



Relazione attività di ricerca svolta nel I anno del progetto:

“CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA CORDONE OMBELICALE (HUCMS) MICRO-INCAPSULATE COME ALTERNATIVA ALLA TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA CONVENZIONALE NEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO (LES): STUDIO IN VITRO ED IN VIVO”

Coordinatore Scientifico: Alessia Alunno,
SSD Reumatologia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale,
Università degli Studi di Perugia, via Enrico dal Pozzo, 06122, Perugia

Il presente studio si prefigge quale obiettivo primario lo studio degli effetti immunomodulatori delle hUCMS sulle diverse sottopopolazioni T cellulari coinvolte nella patogenesi del lupus eritematoso sistemico (LES) allo scopo di utilizzarle per scopi terapeutici nei pazienti affetti da tale patologia. Nel primo anno di svolgimento del progetto sono stati effettuati gli esperimenti di seguito dettagliati.

- Isolamento, conservazione ed incapsulamento delle cellule staminali mesenchimali della gelatina di Wharton del cordone ombelicale (hUCMS).

Le hUCMS necessarie ad allestire le colture per il presente studio sono state isolate da cordone ombelicale prelevato in seguito a taglio cesareo seguendo il protocollo del gruppo di ricerca del professor Calafiore. Dopo essere stato raccolto, il cordone ombelicale è stato lavato con phosphate Dulbecco buffered saline (PBS) arricchito di antibiotici e successivamente è stato tagliato in parti di circa 10 cm di lunghezza chiuse da ambo i lati con punti di sutura (Figura 1).

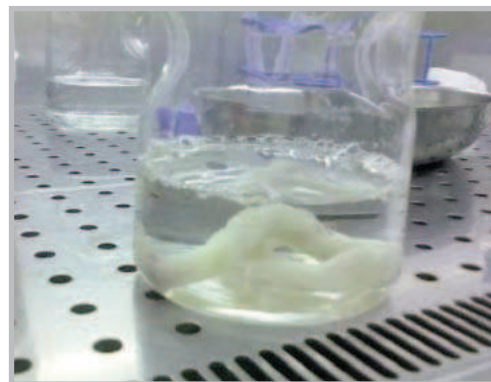


Figura 1: Cordone ombelicale in PBS

Per digerire i pezzetti di cordone così ottenuti, nella gelatina di Wharton è stata iniettata una soluzione costituita da 77mM NaCl, 0.1mg/mL di albumina sierica bovina (BSA; Biochrom; Biopsa), 1.5mg/mL di ialuronidasi (Sigma), 0.5mg/mL di Liberase Purified Enzyme Blend (Liberase™ HI; Roche), in 0.02M di buffer fosfato preriscaldato a 37°C. Dopo l'iniezione i segmenti di cordone ombelicale sono stati posti in un recipiente di vetro con 40mL di soluzione digestiva in agitazione a 37°C per 30



minuti. Alla fine del processo di digestione, il preparato è stato posto in ghiaccio per poter rimuovere vene e arterie ombelicali. Dopo la digestione, il tessuto è stato centrifugato a 1500 rpm per 5 minuti a 4°C ed è poi stato risospeso in DMEM con antibiotici. Per rimuovere i globuli rossi residui, è stata eseguita una centrifugazione su gradiente Lymphoprep a 1850 rpm per 20 minuti a 4°C. Le hUCMS recuperate dal gradiente sono state lavate in medium DMEM e piastrate alla concentrazione di 6000–8000/cm² in fiasche con medium a basso contenuto di siero. Dopo 24 ore dall'isolamento, alle fiasche di coltura sono stati aggiunti EGF (1 ng/mL; Peprotech, LiStarFish) e PDGF-BB (10 ng/mL; Peprotech) dopodiché le cellule sono state mantenute in coltura a 37°C in ambiente umidificato al 95%. Per l'allestimento delle co-culture sono quindi state utilizzate sia hUCMS libere che hUCMS incapsulate. Le hUCMS libere sono state conservate in azoto liquido fino al loro utilizzo. Quindi, una volta scongelate, una parte di cellule è stata incapsulata all'interno di una matrice di alginato. La procedura di microincapsulamento è schematizzata in Figura 2.

Dopo aver staccato le cellule dalle fiasche di coltura con tripsina 0.05%, al pellet formato dalle cellule è aggiunto alginato di sodio all'1,8% in soluzione fisiologica. L'alginato preparato presso i laboratori del Prof. Riccardo Calafiore è *clinical grade*, cioè ha un contenuto di endotossine inferiore a 0.5 EU/ml, in conformità con le raccomandazioni della FDA (Food and Drug Administration) riguardo agli alginati da utilizzare nei trapianti destinati all'uomo. Prima di aggiungere l'alginato, è necessario risospingere accuratamente il pellet al fine di evitare che l'ago impiegato per preparare le capsule venga occluso. L'alginato viene aggiunto alle cellule secondo la seguente proporzione: 2ml di alginato ogni 0,2ml di materiale cellulare. Una speciale cannula da 14G, collegata ad una pompa peristaltica, precedentemente settata ad un flusso di 5ml/min e flusso dell'aria di 3nl/min (fig. 3A), viene introdotta nel tubo da 50ml contenente la soluzione di pelleted alginato che deve essere agitata spesso per evitare che gli aggregati sedimentino sul fondo del tubo e quindi, la distribuzione delle cellule nelle capsule non sia omogenea. Sfruttando la pompa, la soluzione viene fatta passare attraverso un microdropper generator, cioè un ago speciale (fig. 3B) dove, attra-

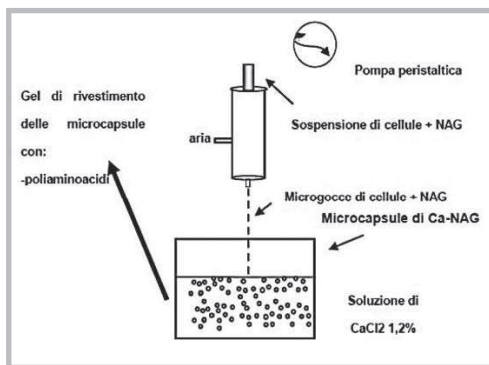


Figura 2 Schema semplificato del sistema per la produzione di microcapsule

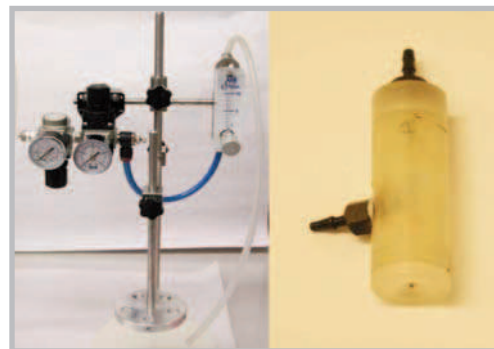


Figura 3 A) Generatore di microcapsule. B) Microdropper Generator.





verso l'azione di un flusso d'aria costante, si realizza la suddivisione in microgocce che cadono in un beaker, contenente una soluzione allo 1,2% di CaCl_2 (circa 100ml), posizionato sotto lo stesso.

Quando vengono a contatto con la soluzione di CaCl_2 , le microgocce di alginato di sodio gelificano istantaneamente per scambio fra ioni sodio e ioni calcio producendo delle microcapsule di diametro pari a $450\mu\text{m}$ in media (fig.4). Per i nostri esperimenti si utilizzano 3000000 di cellule per 1ml di alginato. Le hUCMS sono così inglobate nelle microcapsule che vengono lasciate in CaCl_2 per 5'. Trascorsi questi minuti, si elimina la soluzione di CaCl_2 sostituendola con soluzione fisiologica. Poi si trasferiscono le capsule in provette da 50ml e si effettua un lavaggio con soluzione fisiologica, lasciandole decantare per gravità ed eliminando quindi, il sovrantante. Si aggiunge poi una quantità di poli-L-ornitina (PLO), preparata allo 0,12% in soluzione fisiologica, pari al doppio del volume occupato dalle capsule, procedendo a far oscillare il tubo su di un piatto oscillante per 12'. Si eseguono due lavaggi con soluzione fisiologica in modo da eliminare tutta la PLO in eccesso, si aggiunge l'alginato 0,18% e si pone il campione in oscillazione per 10': così si completa il rivestimento esterno in

alginato delle capsule. Infine, si risospescono le capsule in terreno di coltura completo (NM) e, dopo osservazione al microscopio, sono mantenute in incubatore a 37°C , 5% CO_2 per 24 h. Il terreno viene o completamente sostituito da terreno fresco dopo 1 giorno in coltura: ciò è particolarmente importante per rimuovere l'eventuale PLO ancora presente nel medium che non si è integrata nelle capsule. La Figura illustra le hUCMS incapsulate in confronto alle hUCMS libere.

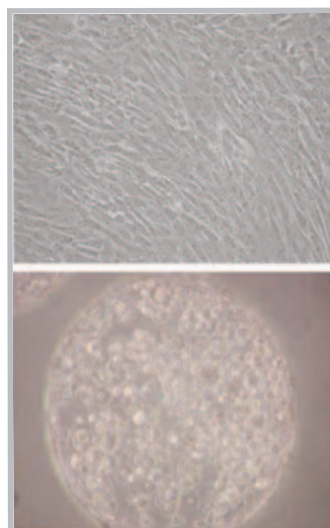


Figura 5 hUCMS libere (in alto) e microincapsulate (in basso)

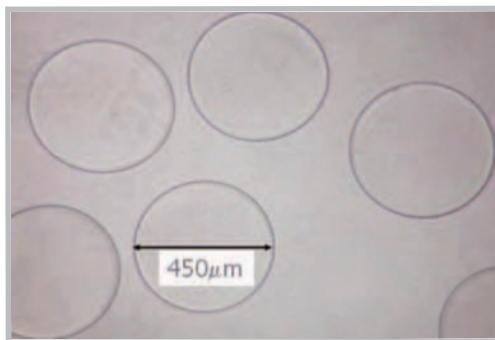


Figura 4 Microcapsule di NAG di diametro medio pari a $450\mu\text{m}$

Il giorno precedente all'allestimento delle co-colture, le CpS-hUCMS sono state attivate mediante incubazione overnight con 300U/ml $\text{IFN-}\gamma$ in accordo alla letteratura. Questo veniva rimosso il mattino successivo mediante lavaggio e risospensione in medium fresco prima di allestire le co-colture con PBMC.





- *Ottimizzazione del protocollo di co-cultura in vitro di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di donatori sani e cellule staminali mesenchimali della gelatina di Wharton del cordone ombelicale (hUCMS).*

Le PBMC sono state isolate da sangue periferico di volontari sani previo ottenimento di consenso informato scritto. Il sangue è stato diluito 1:2 con soluzione fisiologica sterile, stratificato su Ficoll-Hypaque e centrifugato per 25 minuti a 1600 rpm in modo che le PBMC si accumulino a livello dell'interfaccia tra polimero e componente liquida del sangue. Una volta recuperate, le PBMC sono state lavate tramite due centrifugazioni successive di 15 minuti in PBS. Dopo i lavaggi, le PBMC sono state contaminate e portate alla concentrazione d'uso con medium RPMI 1640 completo.

Successivamente, le PBMC sono state colorate con un colorante fluorescente, il CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl ester) e sono state messe in coltura con biglie rivestite di anti-CD3/anti-CD28 al fine di attivare le cellule T. La colorazione con il CFSE permette di valutare la proliferazione delle PBMC marcate. Durante la divisione cellulare, infatti, ogni cellula figlia eredita una quantità di CFSE che corrisponde esattamente alla metà di

quella presente nella cellula madre, quindi la sua fluorescenza sarà la metà rispetto a quella della cellula da cui deriva. Ad ogni successiva divisione il livello di fluorescenza si dimezza, permettendo così di monitorare, tramite citofluorimetria, il numero di divisioni cellulari. Sono quindi state allestite co-culture con diversi rapporti scalari tra PBMC e hUCMS, da 1:1 a 10000:1 (PBMC:hUCMS). Sono state allestite co-culture sia con hUCMS libere che incapsulate che libere con interposizione di un *transwell* al fine di valutare se fosse necessario o meno il contatto diretto tra le hUCMS e le PBMC. Sono state allestite, contemporaneamente, colture di controllo con le singole PBMC stimulate e non stimulate con le biglie rivestite di anti-CD3/anti-CD28. Per valutare la proliferazione delle PBMC nelle co-culture e nelle colture di controllo, al quinto giorno di coltura è stata analizzata la diluizione di CFSE al citofluorimetro. Negli esperimenti effettuati abbiamo osservato che le hUCMS libere sono state in grado di inibire la proliferazione delle PBMC rispetto al controllo stimolato e questa inibizione è risultata essere più efficace nei rapporti in cui il numero di PBMC era maggiore (Figura 6). Dai risultati ottenuti dalle co-

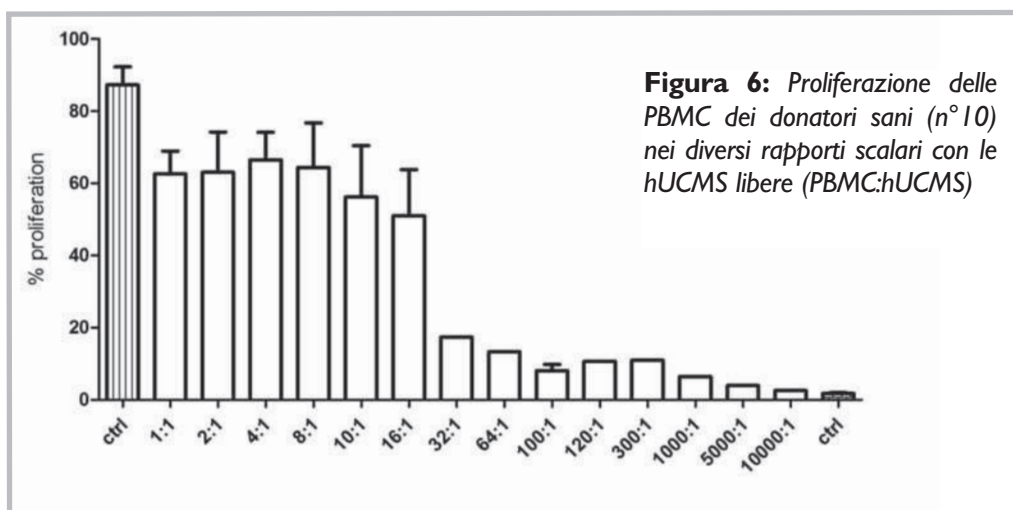


Figura 6: Proliferazione delle PBMC dei donatori sani (n°10) nei diversi rapporti scalari con le hUCMS libere (PBMC:hUCMS)





colture delle PBMC di donatori sani con le hUCMS libere si È deciso di utilizzare i rapporti 1:10, 1:50 e 1:100 per le co-colture con le hUCMS incapsulate (CpShUCMS). Anche in questo caso abbiamo osservato lo stesso trend (Figura 7), cioè una riduzione della proliferazione che, come accaduto con le hUCMS libere, risultava essere più efficace nei rapporti in cui il numero di PBMC era maggiore

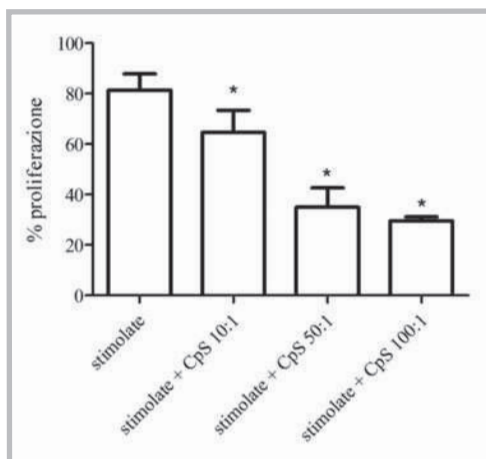


Figura 7: Proliferazione delle PBMC dei donatori sani ($n^{\circ}10$) nei diversi rapporti scalari con le hUCMS incapsulate (PBMC:CpShUCMS)

-Allestimento di esperimenti di co-cultura in vitro di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di pazienti affetti da LES e cellule staminali mesenchimali della gelatina di Wharton del cordone ombelicale (hUCMS).

Sono stati arruolati nello studio 10 pazienti affetti da LES e, previo ottenimento di consenso informato scritto, è stato effettuato un prelievo di sangue periferico per isolare le PBMC come precedentemente illustrato. Una volta isolate, le PBMC sono state colorate con CFSE e messe in coltura con biglie rivestite di anti-CD3/anti-CD28 al fine di attivare le cellule T. Sono quindi state allestite co-colture con le hUCMS libere

secondo i rapporti PBMC:hUCMS stabiliti in seguito agli esperimenti eseguiti con le PBMC di soggetti sani. Sono state allestite, contemporaneamente, colture di controllo con le singole PBMC stimolate e non stimolate con le biglie rivestite di anti-CD3/anti-CD28. Per valutare la proliferazione delle PBMC nelle co-colture e nelle colture di controllo, al quinto giorno è stata analizzata la diluizione di CFSE al citofluorimetro. Come illustrato in Figura 8, le hUCMS libere si sono rivelate incapaci di inibire la proliferazione delle PBMC isolate da pazienti affetti da LES.

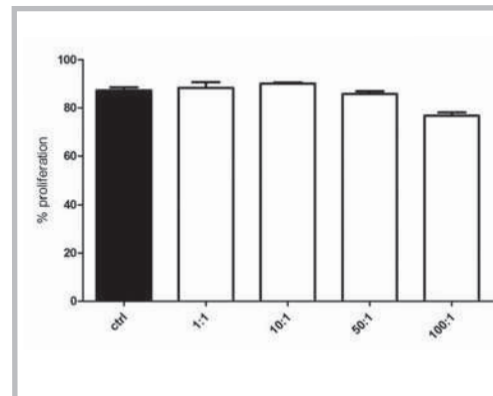


Figura 8: Proliferazione delle PBMC dei pazienti affetti da LES ($n^{\circ}10$) nei diversi rapporti scalari con le hUCMS libere (PBMC:hUCMS)

Nelle co-colture con le hUCMS incapsulate (CpS-hUCMS), invece, abbiamo osservato una inibizione della proliferazione delle PBMC dei pazienti. Questa inibizione è risultata essere più efficace nei rapporti in cui il numero di PBMC era maggiore risultando significativa ($p<0.05$) solo nel rapporto 100:1 (Figura 9).

Dai dati ottenuti, si può concludere che l'attività soppressiva delle hUCMS viene indebolita quando sono messe a contatto diretto con le PBMC dei pazienti affetti da



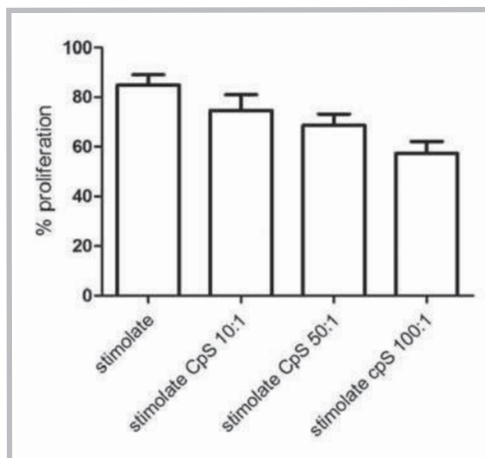


Figura 9: Proliferazione delle PBMC dei pazienti affetti da LES (n° 10) nei diversi rapporti scalari con le hUCMS incapsulate (PBMC:CpShUCMS)

LES a differenza di quello che accade con le PBMC di donatori sani. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che i linfociti attivati dei pazienti presentano sulla loro superficie molecole diverse da quelle presenti nei linfociti di donatori sani e quindi possono instaurarsi interazioni ligando-recettore differenti da quelle che si verificano in presenza delle cellule dei donatori sani. Analogamente, in presenza delle PBMC dei pazienti è probabile che vengano attivate vie del segnale intracellulare alternative. Le PBMC raccolte dopo i 5 giorni di coltura sono state rissese in medium di congelamento e conservate a -80°C per successive le successive analisi fenotipiche.

- Valutazione della morfologia e della vitalità cellulare delle hUCMS libere e microincapsulate dopo co-coltura con le PBMC dei soggetti sani e dei pazienti affetti da LES

La valutazione della vitalità cellulare è eseguita con una tecnica basata sulla diversa capacità di due sonde fluorescenti, fluoresceina diacetato ed etidio bromuro, di

entrare all'interno delle cellule vive oppure morte. In particolare, la fluoresceina diacetato, dopo aver attraversato passivamente la membrana integra delle cellule vive, viene idrolizzata da esterasi aspecifiche citoplasmatiche, diventa fluorescente ed idrofila e si accumula all'interno della cellula. La sonda etidio bromuro, invece, essendo polare è incapace di attraversare la membrana plasmatica; quindi, solo se sono presenti danneggiamenti di membrana, essa è in grado di penetrare all'interno della cellula e giungere al nucleo, dove si intercala tra le basi azotate del DNA. Perciò, nel caso in cui la cellula sia viva si osserverà una fluorescenza verde, dovuta alla fluoresceina trattenuta all'interno della stessa, mentre si osserverà fluorescenza rossa, dovuta al legame dell'etidio bromuro al DNA, nel caso in cui la cellula sia necrotica. Al momento dell'uso si prepara una miscela con 2,5ml di soluzione di etidio bromuro (0,2mg/ml) in D-PBS e 12,5 μl di fluoresceina diacetato in acetone (5mg/ml). Si preleva un'aliquota di circa 100 μl di capsule, a cui si aggiungono 500 μl di miscela etidio bromuro/fluoresceina diacetato. Dopo aver aspirato la soluzione per la vitalità e lavato con soluzione fisiologica il campione, si procede all'osservazione al microscopio a fluorescenza. La valutazione delle hUCMS libere dopo 5 giorni di co-coltura con le PBMC dei soggetti sani e dei pazienti affetti da LES ha rivelato che esse mantengono la loro morfologia originale e non mostrano alcun segno di danno cellulare (Figure 10A-D). Tale riscontro suggerisce che le condizioni sperimentali non sono nocive per le hUCMS e pertanto la mancata inibizione della proliferazione delle hUCMS libere verso le PBMC dei pazienti affetti da LES non è dovuta ad anomalie delle hUCMS stesse. La vitalità dopo coltura delle CpS-hUCMS pretrattate con IFN- γ era sovrapponibile a quella registrata immediatamente dopo il microincapsula-





mento e a quella registrata dopo la stimolazione con IFN- γ subito prima dell'inizio della coltura (>95%) (Figure 10E ed F).

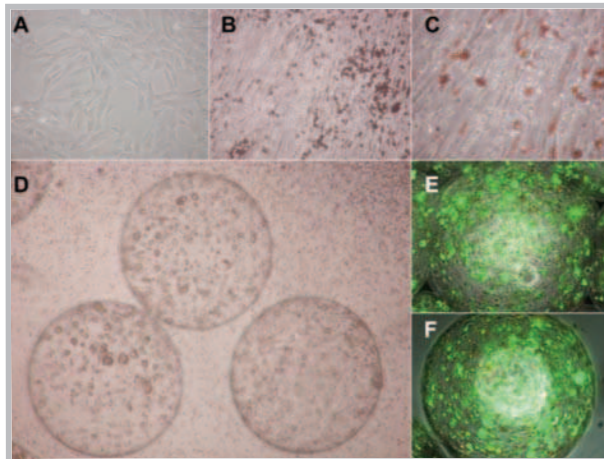
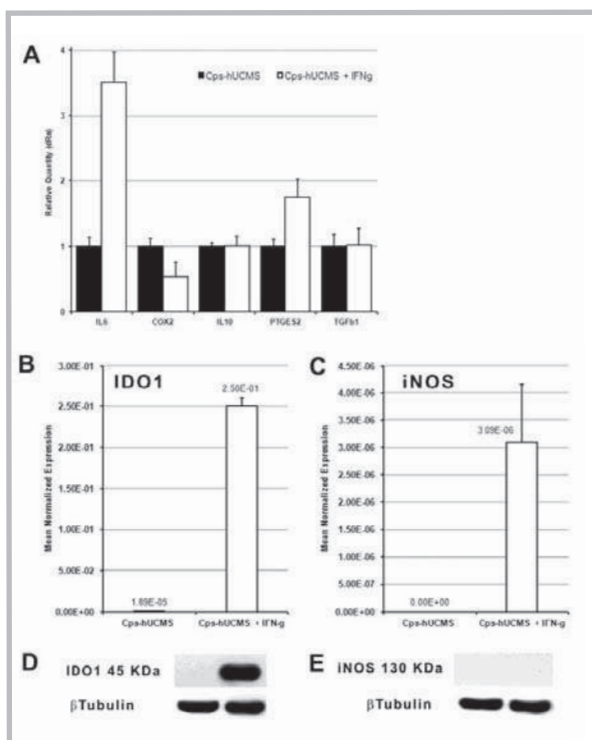


Figura 10: A) hUCMS prima della coltura (10x); B,C) hUCMS libere in co-coltura con le PBMC (10x e 40x rispettivamente) D) CpS-hUCMS in co-coltura con le PBMC. Vitalit  delle CpS-hUCMS prima (E) e dopo (F) co-coltura con le PBMC (entrambe 10x)



- L'attivit  soppressiva delle CpS-hUCMS   mediata almeno in parte dalla indoleamina 2,3 diossigenasi (IDO).

Per chiarire i motivi alla base della discrepanza osservata in relazione all'attivit  soppressiva delle hUCMS libere e incapsulate verso le PBMC dei pazienti affetti da LES, abbiamo proceduto a realizzare una valutazione in PCR e in western blotting delle hUCMS prima e dopo stimolazione con IFN- γ . Come mostrato in figura 11, l'espressione di TGF- β , IL-10 e COX-2 non si modificava mentre quella di PTGES2 era incrementata. Abbiamo altresì osservato un incremento significativo di IL-6 e IFN- γ . HLAG5 non era dosabile a livello di mRNA n  nelle hUCMS stimolate n  in quelle non stimolate. Tuttavia il dato pi  interessante   stato l'incremento massivo dell'mRNA di IDO1 a cui si associa neosintesi di tale proteina come confermato dall'western blotting. L' IFN- γ , infine si   dimostrato in grado di incrementare l'espressione della ossido nitrico sintetasi (NOS) inducibile a livello di mRNA ma non di proteina.

Alla luce dei suddetti risultati, il secondo anno del progetto sar  incentrato sul completamento dello studio in vitro e sulla realizzazione della parte in vivo dello studio (modello murino di LES).

Figura 11: A) Espressione genica determinata in qPCR. L'espressione di ogni molecola dopo IFN- γ   relativa al rispettivo controllo non stimolato (=1) e normalizzata per HPRT1. Espressione di IDO1 e NOS a livello di mRNA (B,C) e proteina (D,E).

