

PROGETTO DI RICERCA (max 5 pagine)

Cognome	Urrata
Nome	Valentina
Titolo del progetto	Caratterizzazione del secretoma degli sferoidi di cellule staminali derivate da tessuto adiposo (S-ASCs) e loro applicazione per la rigenerazione tissutale
Corso di dottorato	Oncologia e Chirurgia Sperimentali
Firma candidato del	

1-Sommario

Recentemente, la letteratura scientifica ha ritenuto che i modelli di colture cellulari in 3D possano imitare correttamente le proprietà dei tessuti nativi da cui esse vengono isolate. Dall'analisi comparativa con i modelli di coltura in 2D, gli Sferoidi di Cellule Staminali Adipose (S-ASCs) hanno mostrato migliori capacità rigenerative sia in studi *in vitro* che *in vivo*. Le S-ASCs presentano un elevato potenziale di differenziazione *multilineage* [1] e mantengono le loro caratteristiche di staminalità fino a 28 giorni [2]. Probabilmente, non presentano un fenotipo alterato né un'espressione di molecole di superficie alterata tipica invece della condizione artificiale delle cellule aderenti alla plastica [3]. È stato anche visto che piastrando cellule staminali embrionali o adulte in una matrice 3D, queste crescono con alta efficienza in strutture organotipiche che si auto-organizzano, gli organoidi, che mostrano gli aspetti fenotipici essenziali degli organi da cui derivano [4]. In un tessuto o organo, oltre alla componente cellulare, gioca un ruolo fondamentale anche il microambiente in cui esse si trovano. Tutte le cellule, infatti, comunicano tra loro mediante stimoli autocrini e paracrini. Esse sono capaci di produrre diversi tipi di vescicole di membrana note come vescicole extracellulari (EVs) che sono distinte in tre classi: esosomi, microvescicole e corpi apoptotici. Le EVs contengono specifiche proteine, peptidi, RNA codificanti e non codificanti (microRNAs, mRNAs e long noncoding RNAs), lipidi e frammenti di DNA [5]. Ci sono vantaggi significativi nell'applicare le EVs per la medicina rigenerativa poiché queste possono trasportare più biomolecole simultaneamente ma non contengono l'apparato replicativo quindi non possono cambiare fenotipo, riducendo il rischio di trasformazione neoplastica [6].

2-Descrizione del progetto

Lo scopo del progetto è di trovare strategie innovative e non invasive per la rigenerazione completa dei tessuti molli e del tessuto osseo in modo che questi risultino vascolarizzati ed innervati, per ricevere i nutrienti e gli stimoli. Il proposito finale è quello di garantire la rigenerazione dei suddetti tessuti al fine di ripristinarne la corretta fisiologia.

A tal proposito il mio obiettivo sarà:

1.
 - Studiare il potenziale rigenerativo del secretoma degli sferoidi di cellule staminali adipose (S-ASCs) attraverso l'analisi del loro mezzo condizionato e delle vescicole extracellulari (EVs) in esso contenute
 - Studiare il potenziale rigenerativo del secretoma del digesto dopo digestione meccanica ed enzimatica di lipoaspirati attraverso l'analisi del mezzo condizionato e delle vescicole extracellulari (EVs) in esso contenute

La caratterizzazione delle EVs e dei mezzi condizionati sia dal secretoma delle S-ASCs in coltura che direttamente dal digesto può essere utile per capire se questi sono gli stessi o se contengono diversi fattori importanti ai fini rigenerativi.

- Generare *in vitro* le seguenti condizioni:
 - Mezzo condizionato da S-ASCs / digesto senza le EVs
 - Mezzo condizionato da S-ASCs / digesto con le EVs
 - EVs purificate da S-ASCs / digesto
 - Generare quattro linee cellulari in coltura: condrociti, osteoblasti, cellule endoteliali, cellule nervose, differenziate dalle S-ASCs aggiungendo al loro terreno di coltura gli opportuni fattori di differenziamento come suggerito dalla letteratura scientifica. Il differenziamento nei quattro *lineages* cellulari sarà valutato attraverso l'analisi di specifici *markers*.
2. Testare l'effetto rigenerativo *in vitro* del secretoma delle S-ASCs o dal digesto mediante il test dello *scratch wound healing assay* sulle singole colture e sulle seguenti co-colture:
 - Condrociti + cellule endoteliali
 - Condrociti + cellule nervose
 - Osteoblasti + cellule endoteliali
 - Osteoblasti + cellule nervose

A tal scopo sarà necessario:

- Valutare, mediante microscopia a fluorescenza, in quale condizione di coltura si assisterà ad un incremento della proliferazione cellulare
- Eseguire analisi di espressione genica (mediante Real-time PCR) e proteica (Western Blot / Citofluorimetria) sulle cellule con maggiore potere rigenerativo per indagare rispettivamente l'*up* o *down* regolazione nell'espressione di specifici geni e proteine durante il processo di rigenerazione. Quindi studiare i *pathways* coinvolti nella rigenerazione

3. Identificare gli agenti specifici responsabili degli effetti rigenerativi nel secretoma, quindi eseguire:
 - analisi proteomiche, lipidomiche e genomiche sulle EVs purificate per trovare chi tra proteine deregolate, lipidi o *coding* e *noncoding* RNAs sono responsabili della capacità rigenerativa delle cellule.
 - saggi multipli usando Luminex sul mezzo condizionato per studiare il ruolo delle molecole secrete dalle S-ASCs e non inglobate nelle vescicole.
4. Effettuare un silenziamento di geni specifici nelle S-ASCs mediante tecnica di *RNA interference* e valutare l'assenza di rigenerazione delle cellule a cui è stato effettuato uno *scratch* per confermare i risultati.
5. Generare due tipi di organoidi composti da matrigel o un nuovo hydrogel con le seguenti linee cellulari precedentemente marcate:
 - condrociti, cellule endoteliali e nervose per mimare un tessuto connettivo
 - osteoblasti, cellule endoteliali e nervose per mimare un tessuto osseo.

Gli organoidi rappresentano un costrutto tissutale multicellulare 3D *in vitro* capace di mimare l'organo corrispondente *in vivo*. Tali strutture sono oggi impiegate per studi di rigenerazione o riparazione tissutale, per studi di veicolazione di farmaci o per studiare le interazioni ospite-microbioma [7].

Diversi studi in letteratura provano che la comunicazione tra più linee cellulari differenti all'interno dell'organoide migliora notevolmente la generazione dello stesso, rendendolo un modello tridimensionale più realistico. Studi per la generazione di organoidi di fegato, infatti, mostrano che la segnalazione intercellulare tra epatociti, cellule mesenchimali e cellule endoteliali è necessaria per la maturazione dell'organoide stesso [8].

Studi su organoidi intestinali, inoltre, dimostrano anche l'importanza dell'innervazione per la generazione di un organoide realistico e funzionale che mimi, nel caso specifico dell'intestino, la presenza del sistema nervoso enterico [9]. Creando, infine, co-colture di isole pancreatiche provenienti da topo o da uomo, cellule endoteliali umane (HUVECs) e cellule staminali mesenchimali umane (MSCs) è stata osservata una auto-organizzazione spontanea di queste linee cellulari a formare una struttura condensata di isole pancreatiche circondate da vasi. Le funzioni dell'organoide così costituito risultano implementate e ciò è stato dimostrato paragonando i livelli di insulina prodotti dalle isole generate dai tre *lineages* cellulari con quelli prodotti dalle isole generate da una sola linea cellulare [10].

6. Mimare un danno meccanico attraverso uno *scratch* sugli organoidi ed utilizzare il mezzo condizionato senza EVs, EVs purificate o tutto il secretoma di S-ASCs o da digesto per testarne le capacità rigenerative nelle suddette strutture tridimensionali.
 - Osservare la rigenerazione degli organoidi attraverso microscopia a fluorescenza e mediante analisi geniche e proteiche.

In conclusione, le capacità rigenerative del secretoma delle S-ASCs o da digesto potranno trovare applicazione nella rigenerazione dei tessuti a seguito di gravi ustioni o piaghe da decubito così come per rigenerare vasi linfatici dopo linfedema.

Un notevole vantaggio potrebbe essere quello di limitare i rischi di trasformazione neoplastica dovuti alla somministrazione cellulare *in vivo*.

3-Bibliografia

1. **Di Stefano AB, Leto Barone AA, Giammona A, Apuzzo T, Moschella P, Di Franco S, Giunta G, Carmisciano M, Eleuteri C, Todaro M, Dieli F, Cordova A, Stassi G and Moschella F.** «Identification and Expansion of Adipose Stem Cells with Enhanced Bone Regeneration Properties.» *J Regen Med Vol: 5 Issue: 1, 2015.*
2. **A. Barbara Di Stefano, Federica Grisafi, Marta Castiglia, Alessandro Perez, Luigi Montesano, Alessandro Gulino, Francesca Toia, Daniele Fanale, Antonio Russo, Francesco Moschella, Angelo A. Leto Barone, Adriana Cordova .** «Spheroids from adipose-derived stem cells exhibit an miRNA profile of highly undifferentiated cells.» *J Cell Physiol. 2018; 1–12.*
3. **Pappalardo Marco, Montesano Luigi, Toia Francesca, Russo Antonio, Di Lorenzo Sara, Dieli Francesco, Moschella Francesco, Leto Barone, Angelo A., Meraviglia Serena, Di Stefano Anna Barbara.** «Immunomodulation in Vascularized Composite Allotransplantation. What Is the Role for Adipose-Derived Stem Cells?» *Annals of Plastic Surgery, 2019: Volume 82 - Issue 2 - p 245-251.*
4. **Jarno Drost and Hans Clevers.** «Organoids in cancer research» *Nature Reviews, Volume 18, 407-418 (2018)*
5. **Lipi Shukla, Yinan Yuan, Ramin Shayan, David W. Greening and Tara Karnezis.** «Fat Therapeutics: The Clinical Capacity of Adipose-Derived Stem Cells and Exosomes for Human Disease and Tissue Regeneration.» *Frontiers in Pharmacology, 2020, Volume 11.*
6. **Ioannis Azoidis, Sophie C Cox and Owen G Davies.** «The role of extracellular vesicles in biomineralisation: current perspective and application in regenerative medicine.» *Journal of Tissue Engineering, 2018, Volume 9: 1-11.*
7. **Claudia Corrà, Laura Novellademunt and X Vivian S.W. Li.** «A brief history of organoids». *Am J Physiol Cell Physiol* 319: C151–C165, 2020
8. **Philipp Wörsdörfer, Subba Rao Mekala, Jochen Bauer, Frank Edenhofer, Stefanie Kuerten, Süleyman Ergün.** «The vascular adventitia: An endogenous, omnipresent source of stem cells in the body». *Pharmacology & Therapeutics (2016)*

9. Emily M. Holloway, Meghan M. Capeling and Jason R. Spence. «Biologically inspired approaches to enhance human organoid complexity». *Development* (2019) 146, dev166173

10. Yoshinobu Takahashi, Keisuke Sekine, Tatsuya Kin, Takanori Takebe, Hideki Taniguchi. «Self-Condensation Culture Enables Vascularization of Tissue Fragments for Efficient Therapeutic Transplantation». *Cell Reports* 23, 1620–1629, May 8, 2018