

RALUCA ZAMFIR

RELAZIONE RELATIVA AL PROGETTO

“Studio del potenziale rigenerativo di cellule staminali neurali delle leptomeningi e di nuovi target farmacologici nelle malattie neurodegenerative” Codice FARMA 18/2018

INTRODUZIONE

Il tessuto cerebrale rappresenta una delle strutture più complesse dell'organismo umano e lo sviluppo di cure efficaci a seguito di alterazioni patologiche del suo funzionamento risulta di grande importanza. Negli ultimi anni una grande attenzione è stata data alla capacità del cervello di effettuare neurogenesi, quindi le cellule staminali neurali sono diventate oggetto di molti studi correlati alla medicina rigenerativa, in quanto potrebbero avere un potenziale terapeutico in diverse malattie neurodegenerative (Bifari et al., 2009; Bifari et al., 2015).

In particolare, all'interno dell'encefalo esistono alcune regioni in grado di produrre nuove cellule, come la zona sotto-ventricolare (ZSV) della parete laterale dei ventricoli, il giro dentato dell'ippocampo e le meningi, al cui interno è stata evidenziata una popolazione staminale embrionale (Leptomeningeal Embryonic Stem Cells, LeESC) che differenzia *in vitro* (Decimo et al., 2012). Tenendo conto anche dei recenti sviluppi sulla produzione di sistemi cellulari tridimensionali (Lancaster et al., 2014), le cellule estratte dalle zone sopraindicate possono essere usate per generare organoidi. Questi ultimi sono modelli 3D che riproducono *in vitro* l'architettura del tessuto cerebrale permettendo così di approfondire lo studio dei meccanismi alla base delle patologie e offrono un riscontro a livello terapeutico in quanto trapiantabili in modelli animali con danni neurologici.

OBIETTIVI

Nei mesi di borsa di studio dedicati al progetto: “Studio del potenziale rigenerativo di cellule staminali neurali delle leptomeningi e di nuovi target farmacologici nelle malattie neurodegenerative” ho eseguito l'isolamento di cellule staminali embrionali dall'ippocampo, dalla ZSV e dalle meningi di topo. Dopo aver messo a punto un protocollo per il loro differenziamento in cellule neurali mature, queste sono state utilizzate per ricavare strutture tridimensionali (3D) *in vitro*, ovvero per la generazione di organoidi, con l'obiettivo di riprodurre l'organizzazione del tessuto cerebrale stesso ed in particolare quella ippocampale. Al fine di validare il modello cellulare 3D messo a punto, gli organoidi sono stati confrontati con colture ippocampali primarie di ratto e con tessuto cerebrale di topo.

RISULTATI

Le cellule staminali embrionali sono state estratte dagli embrioni di topi di ceppo C57Bl/6. Questi sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale e grazie all'utilizzo di uno stereomicroscopio sono state estratte le meningi, l'ippocampo e la ZSV dal cervello degli embrioni. È stato eseguito un lavaggio in HBSS e i campioni sono stati messi in coltura in flasks in un terreno specifico per l'espansione delle cellule staminali in forma di neurosfere (NS). Dall'estrazione sono state ottenute 500.000-800.000 cellule.

Abbiamo sviluppato un protocollo specifico per l'espansione delle cellule staminali neurali che prevede l'utilizzo del seguente terreno di coltura:

DMEM7F12, 2% B27 supplement, 1% N2 supplement, 1% penicillin-streptomycin, 20 ng/ml human EGF, 20 ng/ml FGF2.

Abbiamo quindi successivamente confrontato due diversi protocolli di differenziamento (A e B) per definire quali dei due avrebbe permesso alle NS di maturare per formare organoidi ippocampali.

- A) DMEM/F12, 1% B27 supplement, 0,5% N2 supplement, 1% penicillin-streptomycin, 0,5% NEAA supplement, 0,035% β mercaptoethanol supplement, 0,5 μ M acido retinoico, 3 μ M CHIR.
- B) Neurobasal medium, 2% B27 supplement, 0,25% L-Glutamine, 1% penicillin-streptomycin, 50 ng/ml BDNF.

I protocolli citati ci hanno consentito di ricavare un modello di espansione e di differenziamento *in vitro* di cellule staminali neurali, finalizzato alla generazione di organoidi. Nelle varie fasi dei protocolli A e B si è registrato un incremento dei marcatori di differenziamento (MAP2, β 3Tubulina e Sinaptofisina) insieme ad una diminuzione dei marcatori di staminalità (Nestina e Vimentina). Durante gli stadi più tardivi, gli organoidi assumono un'organizzazione radiale, in quanto le cellule differenziate si distribuiscono prevalentemente nello strato esterno. Inoltre, già in una fase precoce gli organoidi esprimono marcatori tipici dei progenitori ippocampali, quali ZBTB20 e PROX1. Nonostante entrambi i protocolli di differenziamento abbiano consentito la generazione di organoidi, il protocollo B è risultato più efficace in termini di sopravvivenza e maturazione in senso ippocampale.

L'espressione di marcatori specifici di differenziamento neuronale risulta comparabile con i dati ottenuti sul tessuto murino e sulle colture cellulari bidimensionali di ratto.

La possibilità di ricreare *in vitro* strutture comparabili all'organizzazione del tessuto *in vivo* rappresenta un grande vantaggio dell'utilizzo di organoidi in ambito della medicina rigenerativa così come modello di studio di malattie neuropatologiche.

Tali aspetti verranno sviluppati in studi futuri in cui gli organoidi generati e caratterizzati *in vitro* verranno trapiantati in modelli animali con patologie neurodegenerative per verificare l'effettivo recupero funzionale.

BIBLIOGRAFIA

Bifari F., Decimo I., Chiamulera C., Bersan E., Malpeli G., Johansson J., Lisi V., Bonetti B., Fumagalli G., Pizzolo G., et al. (2009). Novel stem/progenitor cells with neuronal differentiation potential reside in the leptomeningeal niche. *J. Cell. Mol. Med.*

Bifari F., Berton V., Pino A., Kusalo M., Malpeli G., Di Chio M., Bersan E., Amato E., Scarpa A., Krampera M., Fumagalli G., Decimo I. (2015). Meninges harbor cells expressing neural precursor markers during development and adulthood. *Cellular Neuroscience.*

Decimo I., Bifari F., Krampera M., Fumagalli G., (2012). Neural stem cells niches in health and diseases. *Current Pharmaceutical Design.*

Lancaster M.A., Knoblich J. A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. Nat. Protoc.

Il responsabile del progetto di ricerca

Dr.ssa Ilaria Decimo



Il borsista

