

## A CHI DI INTERESSE

Si autocertifica che il Comitato Etico dell'Università degli studi della Campania (ex Seconda Università) ha approvato in data 2007 il progetto di ricerca in allegato.

Napoli, 4/1/2019

Prof. Umberto Galderisi



# **PROGETTO DI RICERCA**

**Studio della biologia delle cellule staminali**  
**mesenchimali umane**

## **Introduzione**

Le cellule staminali sono presenti in vari distretti dell'organismo umano e in vari tessuti. Esse sono caratterizzate dalla capacità di potersi duplicare indefinitamente e di potersi differenziare in differenti tipi di tessuti, per cui vengono riconosciute come «pluripotenti».

La funzione delle cellule staminali risulta essere quella di sostituire quelle distrutte o perdute nei vari tipi di tessuti lì dove vengono chiamate a riparare. Tale processo di «rigenerazione» si è compiuto da sempre nell'organismo come un'autoriparazione spontanea senza che ciò fosse a conoscenza degli studiosi.

L'aver scoperto questo tipo di risorsa biologica e il suo meccanismo finalistico ha entusiasmato i ricercatori ed ha fatto sperare di poterle utilizzare in caso di lesioni gravi di tessuti dell'organismo, estraendole dall'organismo adulto, moltiplicandole nella quantità richiesta in laboratorio e riponendole nel tessuto o organo lesionato. Numerose sono le malattie che comportano la degenerazione dei tessuti e diverse situazioni sono state oggetto di ricerca sperimentale: l'infarto, le malattie del sangue, le malattie degenerative del sistema nervoso (Parkinson ed Alzheimer) e diverse altre condizioni sembrano potersi giovare di questo tipo di terapia.

### **Le cellule staminali mesenchimali (MSC)**

Gli studi effettuati sulle cellule staminali mesenchimali (MSC) hanno dimostrato l'efficacia in numerosi tipi di strategie terapeutiche cellulari, incluse applicazioni riguardanti bambini affetti da osteogenesi imperfetta, malattie ematopoietiche, malattie cardiovascolari, strategie di rigenerazione del tessuto osseo. Una caratteristica essenziale di queste cellule è che possono essere prelevate dal paziente stesso che deve ricevere il trapianto autologo, evitando così complicazioni associate al rigetto immunologico. Fonte primaria delle cellule staminali mesenchimali è il midollo osseo da cui sono facilmente estraibili. Le MSC sono cellule stromali, non ematopoietiche, multipotenti; sono cellule primordiali di origine mesodermica che danno origine a cellule del muscolo scheletrico, alle cellule del sangue, ai sistemi vascolari, urogenitali e a tessuti connettivi in tutto il corpo.

Sono stati fatti dei progressi considerevoli nell'ambito della caratterizzazione del profilo antigenico cellulare delle staminali mesenchimali, usando tecniche di citofluorimetria a flusso,

tuttavia non è stato ancora identificato un marcatore molecolare specifico delle MSC come lo è il fattore CD34 per le cellule staminali ematopoietiche.

L'abilità delle MSC di differenziare in una varietà di tipi cellulari, le ha rese una risorsa ideale nella strategia clinica riguardante la rigenerazione di diversi tessuti, incluso il riparo e la rigenerazione delle ossa, della cartilagine e dei tendini. Anche se i meccanismi molecolari che governano il differenziamento delle MSC sono compresi solo in parte, basandoci sulle informazioni genetiche e genomiche fornite da vari studi, può essere proposto un modello per la regolazione della differenziazione delle cellule staminali adulte (Fig. 1).

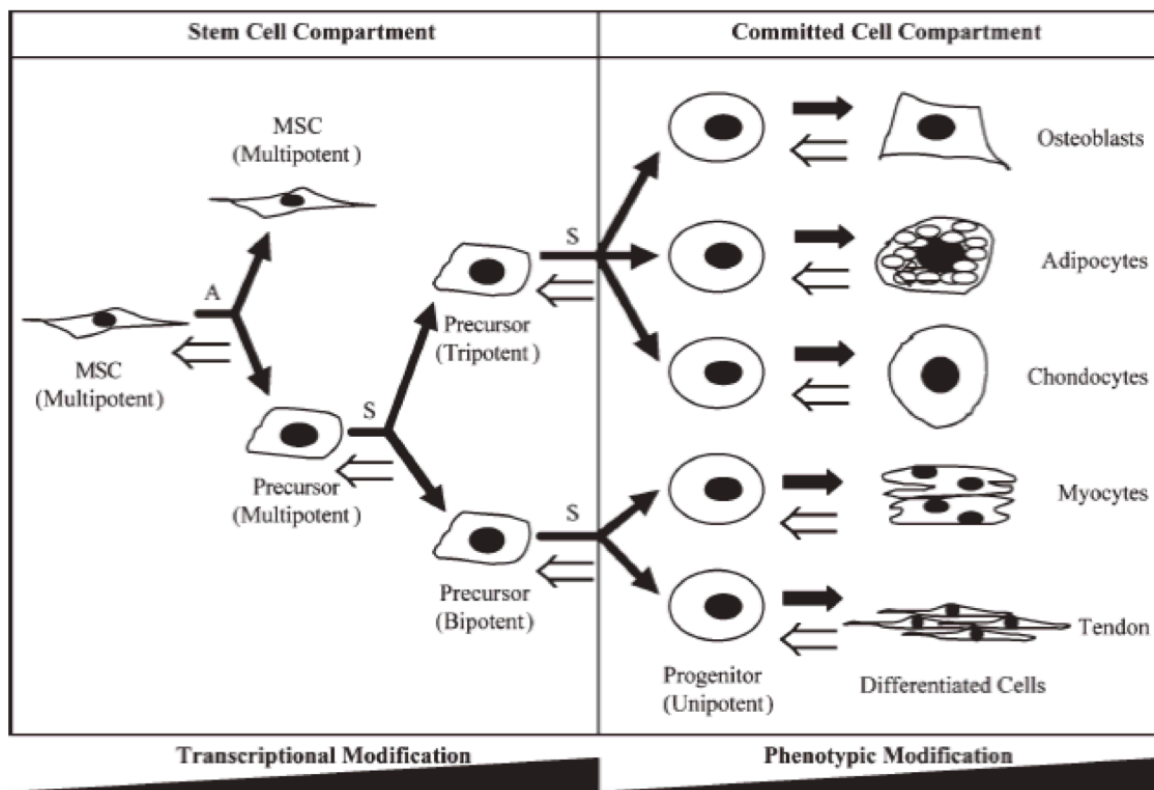


Fig. 1 “Modello schematico di rappresentazione della differenziazione di cellule staminali mesenchimali (MSC)”. Le MSC per acquisire uno specifico fenotipo devono intraprendere due diversi stadi, definiti come “il compartimento delle cellule staminali” e “il compartimento del commissionamento”. Nel compartimento delle cellule staminali, le MSC si dividono asimmetricamente (A), dando origine a due cellule figlie, di cui una cellula identica alla cellula madre e quindi con lo stesso potenziale, ed un'altra cellula precursore con un potenziale di differenziazione più ristretto, attraverso divisione simmetrica (S). Nel compartimento di differenziazione più ristretto, attraverso divisione simmetrica (S). Nel compartimento di

commissionamento, la cellula precursore continua a dividersi simmetricamente, generando cellule precursori bipotenti e tripotenti con destini cellulari predeterminati. Recenti studi hanno mostrato la capacità di cellule completamente commissionate a dedifferenziare in cellule a maggior potenzialità, e di riacquisire differenti fenotipi sotto condizioni induttive.

Questo modello comprende due compartimenti consecutivi ma distinti; nel primo compartimento le MSC subiscono una modifica trascrizionale, generando cellule precursori senza cambiamenti apparenti del fenotipo e della capacità di autorinnovamento. Similmente alle MSC che risiedono nel midollo osseo adulto, la maggioranza delle MSC messe in coltura *in vitro* rimangono quiescenti e la crescita è arrestata in G0/G1 finché non sono stimolate dai fattori di crescita supplementari [88]. Sotto stimolazione le MSC multipotenti subiscono una divisione asimmetrica dando vita a due cellule figlie, di cui una è l'esatta replica della cellula madre e mantiene il potenziale multilinee, l'altra è una cellula precursore con un programma di sviluppo più ristretto. In questo modello la cellula precursore continua a dividersi simmetricamente, generando cellule precursori bipotenti e tripotenti, che sono morfologicamente simili alle MSC multipotenti ma differiscono per il loro repertorio di trascrizione del gene; risiedono quindi ancora nel "compartimento delle cellule staminali". La transizione o l'uscita dal "compartimento delle cellule staminali", che rappresenta il primo compartimento, al "compartimento del commissionamento" che è il secondo compartimento, avviene quando le cellule precursori (bipotenti e tripotenti) continuano a dividersi simmetricamente per generare cellule progenitrici unipotenti con la capacità differenziativa verso una ben definita linea cellulare. Attualmente non è totalmente compreso il meccanismo che governa la transizione delle cellule staminali non commissionate a cellule progenitrici o cellule precursori parzialmente commissionate e quindi alle cellule pienamente differenziate. La visione convenzionale della progressione lineare gerarchica delle cellule staminali da un livello di differenziamento al successivo durante la loro determinazione fenotipica è stata messa in discussione dalle recenti scoperte, secondo le quali trapiantandole *in vivo*, le cellule staminali possono dar vita a cellule che risiedono al di fuori del loro tessuto di provenienza [89-91]. Usando una strategia di differenziazione *in vitro*, è stato recentemente dimostrato che MSC derivate, dagli osteoblasti, adipociti e condrociti completamente differenziati, possono cambiare il loro fenotipo in altre linee mesenchimali in risposta agli specifici stimoli extracellulari [92].

Durante il processo di dedifferenziazione viene osservato che le cellule commissionate, prima perdono il loro fenotipo di linea specifica, riacquistando lo stato di cellula staminale primitiva sia morfologicamente che funzionalmente, inoltre, se opportunamente stimolate queste cellule hanno la capacità di acquisire un nuovo fenotipo redifferenziato [93]. E' ragionevole concludere che sia le cellule progenitrici pre-commissionate sia le cellule pienamente differenziate conservano la multipotenzialità, e che la loro plasticità durante il passaggio fenotipico può essere preservata durante il differenziamento e poi riacquisita in circostanze appropriate definite dal microambiente, come nel riparo e nella rigenerazione del tessuto.

## **PROPOSTA DI RICERCA**

Da quanto sopra esposto appare evidente che i meccanismi molecolari che presiedono al differenziamento delle MSC sono noti solo in parte. Lo studio dei fenomeni che regolano la biologia delle cellule staminali è di particolare interesse al fine di capire quali siano i meccanismi molecolari che regolano la vita di tali cellule. La conoscenza di tali meccanismi di base è propedeutica a qualsiasi utilizzo "terapeutico" di tali cellule.

Il seguente progetto di ricerca si propone di studiare le cellule staminali mesenchimali umane in modo da poter utilizzare a fini terapeutici cellule ben caratterizzate biologicamente. In particolare si vogliono identificare i processi molecolari responsabili dei processi di autorinnovo, multipotenzialità, differenziamento e senescenza. Inoltre si vuole valutare l'effetto di agenti genotossici, quali radiazioni ionizzanti e/o chemoterapici sulla biologia di tali cellule. Questi studi sono di particolare interesse al fine di capire quali possano essere gli effetti collaterali su di un soggetto ammalato di tumore che venga sottoposto a chemio/radioterapia. Come è noto, infatti, le terapie antitumorali, spesso particolarmente "aggressive" sono responsabili di numerosi effetti collaterali nei pazienti. Tali fenomeni possono probabilmente essere associati e causati dalla terapia antitumorale ai compartimenti dell'organismo che contengono le riserve di cellule staminali.

## **ESECUZIONE DELLA RICERCA**

### **1) Prelievo di sangue midollare attraverso l'esecuzione del mieloaspirato**

## **2) Allestimento di colture di MSC**

## **3) Crescita in vitro e follow up dei processi di senescenza e differenziamento**

## **4) Trattamento in vitro delle MSC con agenti genotossici ed analisi degli effetti biomolecolari**

### **PRELIEVO DI SANGUE DAL MIDOLLO OSSEO**

Il materiale per la messa in coltura delle MSC sarà ottenuto dai prodotti di risulta dell'aspirato midollare che verrà eseguito ai pazienti affetti da patologia neoplastica diagnosticati e trattati presso il Servizio di Oncologia Pediatrica della nostra Università. Il campione di sangue midollare sarà prelevato ai pazienti a cui per valutazione di follow up dovrà essere effettuato un mieloaspirato di controllo. Il vantaggio della nostra proposta è quello di utilizzare per l'allestimento delle colture di MSC del materiale biologico che verrebbe altrimenti scartato.

I soggetti dovranno fornire il consenso informato per l'utilizzo di tale materiale biologico a fini di ricerca.

Va precisato che verranno allestite colture di MSC da tutti i diversi soggetti che, dopo aver fornito il consenso informato, subiranno il prelievo di midollo osseo. Tra questi vi saranno soggetti affetti da patologia, soggetti con assenza di malattia minima residua ed in minima parte soggetti sani. Le colture di cellule provenienti da soggetti affetti di patologia verranno successivamente scartate e l'interesse si concentrerà unicamente sulle colture provenienti da soggetti sani e/o con assenza di malattia minima residua. Il rationale di tale scelta risiede nella necessità di voler analizzare la biologia di cellule staminali mesenchimali normali e non neoplastiche.

### **ALLESTIMENTO DI COLTURE DI MSC**

Dai midolli prelevati verranno purificati le frazioni nucleari mediante centrifugazione su gradiente di Ficoll. Le cellule così ottenute verranno poste in coltura in terreno alpha-MEM addizionato di siero fetale bovino. Dopo 3 giorni di incubazione a 37°C le cellule non aderenti alle piastre di coltura verranno scartate e le cellule adese rappresenteranno il "pool" di cellule staminali e progenitori che verrà propogato per ulteriori esperimenti.

## **CRESCITA IN VITRO E FOLLOW UP DEI PROCESSI DI SENESCENZA E DIFFERENZIAMENTO**

Le colture di MSC verranno cresciute in vitro a tempi successivi (1, 15 30 e 45 giorni) si preleveranno delle aliquote di cellule per le analisi di senescenza e differenziamento.

A tal proposito la senescenza verrà analizzata mediante saggio della galattosidasi acida, saggio TRAP e valutazione di geni associati alla senescenza mediante RT-PCR e/o western blot.

I pathways molecolari coinvolti nel processo di senescenza verranno studiati anche mediante utilizzo della tecnica dell'RNA interference.

I processi differenziativi verranno valutati mediante colorazioni immunohistochimiche per identificare i principali tipi cellulari che possono derivare dalle MSC, quali osteociti, adipociti e condrociti. I processi differenziativi verranno analizzati anche valutando l'espressione di marcatori molecolari associati alla maturazione cellulare.

## **TRATTAMENTO IN VITRO DELLE MSC CON AGENTI GENOTOSSICI ED ANALISI DEGLI EFFETTI BIO-MOLECOLARI**

Le colture di MSC verranno trattate con agenti genotossici (radiazioni ionizzanti e/o chemioterapici quali la doxorubicin) e su queste colture verranno eseguiti gli stessi esperimenti sopra descritti al fine di verificare come tali trattamenti possano alterare le funzioni biologiche delle MSC.



**PERSONALE COINVOLTO NEL PROGETTO DI RICERCA**

**Dipartimento di Medicina Sperimentale, SUN, NAPOLI**

Prof. Umberto Galderisi

Prof. Marilena Cipollato

Prof. Antonino Cascino

Dr. Amalia Forte

**Servizio di Oncologia Pediatrica - Dipartimento di Pediatria , SUN**

Dott.ssa Maria Giuliano

**Heinrich Pette Institut, Abteilung Zellbiologie und Virologie, University of Hamburg,  
HAMBURG, Germany**

Dr Wolfgang Bohn

Dr Heike Helmbold