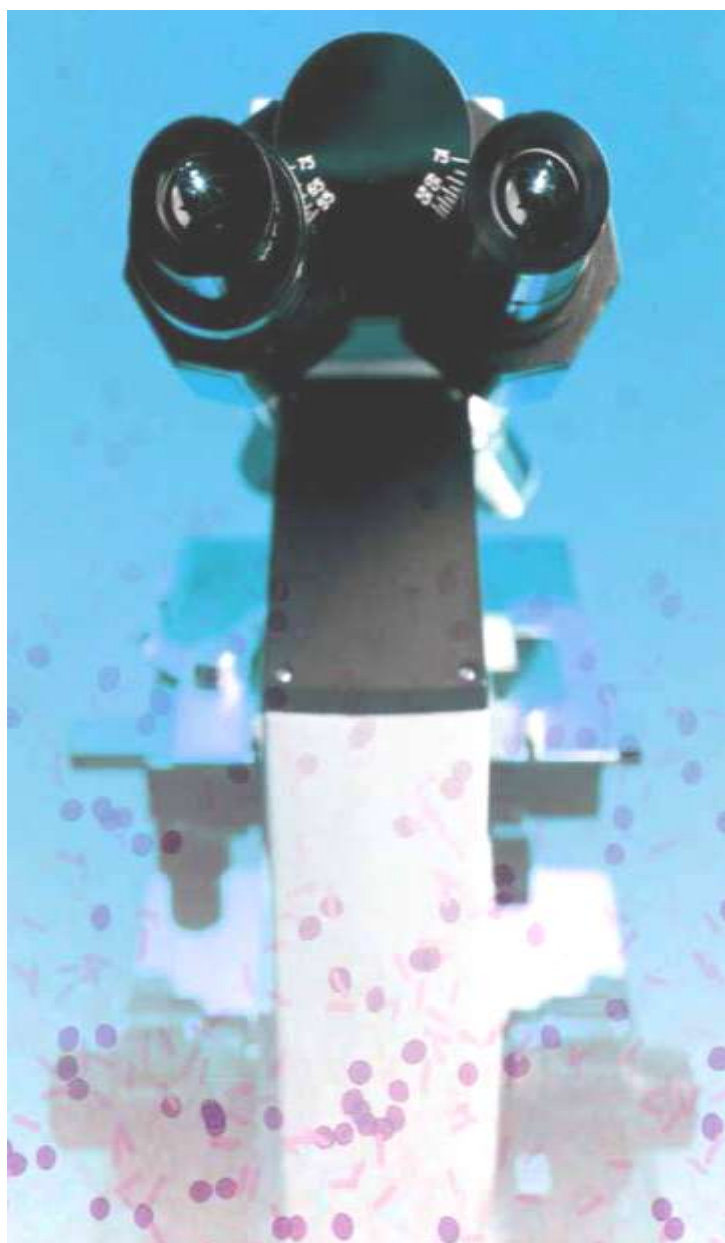




SERVIZIO SANITARIO REGIONALE  
EMILIA-ROMAGNA  
Azienda Ospedaliero - Universitaria di Modena  
Policlinico



Associazione per il Supporto della  
Ematologia ed Oncologia Pediatrica  
O.N.L.U.S. (Organizzazione non lucrativa di utilità sociale)



# LABORATORIO DI RICERCA MATERNO INFANTILE

- MALATTIE RARE DELL'ETÀ EVOLUTIVA -

- NEOPLASIE INFANTILI -

- PREVENZIONE DELLA INFERTILITÀ -

**Cellule staminali fetali come alternativa a quelle  
"embrionali" ed "adulte"  
per la terapia cellulare  
di patologie genetiche, oncologiche pediatriche e dell'età evolutiva**

## **LABORATORIO DI RICERCA MATERNO INFANTILE**

***DIPARTIMENTO AD ATTIVITÀ INTEGRATA MATERNO INFANTILE***  
AZ. OSPEDALIERO UNIVERSITARIA POLICLINICO DI MODENA

***ASEOP***  
ASSOCIAZIONE SOSTEGNO EMATOLOGIA ONCOLOGIA PEDIATRICA

**Presso il 7° Piano dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico di Modena è in fase di completamento il Laboratorio di Ricerca Materno Infantile il quale rappresenterà un punto cardine nello studio delle malattie rare dell'età evolutiva, delle neoplasie infantili e dell'infertilità.**

Il Laboratorio, istituito all'interno del Dipartimento ad Attività Integrate Materno Infantile, già attivo nel campo dell'Ostetricia, Pediatria, Neonatologia, Chirurgia Pediatrica e Genetica, potrà sviluppare la ricerca sulle cellule staminali fetali e del liquido amniotico, che possono essere impiegate per curare malattie rare dell'età evolutiva e neoplasie infantili, con particolare attenzione verso quelle che attualmente godono di scarse possibilità di cura, se non addirittura prive di tale prospettiva. Sarà così ulteriormente esteso e consolidato l'innovativo settore delle terapie cellulari, peraltro già avviato a Modena in collaborazione con il Dipartimento ad Attività Integrate di Oncologia, Ematologia e Patologie dell'Apparato Respiratorio, diretto dal Prof. Giuseppe Torelli.

Il contributo ricevuto dalla Ferrari per le attività di ricerca condotte dall'equipe che fa capo al **Prof. Paolo Paolucci** è stato pari a 320 mila euro, e ha permesso di completare la ristrutturazione del laboratorio. Complessivamente il Laboratorio occupa una **superficie di 300 mq** ed i lavori di adeguamento e ristrutturazione sono stati portati avanti e completati tra l'estate e l'autunno 2008 con una spesa che ha superato i 100mila euro, alla quale **ha contribuito ASEOP** (Associazione a Sostegno dell'Ematologia e Oncologia Pediatrica) con un contributo pari a 60mila euro.

E' stata così realizzata una struttura all'avanguardia, secondo un modello che consente ai ricercatori di utilizzare servizi comuni nell'ambito delle singole articolazioni della ricerca, evitando duplicazioni e sprechi di spazi e di strumenti.

I ricercatori possono ora contare sulla disponibilità di un **laboratorio chimico**, un **laboratorio di colture cellulari**, un **laboratorio di biologia molecolare**, e una serie di **servizi comuni** (studi, stoccaggio a temperatura ambiente e refrigerato, microscopia, criobiologia), dotati delle più moderne ed avanzate attrezzature scientifiche. Sarà, inoltre, possibile adeguare sia la dotazione tecnologica esistente sia le risorse umane dedicate, in quanto il finanziamento da parte della Ferrari permetterà **l'arruolamento di un ricercatore per un biennio, che si aggiungerà ai tre giovani ricercatori che già compongono l'equipe del laboratorio**: un borsista regionale, un assegnista universitario, un dottorando di ricerca.

**L'associazione ASEOP per il biennio 2009-2010 vede il proprio impegno su tale progetto con un ulteriore contributo pari ad € 180.000,00 che verrà finalizzato all'acquisto di strumentazioni ed apparecchiature indispensabili al funzionamento del laboratorio**

**Il costo totale relativo alla realizzazione del Laboratorio di Ricerca Materno Infantile ammonta a circa 900 mila euro.**

**Soggetto Proponente**

---

- **Dipartimento ad Attività Integrate (DAI) Materno Infantile**  
**Referente Progetto: Prof Paolo Paolucci**
  - **Pediatria Oncologica**
  - **Neonatologia**
  - **Chirurgia Pediatrica**
  - **Genetica Medica**
  - **Ostetricia**
  - **Ginecologia**
  
- **ASEOP Associazione Sostegno Ematologia Oncologia Pediatrica**  
**Referente Progetto: Presidente Erio Bagni**  
**Via Largo del Pozzo n.71 – Modena**  
**Tel. 059.4224412 Fax. 059.4224415 e.mail info@aseop.it**

**Idea di progetto**

---

Recenti sviluppi nel campo della biomedicina hanno dimostrato l'enorme potenziale delle cellule staminali per la formazione di tessuti utili per la terapia cellulare di patologie dell'età evolutiva e per la medicina rigenerativa. Il potenziale maggiore si ha nelle cellule pluripotenti che hanno una capacità illimitata di proliferazione e possono differenziare in tutte le linee cellulari. Sono cellule pluripotenti le cellule staminali "embrionali", mentre le cellule staminali adulte non posseggono questa caratteristica. Le cellule staminali embrionali attualmente più studiate sono derivate dalla massa cellulare interna delle blastocisti: per questo pongono problemi etici ed il loro ottenimento è stato proibito in Italia e altri paesi. Recentemente cellule staminali pluripotenti sono state individuate nel liquido amniotico ed è stata dimostrata la loro abilità di differenziazione in un vasto range di tipi cellulari, appartenenti alle tre linee primarie embrionali (mesoderma, ectoderma ed endoderma). E' quindi possibile che nell'embrione precoce e nel feto si possano reperire altre cellule staminali pluripotenti. Il presente progetto intende valutare se è possibile reperire cellule staminali pluripotenti a partire da embrioni umani abortiti in vari momenti della gestazione, come alternativa alle cellule staminali embrionali o adulte. Per tale studio si intende l'utilizzo di marcatori specifici di pluripotenza e la valutazione della loro capacità biologica di propagazione e differenziazione con marcatori e test specifici.

**Sintesi del Progetto**

---

Il progetto si propone di studiare la possibilità di isolare cellule staminali pluripotenti da embrioni e feti umani abortiti spontaneamente prima della 20° settimana di gravidanza. Verranno studiati markers specifici in aggiunta a quelli esistenti per il riconoscimento e l'isolamento delle cellule staminali. Seguirà il differenziamento in direzione del tipo cellulare di interesse. L'uso di cellule staminali isolate da diversi organi in formazione degli aborti potrebbe avere il vantaggio di una più elevata capacità proliferativa in confronto alle cellule staminali adulte, ed un più ristretto tipo di differenziamento in confronto a quelle embrionarie. L'Unità di Ricerca dell'Azienda Universitario Ospedaliera Policlinico di Modena operante nel campo dell'Ostetricia, Pediatria e Genetica, è strutturata in un Dipartimento Materno-Infantile, dove vengono effettuate più di 1200 analisi prenatali su liquido amniotico e su villi coriali, dove gli aborti vengono routinariamente analizzati, e che dispone di un laboratorio attrezzato per la coltura e la conservazione di tessuti e cellule, ed offre quindi il terreno ideale per portare avanti il presente progetto di ricerca. Dopo approvazione dal comitato etico locale, e dopo aver ottenuto un consenso informato dalle donatrici, si procederà all'isolamento di colture cellulari. Lo scopo è quello di espandere in vitro continuamente cellule

staminali in uno stato indifferenziato, testando la loro capacità di autorinnovamento con specifici marcatori di staminalità. La differenziazione in vitro delle cellule staminali generalmente produce una popolazione cellulare mista, composta di diverse linee, con il tipo cellulare desiderato presente solo in una piccola proporzione. L'uso di fattori di crescita che promuovano il differenziamento, l'espansione e la sopravvivenza di tipi cellulari specifici e' la chiave del controllo del differenziamento verso specifiche linee cellulari. E' altresì possibile che l'isolamento di diversi tipi di cellule staminali dagli embrioni spontaneamente abortiti a diverse settimane gestazionali possa esser reso difficile dall'assenza di marcatori di superficie. Per identificare nuovi marcatori di superficie per le varie cellule staminali, ci si potrà avvalere di analisi delle differenze di espressione genica tra le cellule isolate dai diversi organi attraverso analisi dei microarrays.

## **Metodologia**

---

Scopo dello studio e' di testare se sia possibile isolare cellule pluripotenti o multipotenti da embrioni umani da aborti spontanei. Le cellule staminali verranno isolate dai vari organi dell'embrione e quindi indotte differenziarsi in colture in vitro, verificando la loro staminalità. Per ogni tipo tissutale verranno utilizzate immunocitochimica con fluorescenza, analisi mediante FACS scanning ed RT-PCR per esaminare l'espressione di marcatori di cellule staminali specifici per il tipo cellulare in questione. Inoltre verrà testato il carattere di staminalità delle cellule prenatali isolate mediante la misura della lunghezza di telomeri.

- **Isolamento delle cellule fetali**

Verranno esaminati i feti abortiti spontaneamente alle varie settimane di gravidanza anteriori alla 20a. Le cellule verranno messe in coltura, espanse immediatamente e sottoposte ad immunoselezione, utilizzando i marcatori specifici per le cellule staminali di tale tessuto riportati in letteratura.

- **Marcatori di pluripotenzialita' e multipotenzialita'**

I marcatori di pluripotenzialita' utilizzati nello studio sono quelli accettati per le cellule embrionali pluripotenti, ovvero OCT4, Nanog, Sox2, Foxd3, Rex1, ed UTF1 come markers di trascrizione; TERF1, CHK2, DNMT3 come modificatori di DNA; GFA1 marcatore di superficie; GDF3, fattore di crescita; TDGF1 recettore (Pera and Trounson, 2004).

- **Colture cellulari primarie**
- **Colture di cellule staminali**
- **Differenziamento di cellule staminali**
- **Differenziamento dopo l'isolamento**
- **Adipogenico**
- **Osteogenico**
- **Miogenico**
- **Endoteliale.**
- **Neurogenico.**
- **Epatico.**
- **RT-PCR**
- **Immunocitochimica**

Verrà eseguita una immunocitochimica indiretta. Le immagini a microscopio delle sfere intatte verranno catturate mediante una macchina digitale montata sul microscopio

- **Citometria di flusso**

Per determinare il profilo antigenico delle cellule isolate o delle cellule indotte al differenziamento, verranno eseguite marcature con anticorpi monoclonali secondo protocolli standard, con l'uso di un analizzatore. Verrà eseguita un'analisi quantitativa microscopica e statistica per la comparazione di differenti colture.

- **Telomere length assay**

La determinazione delle lunghezze telomeriche verrà eseguita mediante l'uso del TeloTAGGG Telomere Length Assay kit (Roche Molecular).

- **Valutazione del differenziamento**

Per testare il differenziamento di ciascun tipo isolato, verranno utilizzati vari anticorpi in immunofluorescenza oppure RT PCR o analisi FACS per verificare l'espressione di marcatori specifici di un determinato lignaggio cellulare

- **Secrezione di L-glutamato**

Le cellule saranno trattate con 50 mM KCl ed acido glutamico e saranno misurate mediante l'Amplex Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen) secondo il protocollo del produttore

- **Produzione di urea**

Le cellule saranno incubate con NH<sub>4</sub>Cl ed ornitina, e verrà utilizzato il kit urea nitrogen assay (Sigma-Aldrich) secondo il protocollo del produttore.

---

## **Obiettivo**

Il progetto si propone di studiare la possibilità di isolare cellule staminali pluripotenti da embrioni e feti umani abortiti spontaneamente prima della 20° settimana di gravidanza. Verranno studiati markers specifici in aggiunta a quelli esistenti per il riconoscimento e l'isolamento delle cellule staminali. Seguirà il differenziamento in direzione del tipo cellulare di interesse. L'uso di cellule staminali isolate da diversi organi in formazione degli aborti potrebbe avere il vantaggio di una più elevata capacità proliferativa in confronto alle cellule staminali adulte, ed un più ristretto tipo di differenziamento in confronto a quelle embrionarie aumentando la possibilità di definire nuove linee terapeutiche per le malattie rare ed incrementando notevolmente il successo di cura nelle malattie oncologiche pediatriche.

---

## **Tempistica**

Completamento del Laboratorio e messa a regime dell'attività di Ricerca: Dicembre 2010