

Differenziamento in vitro di cellule derivate dalla membrana amniotica in cellule producenti insulina.

Il diabete di tipo 1 (DT1) è una patologia cronica diagnosticata prevalentemente nell'età pediatrica causata dalla distruzione immuno-mediata delle cellule beta del pancreas producenti insulina. Lo studio del diabete è di estremo interesse in questo periodo storico per via dell'aumento della sua incidenza nella popolazione mondiale. Le terapie attuali per il DT1 si basano sulla somministrazione giornaliera d'insulina esogena associata al monitoraggio plurigiornaliero della glicemia. Nei casi con gravi complicanze in atto può essere previsto il trapianto di pancreas o di isole pancreatiche. Le strategie di trapianto permettono di controllare l'iperglicemia e di minimizzare il rischio di eventi di ipoglicemia, che durante la terapia insulinica possono mettere a repentaglio la vita dei pazienti. Esse sono inoltre in grado di dare -in alcuni casi- una completa ma transitoria remissione. I trapianti di pancreas o di isole sono però legati alla necessità di disporre di donatori cadavere. Il numero di organi disponibili è largamente insufficiente per trattare l'intera popolazione di pazienti. Da questo nascono la necessità e l'interesse nello studio di nuove terapie cellulari per il diabete.

Grande interesse in questo campo hanno suscitato nell'ultimo decennio le cellule staminali, in particolare derivate da tessuti adulti e di origine placentare. Tali cellule presentano diversi importanti vantaggi: in primo luogo possono essere isolate facilmente da diverse fonti ed espanse *in vitro* fino ad ottenerne un numero adeguato per un'eventuale terapia cellulare. Inoltre, molte sorgenti di cellule staminali sono prive di controversie etiche, come ad esempio le cellule isolate da placenta o da tessuto adiposo ottenuto mediante lipoaspirazione (fonti normalmente di scarto). Infine, un aspetto di cruciale importanza, per evitare una ricaduta nella malattia dopo trapianto, è la capacità di tali cellule di interagire con il sistema immunitario inibendone l'attivazione e nel contempo stimolarne la componente cellulare tollerogena costituita dai linfociti T regolatorie.

La nostra attenzione si è focalizzata su una specifica popolazione cellulare, le cellule epiteliali isolate da membrana amniotica (hAEC). Le hAEC sono una popolazione di notevole interesse poiché isolate dalla placenta, considerata un organo di scarto privo di problemi di carattere etico e di conseguenza di facile accesso. La membrana amniotica è inoltre conosciuta per le sue forti capacità immunomodulatorie, antinfiammatorie e antifibrotiche; viene infatti già utilizzata per diverse applicazioni cliniche che spaziano dall'oftalmologia alla dermatologia, per il trattamento di lesioni croniche come le ulcere corneali di origine allergica o le lesioni cutanee di origine diabetica. Le cellule epiteliali della membrana amniotica derivano, dal punto di vista embriologico, direttamente dall'epiblasto, in una fase precedente alla formazione dei tre foglietti embrionali. Questa plasticità potrebbe essere sfruttata per un loro indirizzamento più efficiente verso il fenotipo, di nostro interesse, insulinosecernente.

Un ulteriore aspetto da non sottovalutare per la creazione *in vitro* di cellule funzionali è sicuramente l'ambiente extracellulare. Questo comprende sia le componenti della matrice extracellulare -presente nel pancreas- sia le cellule dello stroma che supportano la crescita e la funzionalità delle cellule beta *in vivo*.

Il nostro gruppo di ricerca ha precedentemente dimostrato la possibilità di indurre le hAEC in senso endodermico pancreatico. Ciò è stato effettuato sia in un sistema di coltura 2D, trattando le epiteliali con diversi fattori differenziativi, sia in sistemi 3D col supporto di matrici extracellulari. Abbiamo inoltre dimostrato le loro capacità immunomodulatorie, attraverso la valutazione della capacità di inibire la linfo-proliferazione e l'espressione di molecole immunotolleranti *in vitro*. Dal punto di vista sperimentale, molti studi sono ancora necessari per migliorare la maturazione e la funzionalità delle cellule produttrici di insulina, mantenendone le proprietà immunomodulatorie che possano evitare una successiva aggressione immunologica a seguito del trapianto.

Questo è il motivo che ci ha spinto ad elaborare un progetto nel quale combinare il potenziale differenziativo delle cellule epiteliali della membrana amniotica con il supporto di componenti della matrice extracellulare - come ad esempio laminina e collagene - e cellule stromali mesenchimali derivanti da isole pancreatiche (PI-MSC), al fine di ricreare *in vitro* un modello simile all'isola pancreatica presente *in vivo*.

Scopo del progetto:

Tale progetto ha lo scopo di utilizzare cellule di origine placentare, le hAEC, per ricreare aggregati cellulari secernenti insulina simili alle isole pancreatiche, attraverso la generazione di co-culture tridimensionali con cellule mesenchimali derivanti da isole pancreatiche, PI-MSC.

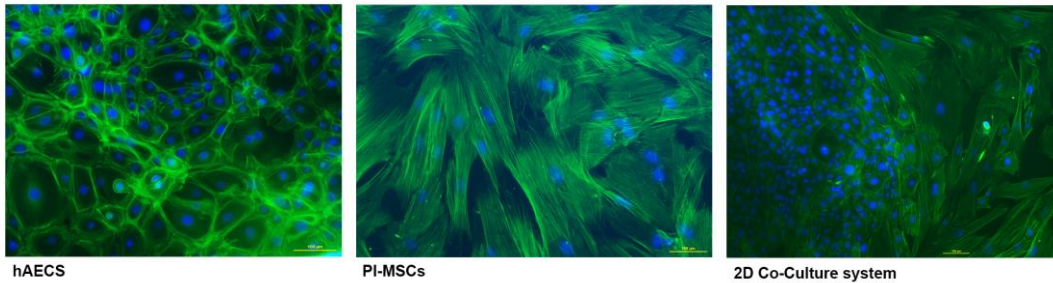
Fasi di svolgimento e di realizzazione del progetto di ricerca

Il progetto si articolerà sulla base delle seguenti attività:

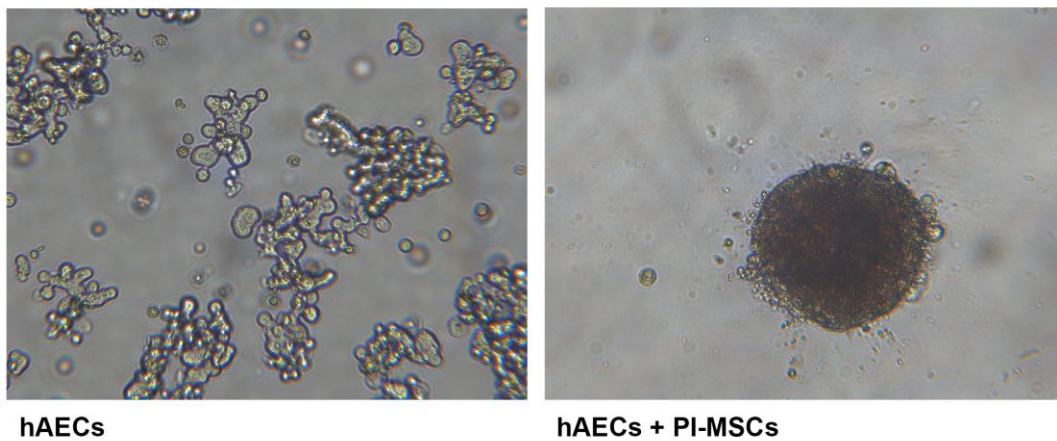
- Messa a punto di un metodo efficiente e riproducibile per la **creazione di colture cellulari tridimensionali** simili alle isole pancreatiche **a partire da cellule epiteliali della membrana amniotica (hAEC)** e studio **dell'interazione degli sferoidi tridimensionali con cellule mesenchimali stromali** derivanti da isole pancreatiche. (1-3 mesi)
- **Induzione delle hAEC in senso endodermico pancreatico definitivo** con creazione di cellule responsive ai livelli di glucosio. (3-12 mesi)
- Valutazione della **funzionalità** delle co-culture così generate e il mantenimento delle loro **caratteristiche immunomodulatorie** innate al fine di una possibile applicazione clinica. (8-12 mesi)

Dati preliminari sulla creazione di co-culture:

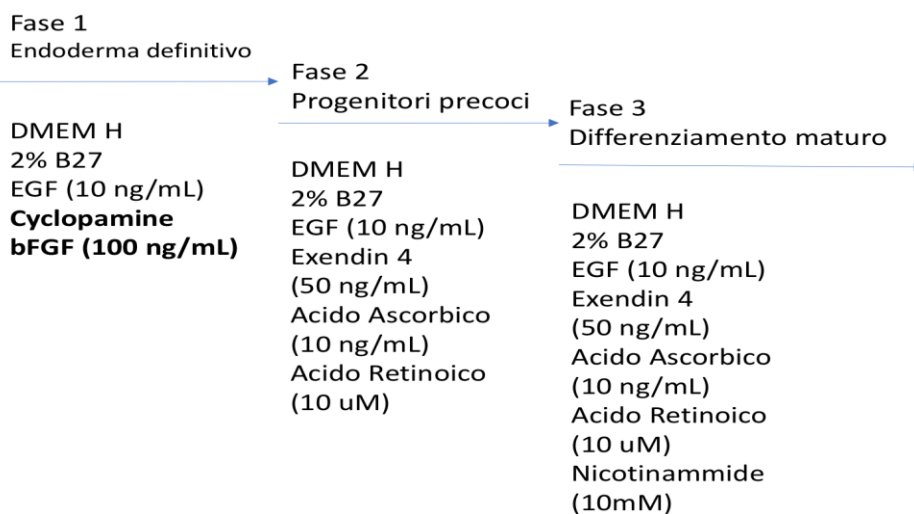
2D Culture



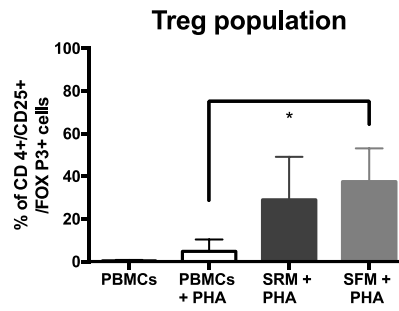
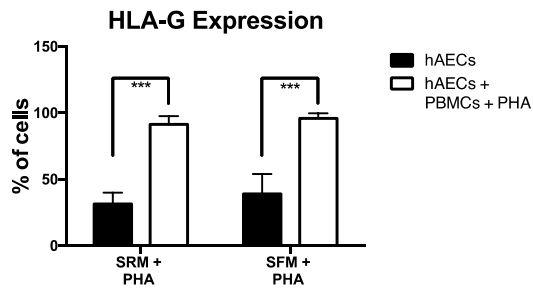
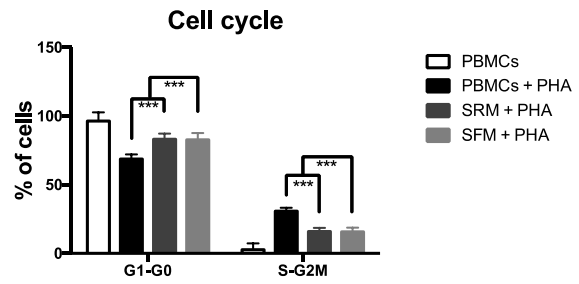
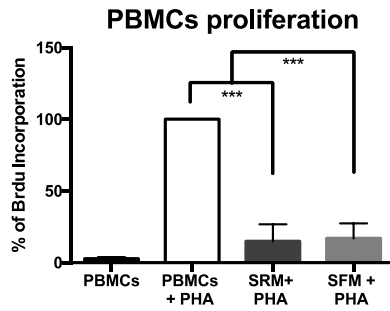
3D culture



Schema differenziamento



Dati preliminari sulle capacità immunomodulatorie delle hAECs in culture 2D



Bibliografia:

M. A. Atkinson, G.S. Eisenbarth and A. W. Michels. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014 Jan 4;383(9911):69-82.

B. Johannesson, L. Sui, D. O Freytes et al. Toward beta cell replacement for diabetes. *EMBO J*. 2015; 34(7):841-55

T.Miki and S. C. Strom. Amnion-Derived Pluripotent/Multipotent Stem Cells. *Stem Cell Rev*. 2006; 2(2):133-42

O. Parolini, F. Alviano, G.P. Bagnara et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008; 26(2):300-11

D. R. Bhandari, K. W. Seo, B. Sun et al. The simplest method for in vitro β -cell production from human adult stem cells. *Differentiation*. 201;82(3):144-52

L. Peng, J. Wang and G. Lu. Involvement of Gene Methylation Changes in the Differentiation of Human Amniotic Epithelial Cells into Islet-Like Cell Cluster. 2014; 33(9): 591-98.

B. Okere, F. Alviano, R. Costa et al. In vitro differentiation of human amniotic epithelial cells into insulin-producing 3D spheroids. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2015; 28(3):390-402.

C. L. Insausti, M. Blanquer, A. M. Garcia-Hernandez et al. Amniotic membrane-derived stem cells: Immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning*. 2014 Mar 24;7:53-63

C. Zanini, S. Bruno and G. Mandili et al.. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Pancreatic Islets and Bone Marrow into Islet-Like Cell Phenotype. *PLoS One*. 2011;6(12):e28175

