

Studio della capacità immunomodulatoria delle cellule staminali perinatali in colture 3D per lo sviluppo di una potenziale terapia rigenerativa nel diabete di tipo 1

Introduzione

Il ruolo dell'infiammazione alla base di svariate patologie croniche o degenerative è sempre più evidente, così come nelle malattie autoimmuni quali il diabete di tipo 1. Un certo grado di immunosoppressione è auspicabile per la risoluzione o la riduzione della sintomatologia, ma non senza effetti invalidanti per il paziente. Da qui nasce la necessità di un approccio alternativo alle classiche terapie farmacologiche e l'interesse nello studio di nuove terapie cellulari basate sulle strategie immunomodulatorie.

Le cellule staminali perinatali, derivate dai tessuti placentari, hanno mostrato *in vitro* e in modelli preclinici una interessante capacità immunomodulatoria e per questo motivo vengono proposte sempre più nelle applicazioni cliniche. Oltre alla popolazione stromale mesenchimale presente nel cordone ombelicale (*hWJ-MSC*), le cellule epiteliali amniotiche (*hAEC*) sono una popolazione d'interesse poiché isolate dalla placenta umana, un organo di scarto di facile accesso, privo di limitazioni etiche che ne consente l'ampio recupero e l'elevata disponibilità.

Precedentemente, non solo il nostro gruppo^{1,2} ma anche altri studiosi hanno evidenziato la capacità delle *hAEC* di produrre citochine immunomodulatorie, esprimere recettori di membrana immunotolleranti, di inibire l'attivazione delle popolazioni cellulari coinvolte nella risposta immunitaria e di differenziare *in vitro* in cellule produttrici di insulina. Un aspetto da non sottovalutare per ottenere cellule funzionali *in vitro* è sicuramente la ricostruzione della interazione intercellulare e del microambiente tissutale, compreso il supporto trofico nativo della matrice extracellulare e delle cellule circostanti. Analisi pregresse supportano la creazione di modelli di coltura tridimensionali³ con migliorata capacità immunomodulatoria^{4,5,6}. La coltura delle *hAEC* combinata con popolazioni stromali quali *hWJ-MSC* potrebbe quindi consentire la creazione di un modello preclinico ai fini di un suo futuro impiego traslazionale nel diabete di tipo 1.

Scopo del progetto:

Tale progetto ha lo scopo di studiare il potenziale immunomodulatorio di cellule isolate da placenta umana. In particolare, verranno caratterizzate, dal punto di vista del potenziale immunomodulatorio e della capacità differenziativa, le cellule stromali derivate dalla gelatina di Wharton del cordone ombelicale (*hWJ-MSC*) e le cellule epiteliali isolate dalla membrana amniotica (*hAEC*). L'obiettivo è di allestire nuovi saggi *in vitro* basati su colture tridimensionali che possano avere una ricaduta futura nella terapia del diabete di tipo 1 e costituire modelli innovativi per la ricerca traslazionale.

Fasi di svolgimento e di realizzazione del progetto di ricerca

Il progetto si articolerà attraverso le seguenti attività:

- perfezionamento della generazione *in vitro* di modelli tridimensionali, in particolare, di strutture simil-isole pancreatiche ingegnerizzate *in vitro* utilizzando cellule perinatali (1-3 mesi);
- generazione di nuovi protocolli di immunomodulazione, basati su colture tridimensionali di *hWJ-MSC* e/o *hAEC* (1-3 mesi);
- studio della linfoproliferazione *in vitro* e in particolare analisi di sottopopolazioni T linfocitarie regolatorie (3-6 mesi);
- analisi delle citochine prodotte da co-culture di cellule staminali perinatali e popolazioni linfocitarie attivate ottenute da sangue periferico per la valutazione del microambiente infiammatorio ricreato *in vitro* (6-9 mesi);
- analisi del potenziale di differenziamento in senso insulino-secernente, a partire da colture tridimensionali di cellule perinatali con verificate capacità immunomodulatorie (6-12 mesi).

Bibliografia

1. Pizzuti, V.; Abruzzo, P.M.; Chatgialloglu, A.; Zia, S.; Marrazzo, P.; Petrocelli, G.; Zannini, C.; Marchionni, C.; Poggi, P.; Simonazzi, G.; Canaider, S.; Alviano, F.; Facchin, F.; Bonsi, L. A Tailored Lipid Supplement Restored Membrane Fatty Acid Composition and Ameliorates In Vitro Biological Features of Human Amniotic Epithelial Cells. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 1236.
2. Okere B, Alviano F, Costa R, et al. In vitro differentiation of human amniotic epithelial cells into insulin-producing 3D spheroids. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology.* September 2015:390-402.
3. Paris F, Marrazzo P, Pizzuti V, Marchionni C, Rossi M, Michelotti M, Petrovic B, Ciani E, Simonazzi G, Pession A, Bonsi L, Alviano F. Characterization of Perinatal Stem Cell Spheroids for the Development of Cell Therapy Strategy. *Bioengineering (Basel).* 2023 Feb 2;10(2):189.
4. Xie, AW, Zacharias, NA, Binder, BYK, Murphy, WL. Controlled aggregation enhances immunomodulatory potential of mesenchymal stromal cell aggregates. *STEM CELLS Transl Med.* 2021; 10: 1184– 1201.
5. Li J, Chen T, Huang X, Zhao Y, Wang B, Yin Y, et al. (2018) Substrate-independent immunomodulatory characteristics of mesenchymal stem cells in three-dimensional culture. *PLoS ONE* 13(11): e0206811.
6. Ménard, C., Tarte, K. Immunoregulatory properties of clinical grade mesenchymal stromal cells: evidence, uncertainties, and clinical application. *Stem Cell Res Ther* 4, 64 (2013).

Programma di formazione dell'Assegnista

Il piano di formazione prevede la completa integrazione nell'attività di ricerca descritta nel progetto scientifico.

In particolare, durante la sua esperienza nell'ambito del progetto di ricerca, l'assegnatario del contratto di ricerca potrà acquisire, perfezionare ed estendere le proprie conoscenze nelle seguenti attività:

- isolamento, caratterizzazione e differenziamento di cellule staminali isolate da differenti sorgenti cellulari tissutali umane quali placenta, cordone ombelicale e membrane fetali;
- ottimizzazione del protocollo di differenziamento verso il commissionamento pancreatico di tipo endocrino;
- ingegnerizzazione di isole pancreatiche composite con differenti combinazioni di cellule ed analisi della capacità di secrezione di insulina;
- valutazione dell'attività funzionale delle isole ingegnerizzate *in vitro*.
- valutazione del potenziale differenziativo mediante tecnico immuno-morfologiche;
- valutazione del potenziale immunomodulatorio mediante saggi immuno-enzimatici e tecniche di citometria a flusso.

Inoltre, l'assegnista di ricerca verrà coinvolto e integrato in specifiche attività di tutorato e di didattica così come nella partecipazione ad attività seminariali di formazione e acquisizione di competenze collegate all'ambito scientifico del progetto di ricerca descritto.