

## RELAZIONE SCIENTIFICA ATTIVITA' SVOLTA

### Obbiettivi proposti

Il nostro gruppo ha isolato da cordone umano cellule progenitrici epatiche precoci. Tali cellule hanno un elevato potenziale di espansione e, in condizioni culturali controllate, sono suscettibili di essere indotte verso il differenziamento epatico. Le colture così stimulate hanno dimostrato un forte arricchimento in cellule di tipo "oval-like", bipotenti per le linee epatocitaria e duttale, che esprimono markers differenziativi di entrambe, mostrano un profilo di espressione del tutto analogo a quello dei precursori degli epatociti maturi e sono capaci di attività funzionale epatica.

Disporre di precursori espandibili e suscettibili di commitment epatico permette la valutazione del loro potenziale rigenerativo in modelli preclinici al fine di valutarne le possibilità terapeutiche in trias clinici. Requisito primario per il successo di una terapia di trapianto cellulare è che le cellule trapiantate siano in grado di colonizzare e di ripopolare efficacemente il tessuto target. Pertanto, per dimostrare la capacità del nostro sistema di ripopolare tessuto epatico danneggiato, l'utilizzo di modelli murini resi chimicamente epatolesi, rappresenta un punto essenziale.

A questo scopo, la possibilità di collaborare con l'Unità INSERM ospitante è stata di fondamentale importanza. Questi laboratori, che hanno una lunga esperienza nell'utilizzo di modelli murini di trapianto e dispongono delle strutture e delle competenze necessarie, hanno reso possibile la continuazione e lo svolgimento di questa parte della ricerca.

### Attività svolta

Progenitori epatici precoci CD133+CD34+/OV6+ sono stati isolati da cordone umano ed espansi *in vitro* per 12 giorni. Le cellule sono state successivamente indotte al commitment epatico utilizzando il modello di coltura da noi messo a punto che utilizza un coating di gelatina e un terreno additivato con un mix opportunamente studiato di fattori di crescita e ormoni. Topi SCID (severe combined immunodeficient) maschi di 6-8 settimane sono stati trattati con dosi sub-letali di N-acetaminofene (15 mg/kg) per indurre danno epatico grave. Gli animali resi epatolesi sono stati quindi trapiantati sia con precursori epatici presi dopo 12 giorni di espansione (Gruppo 1), sia con progenitori bipotenti ottenuti dopo 1 settimana di induzione epatogenica (Gruppo 2). Come controllo animali trattati sono stati iniettati con il solo terreno di coltura con induttori (EDM hepatogenic-Gruppo 3) e senza induttori (EDM basic-Gruppo 4).

Dopo un follow-up di 24-30 giorni, gli animali sono stati sacrificati e il fegato è stato espantato. Dagli animali trapiantati è stata spiantata anche la milza. (Tab. 1, 2).

### **Risultati**

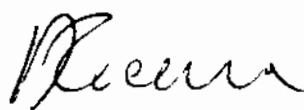
Tutti gli animali trattati hanno mostrato una buona sopravvivenza. Si è avuto 1 solo animale deceduto sia nel gruppo di controllo con terreno completo (Gruppo 3) che nei trapiantati con cellule indotte (Gruppo 2).

Attualmente è in corso la preparazione delle sezioni istologiche dei tessuti espantati, sia congelati freschi che inclusi in paraffina, per la valutazione del livello di engraftment delle cellule umane nel fegato e nella milza degli animali trapiantati, l'entità del ripopolamento epatico e l'espressione dei markers di origine umana. La verifica dei risultati sarà fatta mediante ibridazione in situ (FISH), immunohistochimica (IHC), immunofluorescenza, western blot e PCR. Il rescue dalla patologia indotta e la ripresa della funzionalità epatica saranno valutati tramite dosaggi dei parametri epatici nel siero e dell'attività epatica tissutale.

L'Utilizzo di modelli murini consentirà di valutare se le cellule progenitrici epatiche bipotenti ottenute con il nostro modello di induzione siano in grado di ripopolare fegati in topi immunodepressi sottoposti a trattamenti chimici epatotossici. Poiché il nostro modello differenziativo richiama l'attivazione delle cellule ovali che si riscontra *in vivo* nei modelli rigenerativi murini ottenuti con induzione di danno epatico acuto, ci aspettiamo che i nostri progenitori bipotenti oval-like possano essere efficaci nel recupero funzionale del fegato lesso e risultare quindi di grande utilità per applicazioni terapeutiche nei casi di grave insufficienza epatica, acuta o cronica, di differente origine.

Fruitore

Dr.ssa Annalisa Crema



Proponente

Dr. Guido Carloni

