

Spett.le
Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della ricerca
Direzione Generale per il Coordinamento,
la Promozione e la Valorizzazione della Ricerca –
Ufficio V
Via M. Carcani, n. 61
00153 Roma

Brescia, 26 novembre 2020

Oggetto: Rendiconto di Spesa Fondi 5 per mille ANNO 2017

Spett.le MIUR,

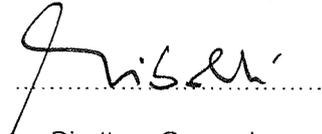
in riferimento ai fondi 5 per mille dell'anno 2017 si trasmette in allegato relazione scientifica dell'attività svolta e relativo rendiconto finanziario delle spese sostenute, specificando che i giustificativi di spesa (copie dei documenti di spesa e giustificativi di pagamento) restano disponibili per la consultazione presso la sede del Centro di Ricerca E. Menni di Fondazione Poliambulanza.

Restando a disposizione, porgiamo cordiali saluti.

Allegati:

1. Rendiconto di spesa (Allegato A)
2. Relazione scientifica illustrativa dell'attività svolta (Allegato B)

Dott. Alessandro Triboldi



Direttore Generale

Legale Rappresentante p.p.
Fondazione Poliambulanza



Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca
Direzione Generale per il Coordinamento, la Promozione e la Valorizzazione della
Ricerca
Uff. V.

Rendiconto di spesa Fondi 5 per mille ANNO 2017
Enti della Ricerca Scientifica

Ente¹: Fondazione Poliambulanza – Centro di Ricerca E. Menni
 Codice fiscale: 98120050178
 Indirizzo sede legale: Via Bissolati, 57
 Responsabile scientifico: Prof. Ornella Parolini ornella.parolini@poliambulanza.it
 Referente scientifico centro di ricerca: Dr.ssa Anna Cargnoni, Dr.ssa Marta Magatti, Dr. Andrea Papait, Dr.ssa Antonietta Silini, antonietta.silini@poliambulanza.it
 Referente rendicontazione : Sig.ra Elena Deboli – 0303518900 crem@poliambulanza.it

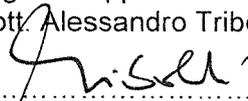
Attività: Caratterizzazione in vitro delle cellule derivate dalla placenta umana e studio del loro effetto in modelli preclinici di fibrosi

Data di inizio progetto: 13/12/2019
Data di fine progetto: 30/09/2020

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	€ 29.839,61	€ 25.347,04
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, ecc.)	€ 35.228,99	€ 35.228,99
TOTALE	65.068,60€	€ 60.576,03

Brescia, 26/11/2020

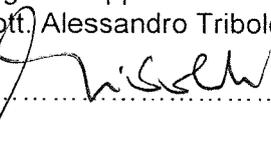
Legale Rappresentante p.p.
 Dott. Alessandro Triboldi



Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003 e del Regolamento Europeo 2016/679

Brescia, 26/11/20

Legale Rappresentante p.p.
 Dott. Alessandro Triboldi



¹ Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

TITOLO DEL PROGETTO: *Caratterizzazione in vitro delle cellule derivate dalla placenta umana e studio del loro effetto in modelli preclinici di fibrosi*

REFERENTI PROGETTO: Dr.ssa Anna Cargnoni, Dr.ssa Marta Magatti, Dr. Andrea Papait, Dr.ssa Antonietta Silini

RESPONSABILE SCIENTIFICO: Prof.ssa Ornella Parolini

INTRODUZIONE

Il Centro di Ricerca E. Menni (CREM) studia le proprietà delle cellule derivate dalla placenta (nello specifico cellule amniotiche mesenchimali) e le loro possibili applicazioni come terapia cellulare per trattare patologie non ancora curabili.

Grazie al contributo 5x1000 (anno 2017), il CREM ha potuto realizzare e concludere progetti di ricerca, sia *in vitro* che *in vivo*, conseguendo gli obiettivi specifici di seguito descritti:

A) Studi condotti *in vitro* per ampliare la conoscenza sulle proprietà delle cellule placentari

- 1) Studio sulle proprietà immunomodulatorie delle cellule amniotiche e del loro secretoma e meccanismi coinvolti
- 2) Studio della proprietà anti-tumorali delle cellule amniotiche
- 3) Studio delle potenziali applicazioni delle cellule amniotiche nel trapianto di cellule staminali emopoietiche

B) Approcci di terapia con cellule placentari in modelli pre-clinici

- 4) Valutazione dell'effetto delle cellule mesenchimali amniotiche sul processo infiammatorio che innesca lo sviluppo di fibrosi polmonare, in un modello di lesione polmonare indotto da bleomicina *in vivo*

RISULTATI

Durante il periodo dicembre 2019 – settembre 2020 abbiamo conseguito obiettivi diversi approfondendo lo studio delle proprietà delle cellule amniotiche sia *in vitro* che in modelli pre-clinici *in vivo*. A seguito riportiamo i risultati ottenuti nel periodo indicato riguardo i 4 progetti in corso.

1) Studio sulle proprietà immunomodulatorie delle cellule amniotiche e del loro secretoma e meccanismi coinvolti

a. Durante questo periodo abbiamo continuato ad approfondire le proprietà immunomodulatorie del terreno condizionato ottenuto da hAMSC (CM-hAMSC).

i. Abbiamo valutato l'effetto del CM-hAMSC sull'attivazione dei linfociti T e ricadute sulla polarizzazione Th/Treg e sulla maturazione Naive/Memory. Esperimenti preliminari condotti su cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) stimolati con anticorpo anti-CD3 hanno mostrato come il CM-hAMSC o il CM ottenuto dalla membrana amniotica in toto (CM-Membrana) presentino la capacità di andare a modulare l'attivazione dei PBMC sin dalle prime 24 ore (Figura 1). Infatti, abbiamo visto come il CM-hAMSC e il CM-Membrana riescano a ridurre l'espressione del marcatore di attivazione CD69, espresso post-attivazione del TCR nelle prime 24 ore post attivazione. Analogamente abbiamo osservato una riduzione dell'espressione del CD25 (IL-2Ra) a 72 ore, con un effetto che si protrae sino al giorno 6.

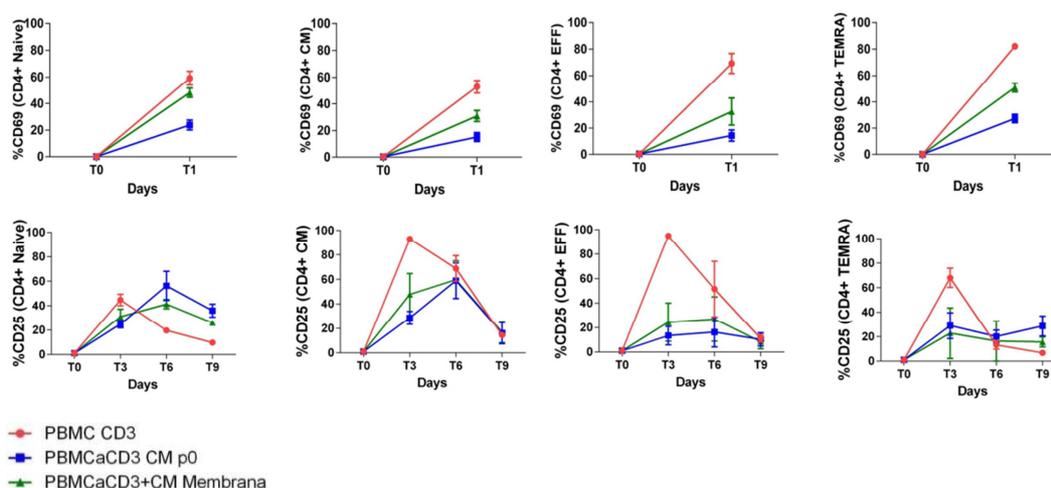


Figura 1: Effetto del CM-hAMSC sull'espressione di marcatori di attivazione linfocitari. PBMC stimolati con anti-CD3 (rosso), oppure stimolati con anti-CD3 in presenza di CM-hAMSC p0 (blu), o di CM ottenuto dalla membrana amniotica, CM-Membrana (verde). L'espressione dei marcatori di attivazione, CD69 e CD25 sono stati valutati, nel primo caso a 24 ore dall'attivazione (pannello sopra). L'espressione del CD25 (pannello sotto) è stata valutata a diversi timepoints (al giorno zero e ai giorni 3, 6 e 9). I dati sono rappresentativi dei diversi memory subsets.

Abbiamo quindi cercato di capire a che livello andasse ad agire il CM-hAMSC, valutando diverse vie di trasduzione del segnale coinvolte a diversi tempi. Come riportato in Figura 2, non si osservano rilevanti differenze nei primi 45 minuti per le 3 vie di trasduzione del segnale investigate (fosforilazione di ERK1/2, PDK1 e mTOR). Differenze che invece abbiamo riscontrato a giorno 1 per la fosforilazione di mTOR e di Stat5, due importanti molecole coinvolte, una nella regolazione del metabolismo cellulare (mTOR) (Saxton and Sabatini 2017) e l'altra, nella polarizzazione dei linfociti T (Stat5) (Owen and Farrar 2017). Analogamente, al giorno 3 abbiamo osservato delle variazioni nei livelli di fosforilazione di JNK1-2, un'importante via di segnalazione coinvolta nel differenziamento Th1/Th2 e la cui inibizione è stata riportata come determinante nell'ostacolare la polarizzazione verso il subset infiammatorio Th1 (Dong et al. 1998, Dong et al. 2000) permettendo così di spiegare gli effetti del CM-hAMSC finora riscontrati (Pianta et al. 2015, Papait et al. 2020).

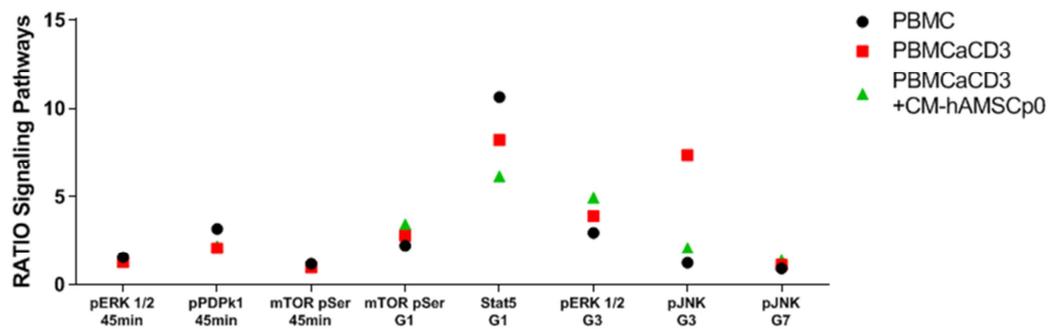


Figura 2: Effetto del CM-hAMSC sull'attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale. PBMC non stimolati (nero), PBMC stimolati con anti-CD3 (rosso), oppure stimolati con anti-CD3 in presenza di CM-hAMSC p0 (verde) sono stati analizzati mediante metodica phosflow per lo stato di fosforilazione di diverse proteine (ERK1/2, PDPK1, mTOR, Stat5, JNK1/2) a diversi timepoint.

Infine, al fine di andare ad investigare in maniera mirata, evitando le cross-interazioni inevitabili, che si potrebbero riscontrare tra le diverse componenti del PBMC, abbiamo deciso di effettuare i successivi esperimenti sui linfociti T purificati, con kit di separazione in positivo della STEM Cell Technologies, al fine di andare ad analizzare in maniera mirata l'effetto del CM-hAMSC sull'attivazione dei linfociti T stimolati con anti-CD3 e anti-CD28. La doppia attivazione, supplisce la mancanza delle antigen presenting cells (APC), normalmente presenti nei PBMC, consentendo l'attivazione della molecola costimolatoria CD28, essenziale per la completa attivazione dei Linfociti T CD4. Infatti la singola attivazione con l'anti-CD3 non è in grado da sola, di fornire uno stimolo sufficiente per la completa attivazione linfocitaria e le cellule andrebbero rapidamente incontro ad anergia.

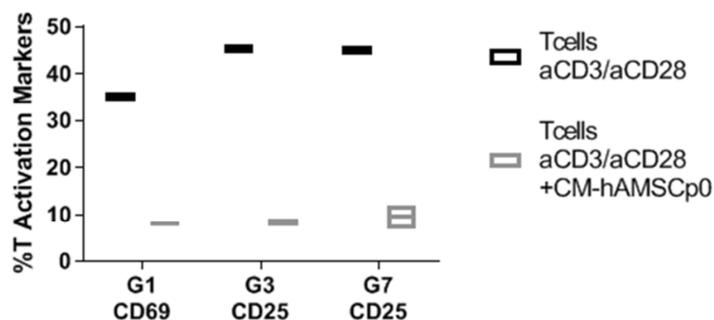


Figura 3: Effetto del CM-hAMSC sull'espressione di marcatori di attivazione linfocitari. Linfociti T totali, stimolati con anti-CD3 e anti-CD28 (nero), oppure stimolati con anti-CD3+anti-CD28 in presenza di CM-hAMSC p0 (grigio). L'espressione dei marcatori di attivazione, CD69 e CD25 sono stati valutati, nel primo caso a 24 ore dall'attivazione (pannello sopra). L'espressione del CD25 (pannello sotto) è stata valutata a diversi timepoints (al giorno 1 e ai giorni 3 e 7). I dati sono rappresentativi dei linfociti T totali.

Anche in questo caso abbiamo osservato un forte effetto del CM-hAMSC a partire dalle prime 24 ore post-attivazione. I risultati osservati ci hanno portato quindi a considerare da una parte il signaling direttamente a valle del TCR (Zap70, CD247, PDPK1), in considerazione dell'effetto riscontrato nelle prime 24 ore con la riduzione del CD69. Dall'altra, visto l'effetto osservato al giorno 3 (riduzione del CD25) e nei giorni successivi, abbiamo deciso di investigare l'impatto sul metabolismo dei linfociti T. In tal senso per poter analizzare in maniera approfondita la trasduzione del segnale, da una parte abbiamo disegnato tutta una serie di primers che ci permetteranno con metodica RealTime PCR di riuscire ad osservare i cambiamenti a livello molecolare. Allo stesso tempo l'acquisto degli anticorpi per pAKT e AKT totale, pS6K e la sua controparte totale, mTOR totale e fosforilato e le altre proteine come LC3A/B, atg5, atg7 e Beclina 1 ci consentiranno di capire, mediante metodica WB, se il CM-hAMSC va ad alterare il balance tra metabolismo ed autofagia andando così ad impattare sull'attivazione e polarizzazione dei linfociti T.

ii. Rimane da chiarire attraverso quale meccanismo/meccanismi le hAMSC riescano ad influenzare la funzione delle cellule immunitarie. Sulla base della letteratura scientifica, abbiamo ipotizzato che l'autofagia possa essere coinvolta nel determinare le proprietà immunomodulatorie delle cellule mesenchimali amniotiche e possa inoltre rappresentare un meccanismo attraverso il quale queste cellule possano “modulare” la funzionalità delle cellule immunitarie. L'autofagia è un processo cellulare finalizzato a degradare proteine intracellulari, aggregati proteici e organelli per assicurare la sopravvivenza e adattamento cellulare in condizioni di stress. Mediante la degradazione di materiale cellulare l'autofagia è in grado di fornire energia, di fornire costituenti biologici necessari alla cellula per “cambiare” il suo fenotipo e funzionalità (ad esempio per la sua differenziazione), di adattare il metabolismo cellulare alle esigenze cellulari del momento (ad esempio la degradazione mitocondriale attraverso l'autofagia promuove il metabolismo glicolitico che caratterizza le cellule ad alta proliferazione) e inoltre, è in grado di esercitare una sorveglianza sulla qualità delle proteine/organelli prodotti dalle cellule, infatti proteine/organelli disfunzionanti e che potrebbero essere fonte di malattia, vengono degradati per mezzo dell'autofagia.

Gli obiettivi del nostro studio sono: 1) di indagare come il microambiente patologico (infiammatorio, tumorale etc), con cui le cellule mesenchimali amniotiche vengono a contatto quando utilizzate come strategia terapeutica, possa influenzare le loro proprietà immunomodulatorie e se questo si realizzi attraverso una modulazione del loro processo autofagico; e viceversa, 2) di studiare se le cellule mesenchimali amniotiche modulino l'attività delle cellule del microambiente (infiammatorie e tumorali) modificandone l'autofagia.

Per la realizzazione di questi obiettivi è di fondamentale importanza sviluppare le metodiche che permettano di valutare il flusso autofagico cellulare e tra quelle più utilizzate è la valutazione dell'espressione (attraverso Western Blot) di proteine fondamentali per l'autofagia: LC3I/II, p62, beclin1, Atg5, Atg7. Nel periodo dicembre 2019-settembre 2020 abbiamo iniziato a mettere a punto questa tecnica e a produrre batch di cellule mesenchimali amniotiche (isolandole da placente ottenute da tagli cesarei dopo consenso della madre) da poter utilizzare per studiare il processo autofagico in queste cellule e come modularlo sia attraverso induttori di autofagia (rapamicina), inibitori di autofagia (bafilomicina, 3-metiladenina) e condizioni di coltura cellulare che riproducano diversi microambienti di stress (mancanza di nutrienti, ipossia, stress ossidativo) e patologici (infiammazione, tumore).

Al momento purtroppo non abbiamo ancora risultati e abbiamo messo a punto la tecnica di WB solo per la proteina beclin-1 e proteina di riferimento β -actin. Vedi Figura 4 riportata sotto.

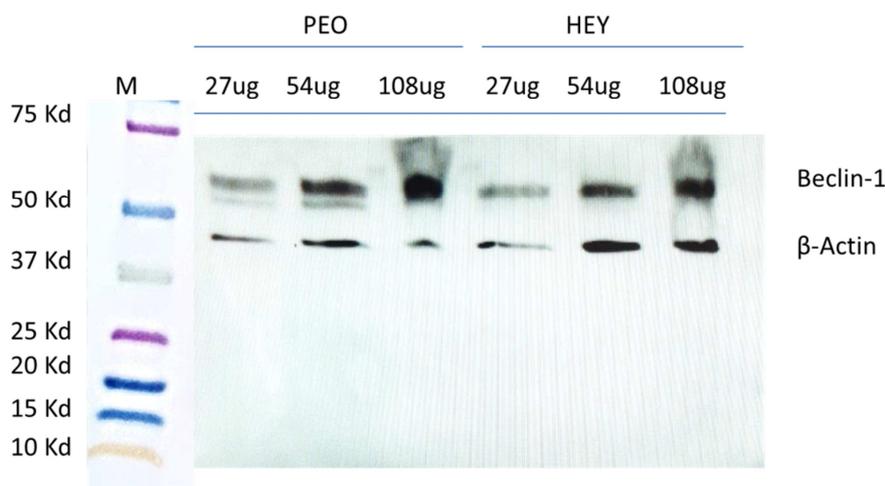


Figura 4: Lisati cellulari di 2 linee cellulari da tumore ovarico (PEO e HEY) utilizzate per condurre le prove di ottimizzazione della tecnica di WB, sono stati caricati in quantità scalari progressive e separati su SDS-PAGE gel. Le proteine separate su gel sono state in seguito elettro-trasferite su membrana di nitrocellulosa in seguito incubata con anticorpi specifici anti-beclin-1 e anti- β -actin. Le bande visibili nella figura rappresentano l'espressione di queste due proteine nei lisati cellulari caricati. M indica il marker di peso molecolare.

b. In fine, abbiamo proseguito altri studi mirati all'ottimizzazione dell'espansione cellulare. Per poter affrontare quegli studi che necessitano di un grande numero di cellule ed è importante che queste provengano da un unico donatore a seguito della variabilità inter donatore, e per far fronte a uno dei limiti maggiori quale la resa cellulare a seguito dell'isolamento enzimatico, abbiamo iniziato a ottimizzare il processo di espansione cellulare. Abbiamo voluto cercare una alternativa per poter coltivare le cellule hAMSC su larga scala e si è deciso di testare le spinner flask e il Bioreattore della ditta Terumo.

Per l'utilizzo delle spinner flask le cellule sono state caricate su delle microsferi chiamate Cytodex di tipo 1 e 3 in 6 ml di terreno e lasciate una settimana nella spinner flask a 37°C, 5% CO₂. Purtroppo il risultato non è stato positivo (Figura 5), il numero di cellule alla raccolta era nettamente inferiore rispetto a quelle inoculate. La causa può essere dovuta a passaggi tecnici critici come la manipolazione stessa dei microcarriers e la difficoltà nel distacco delle cellule da questi. Pertanto si è deciso di momentaneamente lasciare a parte questa sperimentazione per focalizzarci su esperimenti mirati all'utilizzo del bioreattore Terumo.

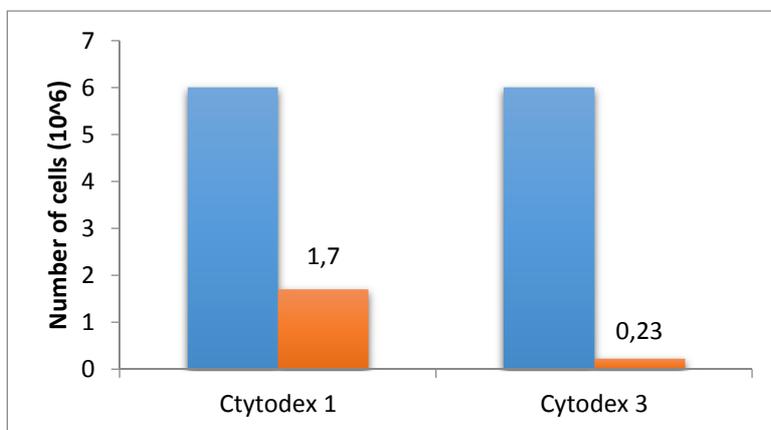


Figura 5: Conta di hAMSC dopo 7 giorni di coltura con (barra arancione) o senza (barra blu) microsferi.

La demo del bioreattore avrà luogo a inizio 2021 e sono stati necessari esperimenti per ottimizzare le condizioni di coltura delle cellule. Le cellule hAMSC utilizzate devono essere piastrate, in piastra oppure in flask, subito dopo l'isolamento da placenta e coltivate fino a passaggio 1 in Chang C, staccate con tripsina e poi testate. Per la coltura nel bioreattore è strettamente necessario che venga effettuato un coating di fibronectina per rendere la superficie di coltura adatta all'adesione cellulare per cui in tutti i test i supporti utilizzati sono stati trattati con fibronectina. Si è prima voluto valutare l'effetto del coating di fibronectina sulla crescita cellulare e si è visto che le cellule coltivate in presenza di coating di fibronectina sono in numero maggiore (Figura 6).

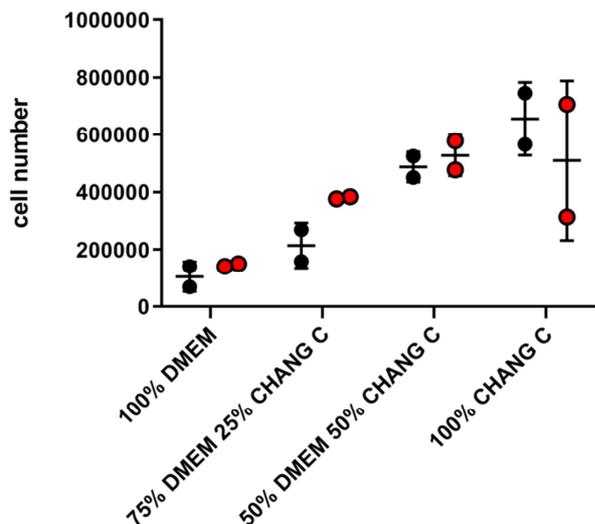


Figura 6: Coltura di hAMSC con (palline rosse) e senza (palline nere) fibronectina. Il numero di cellule è stato contato dopo 6 giorni di coltura.

Quindi si è cercato un terreno ottimale, anche per far fronte ai costi elevati associati a un alto volume di terreno utilizzato nel bioreattore, per la coltura provando a mischiare il Chang C (terreno normalmente utilizzato per espandere le hAMSC) con DMEM low Glucose in diverse percentuali: 75% DMEM - 25% Chang; 70% DMEM - 30% Chang C; 65% DMEM - 35% Chang C; 60% DMEM - 40% Chang C; 50% DMEM - 50% Chang C.

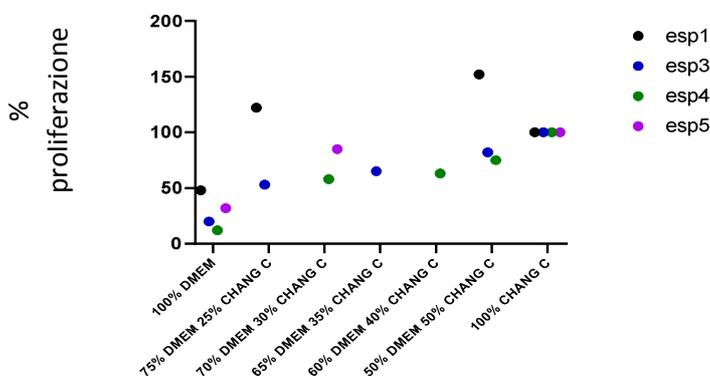


Figura 7: Proliferazione delle hAMSC in diversi terreni di coltura. Il grafico mostra 5 esperimenti.

In Figura 7 si conferma la scelta del ratio 70% DMEM- 30% Chang C come cell culture medium nel bioreattore. Successivamente, scelta la combinazione 70% DMEM - 30% Chang C si è provato a confrontare il DMEM Low Glucose con DMEM-F12 Life Technologies o DMEM-F12 Merck o DMEM HighGlucose Merck (Figura 8). Da un primo esperimento il numero di cellule nei diversi terreni sono paragonabili. Sono in corso ulteriori esperimenti per confermare il dato.

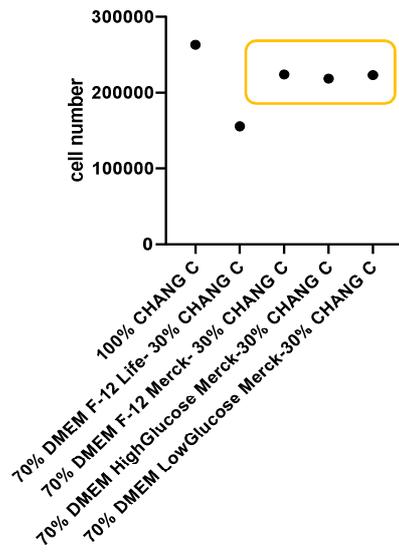


Figura 8: Conta hAMSC dopo coltura in diversi terreni DMEM e CHANG C.

Sono in corso anche degli esperimenti di coltura cellulare per la misurazione della produzione di lattato cellulare: dato fondamentale per il settaggio del bioreattore.

2) Studio della proprietà anti-tumorali delle cellule amniotiche

In questo periodo oltre ad approfondire il potenziale delle cellule da placenta umana a termine e derivati di essi nel controllo della proliferazione di cellule di tumore ovarico, abbiamo iniziato studi mirati alla valutazione dell'effetto di hAMSC su cellule del microambiente tumorale, i fibroblasti (CAF) associati al tumore, che hanno un ruolo importante nel supportare la crescita tumorale. Recentemente abbiamo iniziato a generare i CAF, o meglio cercare di differenziare fibroblasti normali verso un fenotipo "tumorale". Per fare questo, abbiamo messo in coltura fibroblasti da derma esponendoli per 1 settimana al terreno condizionato (CM) delle linee tumorali OV90 e HEY addizionato o meno con TGF β 1. La verifica della componente stromale associata al tumore (CAF) viene effettuata mediante valutazione della morfologia cellulare (morfologia più allungata rispetto a fibroblasti sani, Figura 9) e altri studi in corso come la valutazione dell'espressione di alcuni marcatori identificati come caratteristici della componente CAF tra i quali α SMA, vimentina e desmina, valutata mediante un approccio multidisciplinare che prevede l'impiego di metodiche di immunofluorescenza, Western blot e RT-PCR.

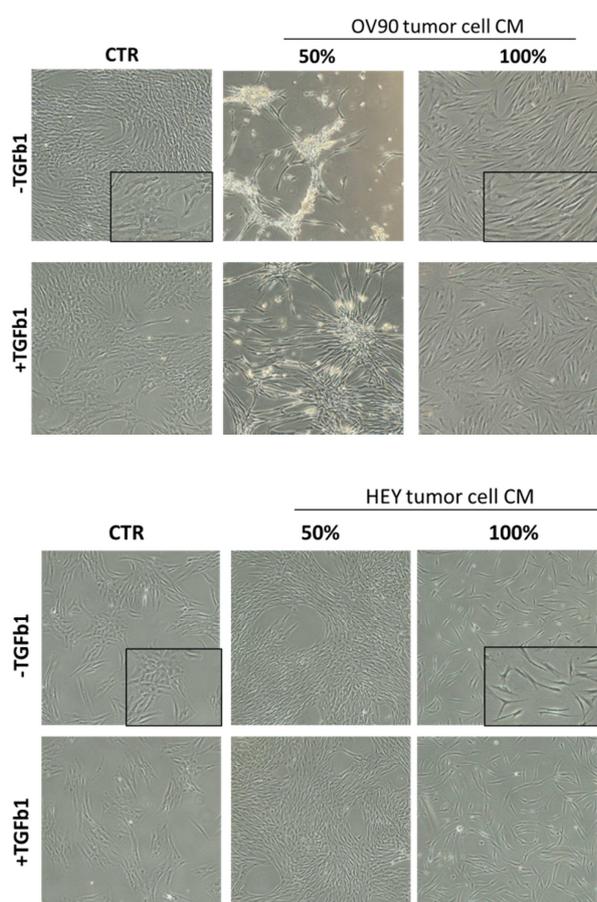


Figura 9: Fibroblasti da derma sono stati coltivati per 6 giorni in presenza o meno di TGF β 1 e terreno condizionato da 2 linee di carcinoma ovarico (Ov90 pannello sopra, HEY pannello sotto). In presenza di CM da cellule tumorali i fibroblasti prendono una morfologia allungata simile ai CAF.

Inoltre, in collaborazione con l'Università di Lubiana (Slovenia) sono stati fatti studi mirati a capire il potenziale anti-tumorale delle hAMSC verso carcinoma a cellule transizionali della vescica umana (T24). Abbiamo valutato la proliferazione delle T24 in presenza o meno di hAMSC e hAEC (cellule epiteliali da membrana amniotica), e in contatto o in transwell (Figura 10). I risultati mostrano che entrambe hAMSC e hAEC sono in grado di diminuire la proliferazione di cellule tumorali T24. Questo effetto è venuto meno

quando le cellule amniotiche sono state coltivate in transwell con le T24 suggerendo che il contatto cellula-cellula è importante per avere un effetto anti-proliferativo.

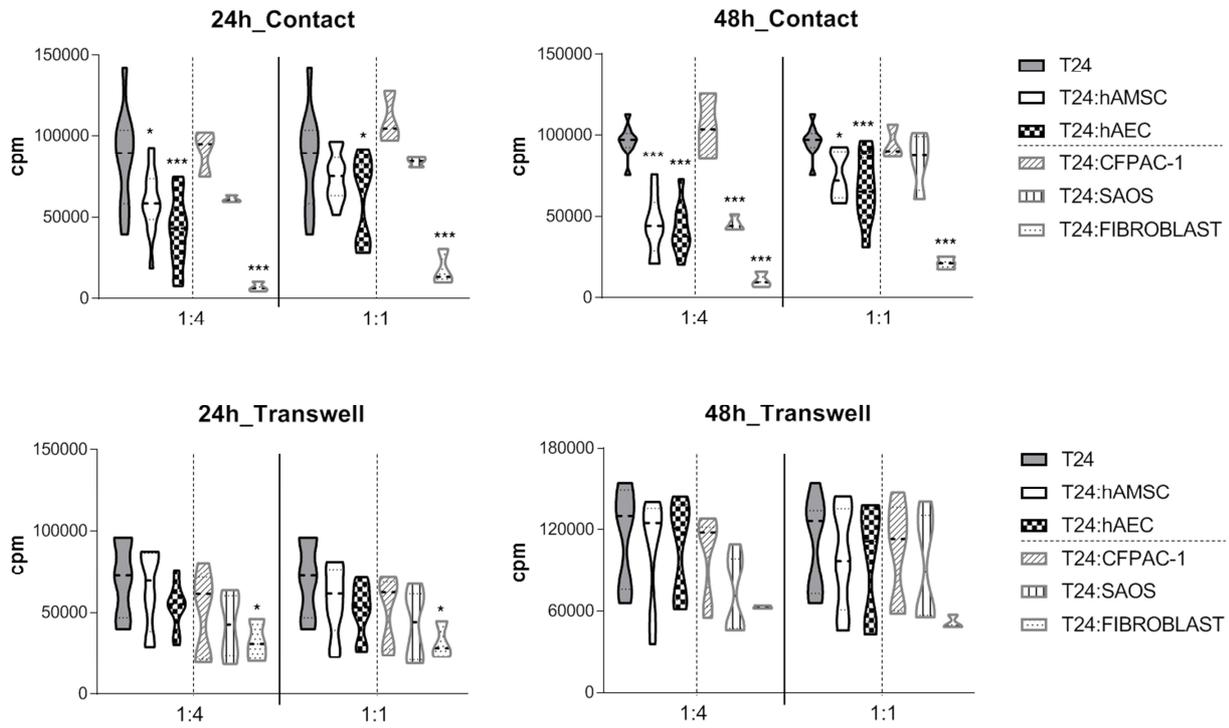


Figura 10: Proliferazione di cellule tumorali T24 in presenza di hAMSC e hAEC. Le linee cellulari CFPAC-1, SAOS e fibroblasti di derma sono stati utilizzati come controlli.

3) Studio delle potenziali applicazioni delle cellule amniotiche nel trapianto di cellule staminali emopoietiche

Durante il periodo indicato abbiamo continuato lo studio della hAMSC come fonte alternativa a quelle derivate da midollo osseo nel favorire l'espansione ex vivo di cellule staminali emopoietiche e dei progenitori ematopoietici.

I risultati ottenuti sono riportati come segue.

a. le hAMSC e BM-MSC hanno un fenotipo simile che include marcatori MSC comuni e molecole canoniche espresse nella nicchia HSC (Figura 11)

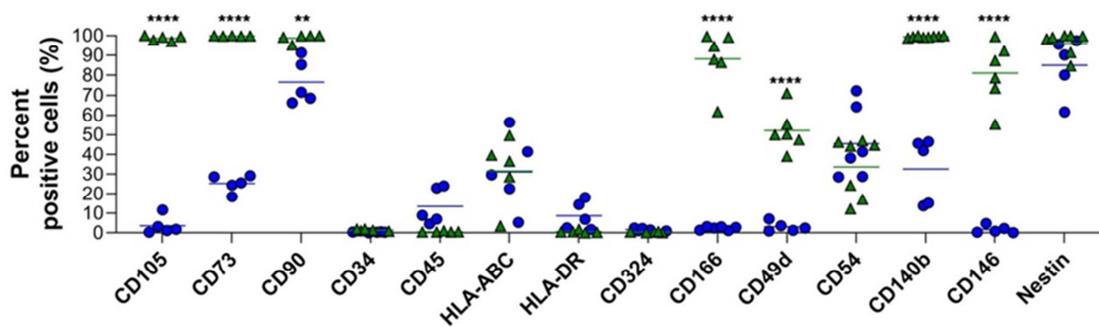


Figura 11: Immuno-fenotipo di cellule stromali mesenchimali del midollo osseo umano (BM-MSC, in verde) e cellule stromali mesenchimali amniotiche (hAMSC, in blu). Il fenotipo è stato analizzato mediante citofluorimetria a flusso e i dati sono presentati come media \pm deviazione standard, SD (** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$). I dati sono rappresentativi di ≥ 5 diversi donatori MSC.

b. Le hAMSC supportano l'espansione ex vivo delle cellule staminali emopoietiche (HSC, hematopoietic stem cells) derivate dal sangue del cordone ombelicale (Figura 12)

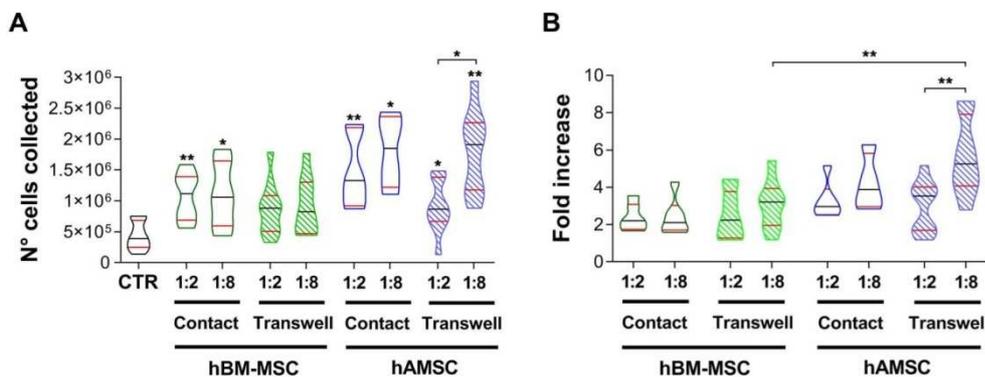


Figura 12: Effetti delle hAMSC sull'espansione ex vivo delle HSC del sangue del cordone ombelicale (cellule CB-HSC). Le co-culture sono state eseguite con cellule HSC e BM-MSC (verdi) o hAMSC (blu) a due diversi rapporti CD34 + : MSC (1:2 e 1:8), in contatto cellula-cellula (vuoto) o in transwell (linee oblique) per sette giorni in terreno senza siero integrato con un cocktail di citochine composto da SCF, Flt3-L e TPO. La condizione di controllo, indicata come CTR, è rappresentativa dell'espansione ex vivo in assenza di uno strato di alimentazione. I risultati sono espressi come A) numero totale di cellule raccolte dopo 7 giorni di espansione ex vivo o B) come aumento in fold change del numero totale di cellule raccolte dopo 7 giorni di co-cultura con MSC rispetto al controllo (CTR). I dati sono rappresentati come media \pm SD (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$) da ≥ 4 esperimenti indipendenti.

c. Le hAMSC sono in grado di espandere sia le short-term che long-term HSC (Figura 13)

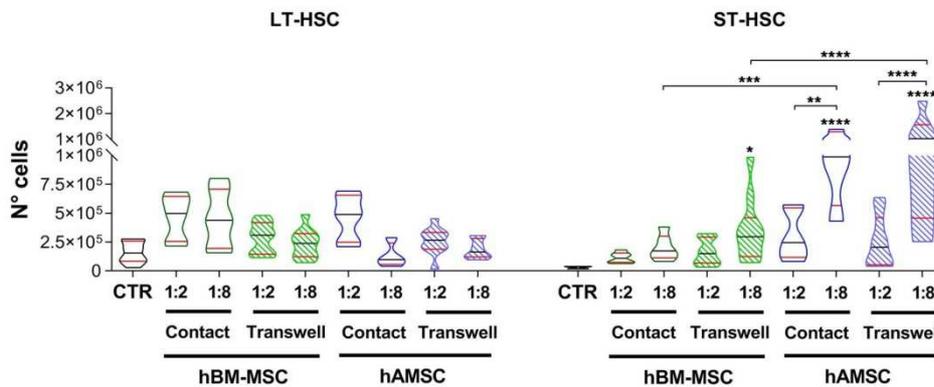


Figura 13: Sottopopolazioni HSC: le cosiddette long-term (LT-HSC) e short term (ST-HSC). Le co-culture sono state eseguite con cellule CD34 + e BM-MSC (verdi) o hAMSC (blu) a due diversi rapporti CD34 +: MSC (1:2 e 1:8), in contatto cellula-cellula (vuoto) o in transwell (linee oblique), per sette giorni in terreno privo di siero integrato con un cocktail di citochine (SCF, Flt3-L e TPO). La condizione di controllo, indicata come CTR, rappresenta l'espansione ex vivo in assenza di MSC. I risultati sono espressi come numero totale di LT-HSC (CD34 + CD38-CD133 +) e ST-HSC (CD34 + CD38 + CD133-) normalizzati alla quantità totale di cellule CD34 + dopo 7 giorni di co-cultura. I dati sono rappresentati come media \pm SD (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$) da ≥ 4 esperimenti indipendenti.

d. Le hAMSC supportano l'espansione delle cellule ematopoietiche progenitrici (HPC, hematopoietic progenitor cells) e di quelle più "committed" (Figura 14)

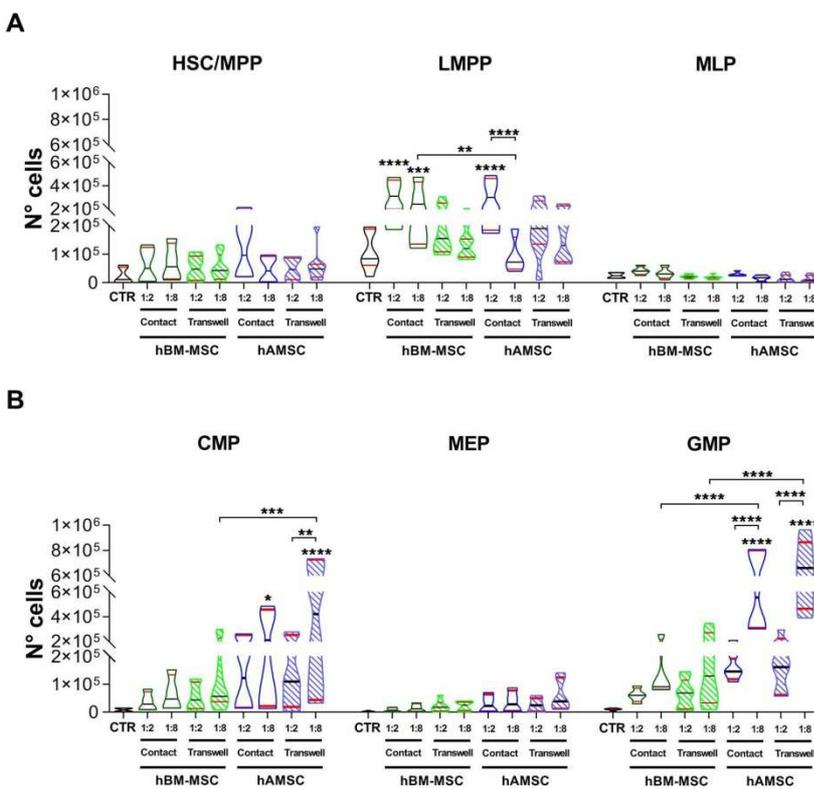


Figura 14: HSC e sottopopolazioni di cellule progenitrici ematopoietiche (HPC). Le co-culture sono state eseguite con cellule CD34 + e BM-MSC (verdi) o hAMSC (blu) ciascuna a due diversi rapporti CD34 +: MSC (1:2 e 1:8), a contatto cellula-cellula (vuoto) o in transwell (linee oblique) per sette giorni in terreno privo di siero integrato con un cocktail di citochine (SCF, Flt3-L e TPO). La MSC sono state analizzate per i loro effetti sull'impegno verso A) diverse HPC primitive (HSC/MPP, LMPP, MLP) e B) su HPC "committed" (CMP, MEP e GMP). I dati sono rappresentati come media \pm SD (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$) da ≥ 4 esperimenti indipendenti. Abbreviazioni: cellule staminali ematopoietiche (HSC); progenitore multipotente (MPP); MPP innescato da linfoidi (LMPP); progenitore multi linfoide (MLP); progenitore mieloide comune (CMP); progenitore granulocitico monocitico (GMP); progenitore dei megacariociti-eritrociti (MEP).

e. Le hAMSC supportano la capacità clonogenica delle cellule progenitrici CB (Figura 15)

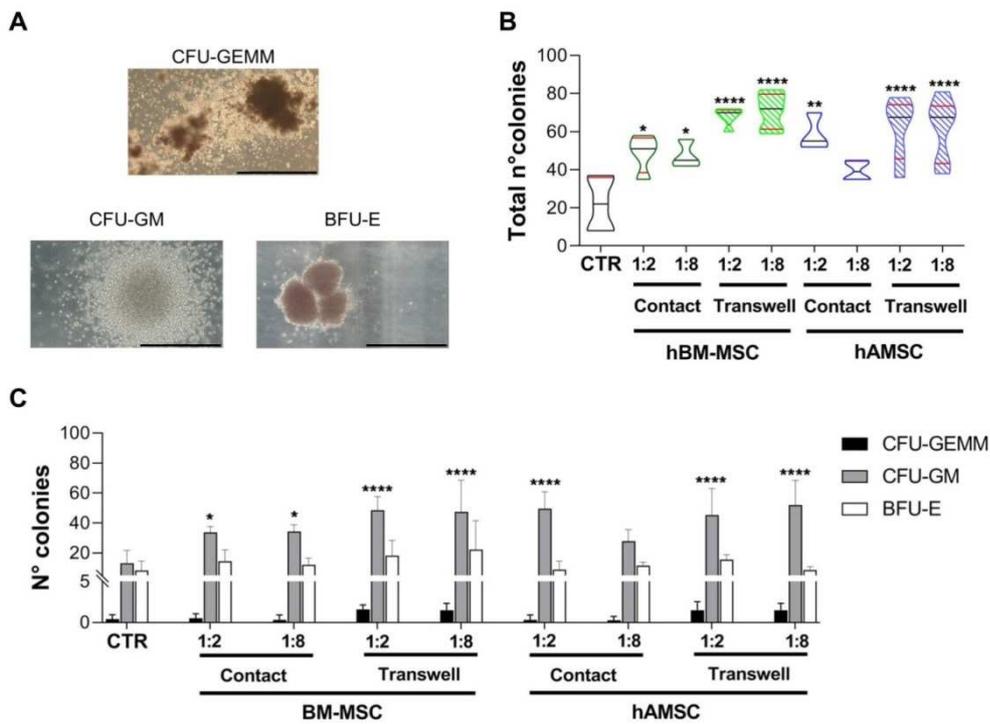


Figura 15: Effetti delle hAMSC sulla capacità clonogenica delle cellule CD34 + del sangue cordonale (cellule CB-CD34 +). Le cellule CD34 + sono state espanse ex vivo per 7 giorni nelle diverse condizioni di coltura nel terreno Methocult™. Il numero totale e i diversi tipi di colonie ottenute sono stati contati dopo 14 giorni. A) Rappresentazione di ogni tipo di colonia identificato; B) Il grafico rappresenta il numero di unità formanti colonie con le diverse condizioni di coltura cellulare; C) Il grafico rappresenta il numero di ciascuna unità formante colonia dopo 14 giorni di coltura nel terreno Methocult™. I dati sono rappresentati come media \pm SD (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$) da ≥ 4 esperimenti indipendenti. Abbreviazioni: CTR, control o No feeder layer; BFU-E, burst forming unit - eritroide; CFU-GM, unità formante colonie - granulociti, macrofagi; CFU-GEMM, unità formante colonie - granulociti, eritrociti, macrofagi, megacariociti.

4) Valutazione dell'effetto delle cellule mesenchimali amniotiche sul processo infiammatorio che innesca lo sviluppo di fibrosi polmonare, in un modello di lesione polmonare indotto da bleomicina *in vivo*.

In uno studio precedente (vedi report scientifico del 2018) finalizzato a studiare, in un modello di fibrosi polmonare indotta nel topo mediante bleomicina, l'azione delle cellule mesenchimali amniotiche sul processo infiammatorio polmonare, abbiamo dimostrato che il trattamento con cellule mesenchimali amniotiche (hAMSC) riduce il processo infiammatorio polmonare indotto da bleomicina e in concomitanza riduce il processo fibrotico. Nello specifico il trattamento con hAMSC riduce, rispetto agli animali non trattati, l'accumulo di linfociti B e la formazione di aggregati linfocitari nel tessuto polmonare [Cargnoni et al, Stem Cells Transl Med 2020].

Con l'intento di approfondire lo studio degli effetti esercitati dalle cellule amniotiche sul processo infiammatorio polmonare, durante il periodo dicembre 2019 - settembre 2020 abbiamo focalizzato la nostra ricerca sulla valutazione della possibile capacità delle cellule mesenchimali amniotiche di indurre nel tessuto polmonare macrofagi con attività anti-infiammatoria in grado cioè di promuovere la risoluzione dell'infiammazione piuttosto che promuoverne l'insacco. Molti studi, infatti, hanno suggerito che i macrofagi possano avere un ruolo di fondamentale importanza nella risoluzione dell'infiammazione polmonare, bloccandone la cronicizzazione e la sua evoluzione in processo fibrotico. Inoltre, studi condotti *in vitro* dal CREM, hanno dimostrato la capacità delle cellule mesenchimali amniotiche di promuovere la polarizzazione da macrofagi M1 (con attività pro-infiammatoria) verso M2 (macrofagi ad azione anti-infiammatoria) (Magatti et al. 2017).

Abbiamo quindi ipotizzato che anche *in vivo*, nel modello di fibrosi polmonare indotto da bleomicina, il trattamento con cellule mesenchimali amniotiche potesse indurre la differenziazione dei macrofagi verso un fenotipo ad attività anti-infiammatoria riducendo in questo modo anche l'evolversi del danno fibrotico.

In particolare, i macrofagi ad attività anti-infiammatoria che in letteratura sono proposti come macrofagi con possibili effetti benefici nel ridurre la progressione della fibrosi polmonare sono:

- 1) i macrofagi M2 (Tan et al. 2014)
- 2) i macrofagi positivi per SPARC (Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich) (Savani et al. 2000, Sangaletti et al. 2011) e
- 3) i nerve-associated macrofagi (NAM) oppure macrofagi CD169 positivi (Ural et al. 2020)

Allo scopo di identificare le diverse popolazioni macrofagiche nel tessuto polmonare di topi, nel periodo dicembre 2019 - settembre 2020 abbiamo messo a punto le tecniche di immunohistochimica per identificare macrofagi M1 e M2, macrofagi SPARC positivi e macrofagi CD169 positivi.

Lo sforzo è stato quello di poter evidenziare in una stessa sezione di tessuto sia la presenza di macrofagi con azione pro-infiammatoria (M1) sia quelli ad azione anti-infiammatoria (M2, oppure SPARC positivi, oppure CD169 positivi). Dapprima per identificare le diverse popolazioni di macrofagi esprimenti i diversi marcatori (iNOS per identificare i macrofagi M1, Arg1 per i macrofagi M2, CD169 per i macrofagi NAM e SPARC) abbiamo applicato l'immunofluorescenza, ma data l'elevata autofluorescenza del tessuto polmonare non siamo stati in grado di avere risultati accettabili. In un secondo tempo abbiamo allora applicato la tecnica immunohistochimica che usando rilevatori non fluorescenti ci ha dato risultati soddisfacenti e siamo stati in grado di realizzare una doppia immunohistochimica sulla stessa sezione polmonare allo scopo di poter evidenziare l'eventuale effetto delle cellule mesenchimali amniotiche su tutte queste popolazioni macrofagiche. Esempi dei risultati ottenuti sono riportati nelle figure (Figure 16-19) qui di seguito.

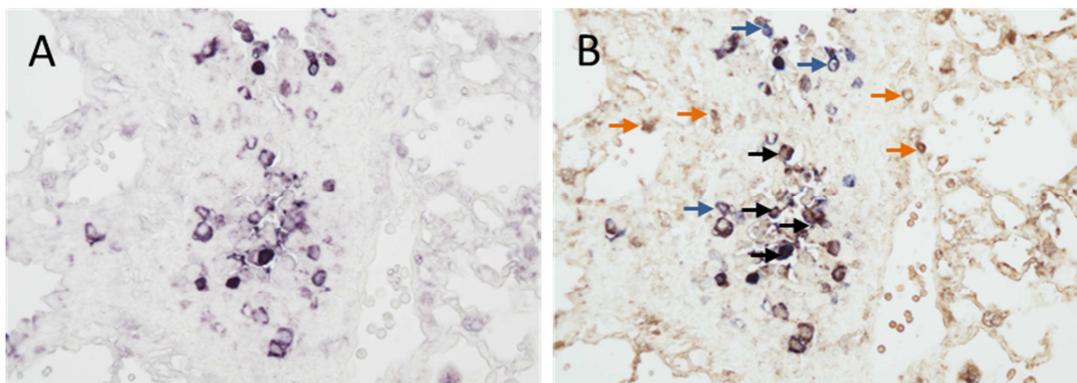


Figura 16: L'immunoistochimica effettuata su una sezione polmonare di topo, identifica nel pannello A i macrofagi M1 caratterizzati dall'espressione di iNOS (in blu). La doppia immunoistochimica (effettuata per iNOS e SPARC) identifica nel pannello B tre popolazioni di macrofagi: i macrofagi che esprimono iNOS (frecche blu), i macrofagi che esprimono SPARC (frecche marrone chiaro) e macrofagi che esprimono sia iNOS che SPARC (frecche nere).

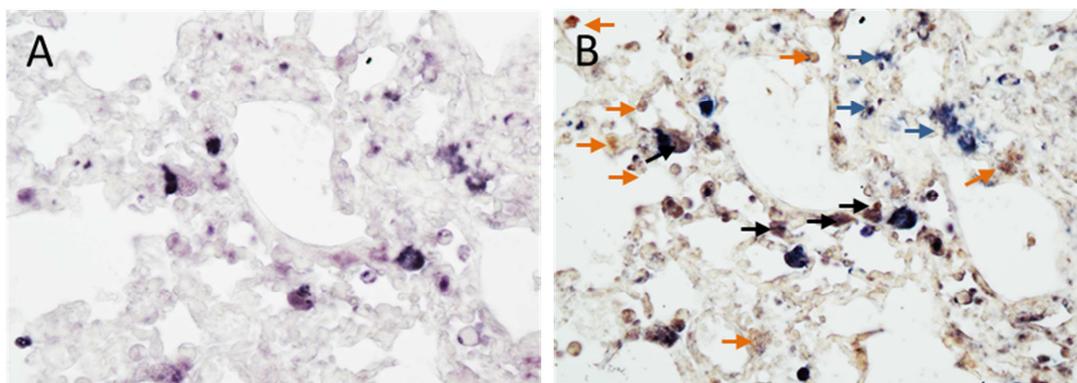


Figura 17: L'immunoistochimica effettuata su una sezione polmonare di topo, identifica nel pannello A i macrofagi M2 caratterizzati dall'espressione di Arg1 (in blu). La doppia immunoistochimica (effettuata per Arg1 e SPARC) identifica nel pannello B tre popolazioni di macrofagi: i macrofagi che esprimono Arg1 (frecche blu), i macrofagi che esprimono SPARC (frecche marrone chiaro) e macrofagi che esprimono sia Arg1 che SPARC (frecche nere).

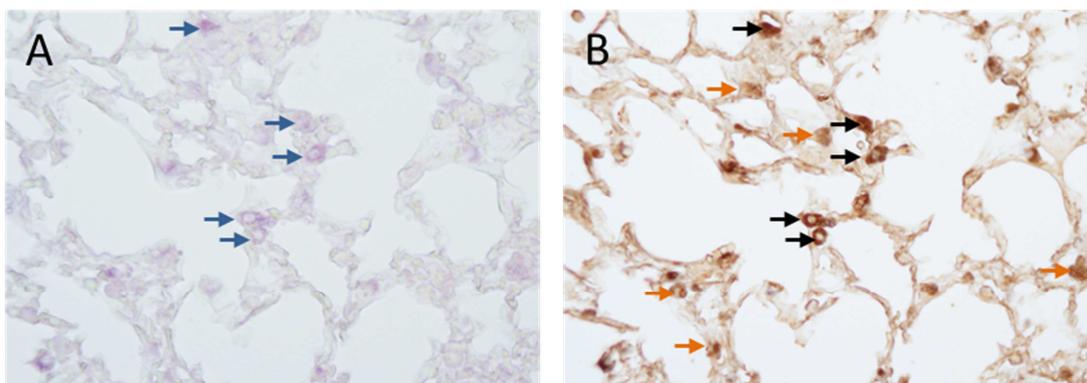


Figura 18: L'immunoistochimica effettuata su una sezione polmonare di topo, identifica nel pannello A i macrofagi M1 caratterizzati dall'espressione di iNOS (frecche blu). La doppia immunoistochimica (effettuata per iNOS e CD169) identifica nel pannello B due popolazioni di macrofagi: i macrofagi che esprimono CD169 (frecche marrone chiaro) e macrofagi che esprimono sia iNOS che CD169 (frecche nere). E' da notare che nella doppia immunoistochimica (pannello B) non si osservino macrofagi solo iNOS positivi.

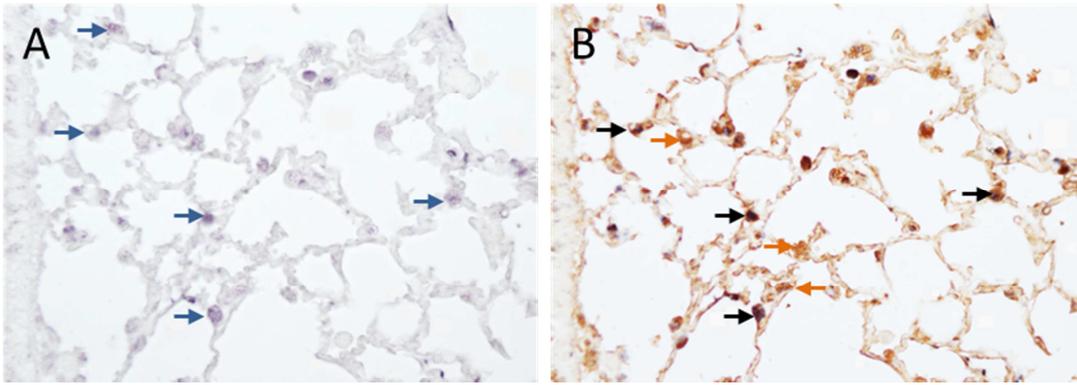


Figura 19: L'immunohistochimica effettuata su una sezione polmonare di topo, identifica nel pannello A i macrofagi M2 caratterizzati dall'espressione di Arg1 (freccie blu). La doppia immunohistochimica (effettuata per Arg1 e CD169) identifica nel pannello B due popolazioni di macrofagi: i macrofagi che esprimono CD169 (freccie marrone chiaro) e macrofagi che esprimono sia Arg1 che CD169 (freccie nere). E' da notare che nella doppia immunohistochimica (pannello B) non si osservino macrofagi solo Arg1 positivi.

CONCLUSIONI & SVILUPPI FUTURI

1) Studio sulle proprietà immunomodulatorie delle cellule amniotiche e del loro secretoma e meccanismi coinvolti. Gli studi finanziati dal 5x1000 hanno permesso di mostrare che i fattori secreti dalle cellule isolate dalla regione mesenchimale dell'amnion (hAMSC), ma anche da frammenti di membrana amniotica stessa, presentano un'azione immunomodulatoria nei confronti di diverse cellule infiammatorie. Nonostante alcuni di questi fattori siano stati identificati, capire quali siano quelli realmente coinvolti nelle proprietà immunomodulatorie necessita ancora di ulteriori studi. Inoltre sarà importante approfondire lo studio dei meccanismi, e delle vie molecolari che sono attivate o inibite durante l'azione immunomodulatoria. Ancora molto lavoro deve essere effettuato per disporre sia delle tecniche necessarie per valutare il flusso autofagico sia delle condizioni di coltura che riproducano i diversi microambienti di stress e patologici per studiare i loro effetti sulle proprietà immunomodulatorie e l'autofagia delle cellule mesenchimali amniotiche.

2) Studio delle proprietà anti-tumorali delle cellule amniotiche

Gli studi finanziati dal 5x1000 hanno permesso di iniziare a studiare le interazioni fra le hAMSC e le cellule del microambiente tumorale che contribuisce fortemente alla progressione tumorale. Gli studi futuri saranno mirati a mettere a punto le condizioni di differenziamento dei fibroblasti e successivamente a valutare l'efficacia delle hAMSCs nel ridurre la componente stromale favorente la crescita tumorale (CAF).

3) Studio delle potenziali applicazioni delle cellule amniotiche correlate al trapianto di cellule staminali emopoietiche

Gli studi finanziati dal 5x1000 hanno permesso di mostrare che le hAMSC rappresentano una fonte alternativa a quelle derivate da midollo osseo nel favorire l'espansione ex vivo di cellule staminali emopoietiche e dei progenitori ematopoietici. Le hAMSC hanno l'ulteriore vantaggio che provengono da placenta umana dopo il parto e quindi sono facilmente disponibile senza ricorrere a procedure invasive.

4) Valutazione dell'effetto delle cellule mesenchimali amniotiche sul processo infiammatorio che innesca lo sviluppo di fibrosi polmonare, in un modello di lesione polmonare indotto da bleomicina *in vivo*.

Gli studi finanziati dal 5x1000 hanno permesso di mettere a punto le tecniche di immunohistochimica che ci permettono di identificare in una sezione di tessuto polmonare di topo le popolazioni di macrofagi con attività pro-infiammatoria e quelli con attività anti-infiammatoria. Al momento stiamo applicando questa tecnica su tessuti polmonari ottenuti da topi instillati con bleomicina che sono stati trattati con cellule mesenchimali amniotiche (gruppo Bleo+hAMSC) oppure che hanno ricevuto solo soluzione fisiologica (Bleo+PBS) che rappresenta il gruppo di controllo non trattato con hAMSC. Mediante la tecnica di immunohistochimica potremo valutare se il trattamento con hAMSC sia in grado di ridurre l'accumulo di macrofagi nel tessuto polmonare indotto da bleomicina e di modificare il fenotipo dei macrofagi polmonari promuovendone il differenziamento verso un fenotipo con attività anti-infiammatoria.

REFERENZE CITATE

1. Dong, C., D. D. Yang, C. Tournier, A. J. Whitmarsh, J. Xu, R. J. Davis and R. A. Flavell (2000). "JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation." *Nature* 405(6782): 91-94.
2. Dong, C., D. D. Yang, M. Wysk, A. J. Whitmarsh, R. J. Davis and R. A. Flavell (1998). "Defective T Cell Differentiation in the Absence of Jnk1." *Science* 282(5396): 2092.
3. Magatti, M., E. Vertua, S. De Munari, M. Caro, M. Caruso, A. Silini, M. Delgado and O. Parolini (2017). "Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features." *J Tissue Eng Regen Med* 11(10): 2895-2911.
4. Owen, D. L. and M. A. Farrar (2017). "STAT5 and CD4 (+) T Cell Immunity." *F1000Res* 6: 32.
5. Papait, A., F. R. Stefani, A. Cargnoni, M. Magatti, O. Parolini and A. R. Silini (2020). "The Multifaceted Roles of MSCs in the Tumor Microenvironment: Interactions With Immune Cells and Exploitation for Therapy." *Front Cell Dev Biol* 8: 447.
6. Pianta, S., P. Bonassi Signoroni, I. Muradore, M. F. Rodrigues, D. Rossi, A. Silini and O. Parolini (2015). "Amniotic membrane mesenchymal cells-derived factors skew T cell polarization toward Treg and downregulate Th1 and Th17 cells subsets." *Stem Cell Rev* 11(3): 394-407.
7. Sangaletti, S., C. Tripodo, B. Cappetti, P. Casalini, C. Chiodoni, S. Piconese, A. Santangelo, M. Parenza, I. Arioli, S. Miotti and M. P. Colombo (2011). "SPARC oppositely regulates inflammation and fibrosis in bleomycin-induced lung damage." *Am J Pathol* 179(6): 3000-3010.
8. Savani, R. C., Z. Zhou, E. Arguiri, S. Wang, D. Vu, C. C. Howe and H. M. DeLisser (2000). "Bleomycin-induced pulmonary injury in mice deficient in SPARC." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(4): L743-750.
9. Saxton, R. A. and D. M. Sabatini (2017). "mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease." *Cell* 168(6): 960-976.
10. Tan, J. L., S. T. Chan, E. M. Wallace and R. Lim (2014). "Human amnion epithelial cells mediate lung repair by directly modulating macrophage recruitment and polarization." *Cell Transplant* 23(3): 319-328.
11. Ural, B. B., S. T. Yeung, P. Damani-Yokota, J. C. Devlin, M. de Vries, P. Vera-Licona, T. Samji, C. M. Sawai, G. Jang, O. A. Perez, Q. Pham, L. Maher, P. Loke, ng, M. Dittmann, B. Reizis and K. M. Khanna (2020). "Identification of a nerve-associated, lung-resident interstitial macrophage subset with distinct localization and immunoregulatory properties." *Science Immunology* 5(45): eaax8756.

DIVULGAZIONE**Manoscritti Pubblicati:**

Železnik Ramuta T, Jerman UD, Tratnjek L, Janev A, Magatti M, Vertua E, Bonassi Signoroni P, Silini A, Parolini O, Erdani Kreft M.

The cells and extracellular matrix of human amniotic membrane hinder the growth and invasive potential of bladder urothelial cancer cells.

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Section of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Accepted October 2020. In press.

Cargnoni A, Romele P, Bonassi Signoroni P, Farigu S, Magatti M, Vertua E, Toschi I, Cesari V, Silini AR, Stefani FR, Parolini O.

Amniotic MSCs reduce pulmonary fibrosis by hampering lung B-cell recruitment, retention, and maturation. Stem Cells Transl Med. 2020 Sep;9(9):1023-1035. doi: 10.1002/sctm.20-0068.

Papait A, Stefani FR, Cargnoni A, Magatti M, Parolini O, Silini AR.

The Multifaceted Roles of MSCs in the Tumor Microenvironment: Interactions With Immune Cells and Exploitation for Therapy.

Front Cell Dev Biol. 2020 Jun 19;8:447. doi: 10.3389/fcell.2020.00447.

Magatti M, Masserdotti A, Bonassi Signoroni P, Vertua E, Stefani FR, Silini AR, Parolini O.

B Lymphocytes as Targets of the Immunomodulatory Properties of Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells.

Front Immunol. 2020 Jun 9;11:1156. doi: 10.3389/fimmu.2020.01156.

Ragni E, Perucca Orfei C, Silini AR, Colombini A, Viganò M, Parolini O, de Girolamo L.

miRNA Reference Genes in Extracellular Vesicles Released from Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Stromal Cells.

Pharmaceutics. 2020 Apr 11;12(4):347. doi: 10.3390/pharmaceutics12040347.