse riusciti, sarebbe stato ben difficile essere certi dell'assoluta assenza di cellule staminali nell'inoculo o nell'impianto terapeutico, con i correlativi rischi; e, di più, si sarebbe dovuto ricorrere a ulteriori trattamenti per superare l'incompatibilità immuno-nologica. Per queste ragioni furono proposte tre vie di «clonazione terapeutica»[viii], atte a preparare cellule staminali embrionali umane pluripotenti con una ben definita informazione genetica, a cui far seguire poi la differenziazione desiderata.

1. *Trasferimento di un nucleo di una cellula di un dato soggetto in un oocita umano enucleato*, seguito da sviluppo embrionale fino allo stadio di blastociste e dalla utilizzazione delle cellule della massa interna (ICM) della stessa per ottenere le ES e, da queste, le cellule differenziate desiderate.

2. *Trasferimento di un nucleo di una cellula di un dato soggetto in un oocita di altro animale*. Un eventuale successo dovrebbe portare - si suppone - allo sviluppo di un embrione umano, da utilizzare come nel caso precedente.

3. *Riprogrammazione del nucleo di una cellula di un dato soggetto fondendolo con il citoplasma di ES*, ottenendo così gli «cybrids»: possibilità ancora in studio. Ad ogni modo, anche questa via sembrerebbe esigere la previa preparazione di ES da embrioni umani.

Allo stato attuale, la ricerca scientifica sta puntando preferibilmente sulla prima via, ma è ovvio che, dal punto di vista morale, come vedremo, tutte e tre le soluzioni prospettate sono inaccettabili.

### **Le cellule staminali adulte**

Dagli studi delle cellule staminali dell'adulto (ASC - Adult Stem Cells ) nel trascorso trentennio era emerso chiaramente che in molti tessuti adulti sono presenti cellule staminali, ma capaci di dare origine solo a cellule proprie di un dato tessuto. Non si pensava, cioè, alla possibilità di una loro riprogrammazione. Negli anni più recenti[ix], invece, si scoprirono anche in vari tessuti umani *cellule staminali pluripotenti* - nel midollo osseo (HSCs), nel cervello (NSCs), nel mesenchima (MSCs) di vari organi e nel sangue del cordone ombelicale (P/CB, placental/Cord blood) - capaci cioè di dare origine a più tipi di cellule, in maggioranza ematiche, muscolari e nervose. Si è visto come riconoscerle, come selezionarle, come sostenerle nello sviluppo e come condurle a formare diversi tipi di cellule mature mediante fattori di crescita e altre proteine regolatrici. Anzi un notevole cammino è già stato percorso in campo sperimentale, applicando anche i più avanzati metodi di ingegneria genetica e biologia molecolare per l'analisi del programma genetico che opera nelle cellule staminali[x], e per la transduzione di geni desiderati in cellule staminali o progenitrici che, impiantate, sono capaci di restituire le funzioni specifiche a tessuti sofferenti[xi]. Basti accennare, sulla base di alcuni lavori citati in nota, che nell'uomo le cellule staminali del midollo osseo, da cui si formano tutte le diverse linee di cellule ematiche, hanno come marcatore di riconoscimento la molecola CD34; e che, purificate, sono capaci di ricostituire la intera popolazione ematica in pazienti che ricevono dosi ablative di radiazioni e di chemioterapia, e questo con velocità proporzionale alla quantità di cellule usate.

Anzi, si hanno già indizi sul come guidare lo sviluppo di cellule staminali nervose (NSCs) utilizzando diverse proteine - tra cui la neuroregulina e la proteina 2 osteomorfogena (BMP2, Bone Morphogenetic Protein 2) - che sono capaci di indirizzare le NSCs a diventare neuroni o glia (cellule neuronali di sostegno, produttrici di mielina) o anche a muscolo liscio.

La soddisfazione, pur prudente, con cui si concludono molti dei lavori citati, è un indice delle grandi promesse che le "cellule staminali adulte" riservano per una terapia efficace di tante patologie. Così, D. J. Watt e G. E. Jones affermano: "Le cellule staminali muscolari, sia della linea mioblastica embrionale che adulta, possono diventare cellule di maggior importanza per tessuti diversi da quello originario, ed essere la chiave di terapie future persino per malattie diverse da quelle di origine miogena" (p.93); J.A. Nolte e D.B.Kohn sottolineano: "I progressi nell'uso della transduzione genica nelle cellule staminali ematopoietiche ha portato a iniziare sperimentazioni cliniche. Le informazioni che se ne otterranno, guideranno futuri sviluppi. In definitiva, la geneterapia potrà permettere di trattare malattie genetiche e acquisite senza le complicazioni dei trapianti di cellule allogeniche" (p. 460); e D.L.Clarke e J. Frisén confermavano: "Questi studi suggeriscono che le cellule staminali nei differenti tessuti adulti possono essere molto più simili di quanto finora pensato alle cellule embrionali umane, fino ad averne in alcuni casi un repertorio molto simile" e "dimostrano che cellule nervose adulte hanno un'ampia capacità di sviluppo, e sono potenzialmente atte ad essere usate per produrre una varietà di tipi cellulari per trapianto in malattie diverse".

Tutti questi progressi ed i risultati già raggiunti nel campo delle cellule staminali dell'adulto (ASC) lasciano, dunque, intravedere non soltanto la loro grande plasticità, ma anche la loro ampia possibilità di prestazioni, verosimilmente non diversa da quella delle cellule staminali embrionali (ES), dato che la plasticità dipende in gran parte da un controllo genetico, il quale potrebbe essere riprogrammato. Ovviamente, non è ancora possibile porre a confronto i risultati terapeutici ottenuti e ottenibili utilizzando le cellule staminali embrionali e le cellule staminali adulte. Per le seconde sono già in corso, da parte di varie ditte farmaceutiche, delle sperimentazioni cliniche[xii] che lasciano intravedere buoni successi e aprono serie speranze per un futuro più o meno prossimo. Per le prime, anche se vari approcci sperimentali danno segnali positivi[xiii], la loro applicazione in campo clinico - proprio per i gravi problemi etici e legali connessi - richiede una seria riconsiderazione e un grande senso di responsabilità davanti alla dignità di ogni essere umano.

## Problemi etici

Data l'indole del documento, si formulano brevemente i problemi etici essenziali implicati da queste nuove tecnologie, indicandone la risposta che emerge da una attenta e profonda considerazione del soggetto umano dal momento del suo concepimento: considerazione che è alla base della posizione affermata e proposta dal Magistero della Chiesa.

Il **primo problema etico**, fondamentale, può essere formulato così: "È moralmente lecito produrre e /o utilizzare embrioni umani viventi per la preparazione di ES "?

«La risposta è negativa» per le seguenti ragioni.

1. Sulla base di una corretta e completa analisi biologica, l'embrione umano vivente è - a partire dalla fusione dei gameti - un *soggetto umano* con una ben definita identità, il quale incomincia da quel punto il suo proprio *coordinato, continuo e graduale sviluppo*, tale che in nessuno stadio ulteriore può essere considerato come un semplice accumulo di cellule[xiv].

2. Ne segue che: come «*individuo umano*» ha *diritto* alla sua propria vita; e, perciò, ogni intervento che non sia a favore dello stesso embrione, si costituisce come atto lesivo di tale diritto. La teologia morale ha da sempre insegnato che nel caso dello «*jus certum tertii*» il sistema del probabilismo non è applicabile[xv].

3. Pertanto, l'ablazione della massa cellulare interna (ICM) della blastociste, che lede gravemente e irreparabilmente l'embrione umano, troncandone lo sviluppo, è un atto *gravemente immorale e, quindi, gravemente illecito*.

4. *Nessun fine ritenuto buono*, quale l'utilizzazione delle cellule staminali che se ne potrebbero ottenere per la preparazione di altre cellule differenziate in vista di pro-cedimenti terapeutici di grande aspettativa, *può giustificare tale intervento*. Un fine buono non rende buona un'azione in se stessa cattiva.

5. Per un cattolico, tale posizione è confermata dal Magistero esplicito della Chiesa che, nella enciclica *Evangelium Vitae* - riferendosi anche alla Istruzione *Donum Vitae* della Congregazione per la Dottrina della Fede - afferma: " La Chiesa ha sempre insegnato, e tuttora insegna, che al frutto della generazione umana, dal primo momento della sua esistenza, va garantito il rispetto incondizionato che è moralmente dovuto all'essere umano nella sua totalità e unità corporale e spirituale: «l' essere umano va rispettato e trattato come una persona fin dal suo concepimento e, pertanto, da quello stesso momento gli si devono riconoscere i diritti della persona, tra i quali anzitutto il diritto inviolabile di ogni essere umano innocente alla vita»" (n.60)[xvi].

Il **secondo problema etico** può essere formulato così: *È moralmente lecito eseguire la cosiddetta «clonazione terapeutica» attraverso la produzione di embrioni umani e la loro successiva distruzione per la produzione di ES?*

«La risposta è negativa» per la seguente ragione:

Ogni tipo di clonazione terapeutica, che implichi necessariamente la produzione di embrioni umani e la susseguente distruzione degli embrioni prodotti, al fine di ottenerne cellule staminali, è illecita; poiché, si ricade nel problema etico precedentemente esposto, il quale non può avere che una risposta negativa[xvii].

Il **terzo problema etico** può essere formulato così: *È moralmente lecito utilizzare le ES, e le cellule differenziate da quelle ottenute, eventualmente fornite da altri ricercatori o reperibili in commercio?*

«La risposta è negativa» poiché:

al di là della condivisione, formale o meno, dell'intenzione moralmente illecita dell'agente principale, nel caso in esame, c'è una cooperazione materiale prossima da parte del produttore o fornitore.

**In conclusione**, appare evidente la serietà e la gravità del problema etico aperto dalla volontà di estendere al campo umano la produzione e/o l'uso di embrioni umani anche in una prospettiva umanitaria.

Il dato, ormai accertato, della possibilità di utilizzare **cellule staminali adulte** per raggiungere le stesse finalità che si intenderebbe raggiungere con le cellule staminali embrionali - anche se si richiedono molti ulteriori passi prima di vederne chiari e definitivi risultati - indica questa come la via più ragionevole e umana da percorrere per un corretto e valido progresso in questo nuovo campo che si apre alla ricerca e a promettenti applicazioni terapeutiche. Queste rappresentano, senza dubbio, una grande speranza per una notevole parte di persone sofferenti.

*Il Presidente*

Prof. Juan de Dios Vial Correa

*Il Vice Presidente*

S.E.R. Mons. Elio Sgreccia

## **NOTE BIBLIOGRAFICHE**

-

[i]Cfr M. LOEFFLER, C. S POTTEN, *Stem cells and cellular pedigrees - a conceptual introduction*, in C. S. POTTEN (ed), *Stem Cells*, Academic Press, London 1997, pp.1-27; D. Van der KOOY, S. WEISS, *Why Stem Cells?*, *Science* 2000, 287,1439-1441.

[ii]Cfr T: NAKANO, H. KODAMA, T. HONJO, *Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture*, *Science* 1994, 265, 1098-1101; G. KELLER, *In vitro differentiation of embryonic stem cells*, *Current Opinion in Cell Biology* 1995, 7, 862-869; S. ROBERTSON, M. KENNEDY, G. KELLER, *Hematopoietic commitment during embryogenesis*, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999, 872, 9-16;

[iii] Cfr J. A .THOMSON, J. ITS KOVITZ-ELDOR, S. S. SHAPIRO et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*, *Science* 1998, 282, 1145-1147; G. VOGEL, *Harnessing the power of stem cells*, *Science* 1999, 283, 1432-1434.

[iv] Cfr F. M. WATT, B. L. M, HOGAN, *Out of Eden: stem cells and their niches*, Science 2000, 287, 1427-1430.

[v] Cfr J. A. THOMSON, J. ITSKOVITZ-ELDOR, S. S. SHAPIRO et al., cit.

[vi] Cfr. U.S. CONGRESS, OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT, *Neural Grafting: Repairing the Brain and Spinal Cord*, OTA-BA-462, Washington, DC, U. S. Government Printing Office, 1990; A. McLAREN, *Stem cells: golden opportunities with ethical baggage*, Science 2000, 288, 1778.

[vii] Cfr E. MARSHALL, *A versatile cell line raises scientific hopes, legal questions*, Science 1998, 282, 1014-1015; J. GEARHART, *New potential for human embryonic stem cells*, Ibidem, 1061-1062; E. MARSHALL, *Britain urged to expand embryo studies*, Ibidem, 2167-2168; 73 SCIENTISTS, *Science over politics*, Science 1999, 283, 1849-1850; E. MARSHALL, *Ethicists back stem cell research, White House treads cautiously*, Science 1999, 285, 502; H. T. SHAPIRO, *Ethical dilemmas and stem cell research*, Ibidem, 2065; G. VOGEL, *NIH sets rules for funding embryonic stem cell research*, Science 1999, 286, 2050; G. KELLER, H. R. SNODGRASS, *Human embryonic stem cells: the future is now*, Nature Medicine 1999, 5, 151-152; G.J. ANNAS, A. CAPLAN, S. ELIAS, *Stem cell politics, ethics and medical progress*, Ibidem, 1339-1341; G. VOGEL, *Company gets rights to cloned human embryos*, Science 2000, 287, 559; D. NORMILE, *Report would open up research in Japan*, Ibidem, 949; M. S. FRANKEL, *In search of stem cell policy*, Ibidem, 1397; D. PERRY, *Patients voices: the powerful sound in the stem cell debate*, Ibidem, 1423; N. LENOIR, *Europe confronts the embryonic stem cell research challenge*, Ibidem, 1425-1427; F. E. YOUNG, *A time for restraint*, Ibidem, 1424; EDITORIAL, *Stem cells*, Nature Medicine 2000, 6, 231.

[viii] D. DAVOR, J. GEARHART, *Putting stem cells to work*, Science 1999, 283, 1468-1470.

[ix] Cfr C. S. POTTEN (ed), *Stem Cells*, Academic Press, London 1997, pp. 474; D. ORLIC, T. A. BOCK, L. KANZ, *Hemopoietic Stem Cells: Biology and Transplantation*, Ann. N. Y. Acad. Sciences, vol. 872, New York 1999, pp. 405; M. F. PITTENGER, A. M. MACKAY, S.C. BECK et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*, Science 1999, 284, 143-147; C. R. R. BJORNSON, R.L. RIETZE, B. A. REYNOLDS et al, *Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo*, Science 1999, 283, 534-536; V. OUREDNIK, J. OUREDNIK, K. I. PARK, E. Y. SNYDER, *Neural Stem cells – a versatile tool for cell replacement and gene therapy in the central nervous system*, Clinical Genetics 1999, 56, 267-278; I. LEMISCHKA, *Searching for stem cell regulatory molecules: Some general thoughts and possible approaches*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1999, 872, 274-288; H. H. GAGE, *Mammalian neural stem cells*, Science 2000, 287, 1433-1438; D. L. CLARKE, C. B. JOHANSSON, J. FRISEN et al., *Generalized potential of adult neural stem cells*, Science 2000, 288, 1660-1663; G. VOGEL, *Brain cells reveal surprising versatility*, ibidem, 1559-1561.

[x] Cfr R. L. PHILLIPS, R.E.ERNST, I.R.LEMISCHKA, et al., *The genetic program of hematopoietic stem cells*, Science 2000, 288, 1635-1640.

[xi] Cfr D. J. WATT, G.E. JONES, *Skeletal muscle stem cells: function and potential role in therapy*, in C. S. POTTEN, *Stem Cells*, cit., 75-98; J. A. NOLTA, D. B. KOHN, *Haematopoietic stem cells for gene therapy*, Ibidem, 447-460; Y. REISNER, E. BACHAR-LUSTIG, H-W. LI et al., *The role of megadose CD34+ progenitor cells in the treatment of leukemia patients without a matched donor and in tolerance induction for organ transplantation*, Ann. N.Y.Acad. Sci 1999, 872, 336-350; D. W. EMERY, G. STAMATOYANNOPOULOS, *Stem cell gene therapy for the b-chain hemoglobinopathies*, Ibidem, 94-108; M. GRIFFITH, R. OSBORNE, R. MUNGER, *Functional human corneal equivalents constructed from cell lines*, Science 1999, 286, 2169-2172; N. S. ROY, S. WANG, L. JIANG et al., *In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult hippocampus*, Nature Medicine 2000, 6, 271-277; M. NOBLE, *Can neural stem cells be used as therapeutic vehicles in the treatment of brain tumors?*, Ibidem, 369-370; I. L. WEISSMAN, *Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and*

*opportunities*, Science 2000, 287, 1442-1446; P. SERUP, *Panning for pancreatic stem cells*, Nature Genetics 2000, 25, 134-135.

[xii] E. MARSHALL, *The business of Stem Cells*, Science 2000, 287, 1419-1421.

[xiii] Cfr O. BRUSTLE, K. N. JONES, R. D. LEARISH et al., *Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants*, Science 1999, 285, 754-756; J. W. McDONALD, X-Z LIU, Y. QU et al., *Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord*, Nature Medicine 1999, 5, 1410-1412.

[xiv] Cfr A. SERRA, R. COLOMBO, *Identità e statuto dell'embrione umano: il contributo della biologia*, in PONTIFICIA ACADEMIA PRO VITA, *Identità e Statuto dell'Embrione Umano*, Libreria Editrice Vaticana, Città del Vaticano 1998, pp.106-158.

[xv] Cfr I. CARRASCO de PAULA, *Il rispetto dovuto all'embrione umano: prospettiva storico-dottrinale*, in Id., pp. 9-33; R. LUCAS LUCAS, *Statuto antropologico dell'embrione umano*, in Id., pp.159-185; M. COZZOLI, *L'embrione umano: aspetti etico normativi*, in Id., pp.237- 273; L. EUSEBI, *La tutela dell'embrione umano: profili giuridici*, in Id., pp. 274-286.

[xvi] GIOVANNI PAOLO II, *Lettera Enciclica "Evangelium Vitae"* (25 marzo 1995), Acta Apostolicae Sedis 1995, 87,401-522; cfr anche CONGREGAZIONE PER LA DOTTRINA DELLA FEDE, *Istruzione su il rispetto della vita umana nascente e la dignità della procreazione "Donum Vitae"* (22 febbraio 1987), Acta Apostolicae Sedis 1988, 80, 70-102.

[xvii] Cfr CONGREGAZIONE PER LA DOTTRINA DELLA FEDE, cit., I, n.6; C.B.COHEN (ed), *Special Issue: Ethics and the cloning of human embryos*, Kennedy Institute of Ethics Journal 1994, n.4, 187-282; H. T. SHAPIRO, *Ethical and policy issues of human cloning*, Science 1997, 277, 195-196; M.L. DI PIETRO, *Dalla clonazione animale alla clonazione dell'uomo?*, Medicina e Morale 1997, n.6, 1099-2005; A. SERRA, *Verso la clonazione dell'uomo? Una nuova frontiera della scienza*, La Civiltà Cattolica 1998 I, 224-234; Id., *La clonazione umana in prospettiva «sapienziale»*, Ibid., 329-339.