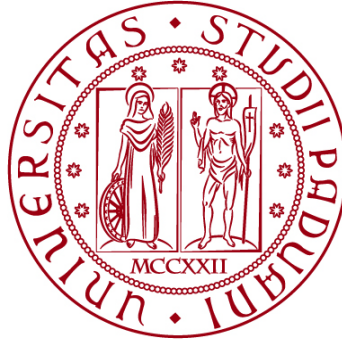


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Allestimento di un modello *in vitro* per valutare la risposta  
di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo  
al microambiente endoteliale:  
un nuovo approccio per terapia cellulare dell'Emofilia A**

**Tutor: Prof.ssa Silvia Barbon**

Dipartimento di Neuroscienze

**Co-tutor: Prof.ssa Elena Stocco**

Dipartimento di Neuroscienze

**Laureanda: Sofia Vigolo**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**

# INDICE

---

|   |                |
|---|----------------|
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>PAG. 1</b>  |
| <b>1. STATO DELL'ARTE .....</b>   | <b>PAG. 2</b>  |
| 1.1 IL TARGET CLINICO: L'EMOFILIA A .....   | PAG. 2         |
| 1.2 ATTUALI SOLUZIONI TERAPEUTICHE PER L'EMOFILIA A.....  | PAG. 2         |
| 1.2.1 FARMACI RICOMBINANTI .....  | PAG. 2         |
| 1.2.2 TERAPIA GENICA .....  | PAG. 3         |
| 1.3 NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE OFFERTE DALLA MEDICINA RIGENERATIVA: LA TERAPIA<br>CELLULARE .....         | PAG. 3         |
| 1.4 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO.....  | PAG. 5         |
| 1.5 SCOPO DELLA TESI .....  | PAG. 5         |
| <b>2. APPROCCIO SPERIMENTALE .....</b>  | <b>PAG. 6</b>  |
| 2.1 COLTURA IN VITRO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO DI ORIGINE<br>UMANA (AD-MSC)..... | PAG. 6         |
| 2.2 ANALISI MORFOLOGICA TRAMITE MICROSCOPIA OTTICA.....   | PAG. 6         |
| 2.3 CARATTERIZZAZIONE DELL'IMMUNOFENOTIPO TRAMITE CITOFLUORIMETRIA .....                                    | PAG. 6         |
| 2.4 DIFFERENZIAMENTO ENDOTELIALE .....  | PAG. 7         |
| 2.5 TEST DI MIGRAZIONE CELLULARE.....   | PAG. 7         |
| 2.6 ACQUISIZIONE DI CARATTERISTICHE SIMIL-ENDOTELIALI .....   | PAG. 7         |
| 2.6.1 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA TRAMITE REAL-TIME PCR (QPCR) .....                                    | PAG. 7         |
| 2.6.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA TRAMITE CITOFLUORIMETRIA .....                                      | PAG. 9         |
| 2.7 ESPRESSIONE E RILASCIO DEL FATTORE VIII (FVIII) DELLA COAGULAZIONE.....                                 | PAG. 9         |
| 2.8 VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ DI COAGULAZIONE DEL SANGUE .....   | PAG. 9         |
| 2.9 ANALISI STATISTICHE .....   | PAG. 10        |
| <b>3. RISULTATI .....</b>   | <b>PAG. 11</b> |
| 3.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE COLTURE AD-MSC .....  | PAG. 11        |
| 3.2 CAPACITÀ DI MIGRAZIONE CELLULARE .....  | PAG. 11        |
| 3.3 DIFFERENZIAMENTO ENDOTELIALE .....  | PAG. 12        |
| 3.4 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE E DEL RILASCIO DEL FVIII .....   | PAG. 14        |
| 3.5 ANALISI DELLA CAPACITÀ DI COAGULAZIONE DEL SANGUE.....  | PAG. 15        |
| <b>4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</b>  | <b>PAG. 17</b> |
| <b>5. BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>PAG. 21</b> |

## ABSTRACT

---

Negli ultimi decenni, le ricerche sulle cellule staminali adulte hanno suggerito la possibilità di identificare nuovi approcci di terapia cellulare per il trattamento di malattie monogeniche come l'Emofilia A. In questo lavoro, cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo (Ad-MSc) sono state indagate per la capacità di produrre il Fattore VIII della coagulazione (FVIII) dopo adeguata stimolazione e senza ricorrere alla trasfezione genica. A questo scopo, le cellule Ad-MSc sono state stimolate *in vitro* per acquisire caratteristiche del *lineage* endoteliale (responsabile della produzione dei fattori della coagulazione) tramite coltura in *medium* arricchito con fattori di crescita induttivi fino a 21 giorni. Oltre a rispondere in modo significativo agli stimoli endoteliali chemiotattici e a formare strutture simil-capillari, le cellule hanno *up-regolato* l'espressione di *marker* specifici (CD34, PDGFR, VEGFR2, VE-caderina, CD31 e vWF) e hanno dimostrato la capacità di rilasciare FVIII nel *medium* di coltura. Inoltre, il test aPTT ha rilevato una riduzione dei tempi di coagulazione nel plasma carente di FVIII, quando miscelato con i terreni di coltura delle Ad-MSc non trattate/stimate. Nel complesso, le evidenze raccolte suggeriscono un possibile contributo delle Ad-MSc alla correzione dell'Emofilia A tramite stimolazione specifica da parte del microambiente endoteliale e senza alcuna necessità di trasfezione genica.

## 1. STATO DELL'ARTE

---

### 1.1 IL TARGET CLINICO: L'EMOFILIA A

L'Emofilia A è una malattia genetica rara, che si manifesta con una ridotta capacità di coagulazione del sangue a causa del deficit di produzione del fattore VIII (FVIII) della coagulazione. Può essere causata da diverse mutazioni sul gene del FVIII localizzato sul cromosoma X. Questo fattore partecipa al processo coagulativo come cofattore di IXa, che in presenza di  $Ca^{2+}$  e fosfolipidi, converte il fattore X nella sua forma attivata Xa. Questa disfunzione comporta ricorrenti episodi emorragici spontanei nelle regioni peri-articolari (emartrosi) e nei muscoli (ematomi), che causano dolore cronico e disabilità.

L'Emofilia A si presenta in tre forme a seconda dell'attività biologica del FVIII: lieve (5-40%), moderata (5-1%) o grave (<1%). Il trattamento può essere profilattico (per prevenire il sanguinamento) o effettuato a richiesta (in seguito all'emorragia) e si basa sull'infusione intravenosa di concentrati di FVIII derivati dal plasma di donatori sani, o da proteina ricombinante prodotta da cellule geneticamente ingegnerizzate come terapia sostitutiva. I problemi principali, legati a questi approcci terapeutici, sono: la produzione di anticorpi inibitori rivolti contro il fattore della coagulazione somministrato e la ridotta emivita del FVIII ricombinante (rFVIII). Questo comporta infusioni frequenti (circa tre volte a settimana), implicando un trattamento a lungo termine estremamente costoso. Inoltre, la terapia genica, pur rimanendo una valida strategia, presenta il rischio di insorgenza di tumori [1,2].

### 1.2 ATTUALI SOLUZIONI TERAPEUTICHE PER L'EMOFILIA A

#### 1.2.1 FARMACI RICOMBINANTI

**Efanesoctocog alfa** è una proteina di fusione ricombinante, sviluppata da *Bioverativ Therapeutics, Inc* (una compagnia della Sanofi) e *Swedish Orphan Biovitrum AB* (Sobi). È stata approvata negli USA nel febbraio del 2023 e in Europa nel giugno 2024. Il farmaco è costituito da una singola molecola di rFVIII fusa con Fc dimerico (appartenente all'immunoglobulina G1), un dominio (D'D3) in grado di disaccoppiare il FVIII dal fattore von Willebrand e due polipeptidi XTEN.

Il polipeptide XTEN presenta un volume idrodinamico maggiore rispetto a quello di una proteina globulare di simile massa, provocando una riduzione della clearance, un aumento dell'emivita e un miglioramento delle proprietà farmacocinetiche [2].

**Emicizumab** è un anticorpo bispecifico, con azione "mimetica" rispetto a quella del FVIII. È in grado di legare con un braccio il fattore IXa e con l'altro il fattore X, facilitando così la conversione del fattore X nella sua forma attiva. Il ripristino dell'emostasi è stato valutato ad un livello pari al 15% rispetto alle capacità

normali del FVIII, con o senza inibitori. La sua farmacocinetica ne rende l'utilizzo vantaggioso, infatti consente di effettuare somministrazioni sottocutanee meno frequentemente (da settimanali a mensili) rispetto alle tradizionali infusioni. La sua continua attività all'interno del plasma può, però, comportare microangiopatie e trombosi, se associato con concentrati di complessi protrombinici [3].

### 1.2.2 TERAPIA GENICA

La terapia genica è stata ampiamente esplorata come nuovo approccio terapeutico per l'Emofilia A, poiché permette al paziente di produrre da sé il FVIII, invece che riceverlo in maniera profilattica. Per il trasporto del transgene FVIII, sono stati studiati numerosi vettori: virus adeno-associati, retrovirus e lentivirus, ma anche diversi approcci: un'iniezione diretta nel sangue per consentire un'ampia diffusione del vettore o la trasduzione *ex vivo* di cellule bersaglio trapiantabili. Il maggiore impatto sul successo della terapia è dato dalla cellula bersaglio prescelta, che deve essere in grado di produrre livelli sufficienti e persistenti di FVIII. Sono state considerate due possibilità: cellule staminali o cellule a lunga sopravvivenza quiescenti, come gli epatociti o le cellule muscolari scheletriche. Alcune ricerche hanno dimostrato, attraverso sperimentazioni precliniche, l'efficacia del trapianto di cellule staminali ematopoietiche e di cellule stromali mesenchimali trasdotte con il gene umano FVIII e capaci di provvedere alla secrezione di livelli significativi del fattore coagulativo.

Tuttavia la terapia genica, così come gli altri approcci terapeutici, presenta importanti limiti: il possibile pre-condizionamento tossico per ottimizzare l'attecchimento delle cellule modificate; un'eventuale espressione ectopica del FVIII, con conseguente risposta immunitaria; l'inefficienza di modifiche post-traduzionali da parte delle cellule muscolari; le grandi dimensioni del gene per il FVIII, che eccedono le normali capacità dei vettori, conseguendo in uno scarso rilascio della proteina. Si è cercato di risolvere quest'ultimo problema attraverso la delezione del dominio-B o l'uso di due vettori virali. Un'altra difficoltà è rappresentata dalla risposta immunitaria dell'ospite, pre e post-terapia, con la distruzione delle cellule esprimenti le proteine virali e lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti contro il vettore virale. Infine, come già sottolineato, la manipolazione genica su cui si basano queste strategie di intervento può aumentare il rischio di insorgenza di mutazioni cancerose [4,5].

### 1.3 NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE OFFERTE DALLA MEDICINA RIGENERATIVA: LA TERAPIA CELLULARE

Visti i limiti delle terapie attuali, un nuovo approccio al trattamento dell'Emofilia A può essere ricercato nelle moderne strategie di Medicina Rigenerativa, tramite il

trapianto di cellule tessuto-specifiche o staminali, che possano stimolare il rinnovo della componente cellulare responsabile della sintesi del FVIII, senza alcuna manipolazione del DNA.

Diversi studi hanno indicato le **LSEC** (*Liver Sinusoidal Endothelial Cells*) come le principali fonti di FVIII nel fegato. Queste particolari cellule costituiscono una barriera semi-permeabile che riveste i sinusoidi epatici, e contribuiscono alla *clearance* dei patogeni, alla risposta immunitaria, alla secrezione di citochine e fattori di crescita. La loro efficacia nel trattare la malattia è stata dimostrata in diversi modelli murini. Le **LSEC fetali**, ottenute da aborti elettivi, sono state testate in sperimentazioni precliniche, dando ottimi risultati per il trattamento dell'Emofilia A. Ad oggi, il trapianto di queste cellule di origine fetale è stato eseguito in molti paesi, sebbene considerazioni legali, etiche e di bio-sicurezza pongano diverse limitazioni al loro utilizzo terapeutico. La caratteristica vantaggiosa legata a questo tipo cellulare è data dall'ampia capacità di riserva proliferativa.

Le cellule endoteliali circolanti derivate dal sangue, **BOEC** (*Blood-Outgrowth Endothelial Cells*) rappresentano un'altra risorsa clinicamente promettente; tali cellule sono presenti in bassa concentrazione nel sangue periferico degli individui adulti, ma possono essere espanse in coltura. La maggior parte di queste cellule origina dalle pareti vascolari, ma il 5% si stima provenga dal midollo osseo. Se trasfettate con il gene F8 possono secernere FVIII umano nel plasma.

Esistono comunque potenziali limitazioni all'utilizzo di cellule tessuto-specifiche derivate da varie fonti fetali e adulte, tra queste: la ridotta disponibilità di tessuti donatori idonei, la bassa resa di estrazione da omogenati di fegato, il limitato potenziale di espansione *in vitro* per perdita di capacità funzionale o proliferativa. Grazie all'elevato potenziale di auto-rinnovamento, crescita e pluripotenza, che consente la creazione di cellule appartenenti a tutti e tre i foglietti germinali primari, incluse le LSEC, le **ESC** (*Embryonic Stem Cells*) e le **iPSC** (*induced Pluripotent Stem Cells*) sono state indicate come candidate promettenti per la terapia cellulare dell'Emofilia A. Sebbene le ESC siano considerate il *gold standard* tra le cellule staminali pluripotenti, molti studi attuali si concentrano sulle iPSC, in quanto non richiedono l'impiego di embrioni umani che suscita importanti controversie di carattere etico. La plasticità cellulare delle iPSC le rende estremamente utili per generare cellule specifiche per il paziente per terapie personalizzate, oltre che per la creazione di modelli patologici *in vitro*, la scoperta e lo screening di nuovi farmaci. Nell'ambito degli studi sulla terapia cellulare per l'Emofilia A, molti ricercatori stanno cercando di dimostrare l'utilità di un approccio combinato che utilizza la terapia genica per dirigere l'espressione di un transgene umano FVIII in cellule derivate da iPSC, utilizzando tecnologie come TALEN, ZFN e CRISPR-Cas9. Il successo della terapia cellulare dipende dal tipo e dalla disponibilità delle cellule

del donatore, dall'età dell'ospite e dal metodo di trapianto, nonché dai livelli di attecchimento e di produzione di FVIII [6].

#### **1.4 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO**

Tra le popolazioni cellulari che si configurano come possibili candidate per il trattamento dell'Emofilia A, le cellule staminali mesenchimali (MSC) isolate ad esempio da midollo osseo o tessuto adiposo, rappresentano quelle con le proprietà terapeutiche più promettenti. Oltre a poter essere ottenute da fonti tissutali relativamente accessibili e disponibili, le cellule MSC sono popolazioni multipotenti localizzate in tessuti adulti, il cui isolamento e la cui coltura *in vitro* non sollevano, quindi, alcuna problematica di tipo etico.

Le cellule MSC da tessuto adiposo (Ad-MSC) sono cellule con morfologia fibroblastoide, isolate dall'SFV (*Stromal Vascular Fraction*) (sono tra 1-10% del totale), processando il tessuto adiposo sia con metodi enzimatici che meccanici. Grazie alla loro capacità di auto-rinnovarsi e di differenziarsi in una grande varietà di tipologie cellulari, e agli effetti antinfiammatori, immunomodulatori, anti-fibrotici, anti-apoptotici e pro-angiogenici, sia *in vitro* che *in vivo*, le cellule staminali derivate da tessuto adiposo stanno conoscendo un largo impiego nel campo dell'Ingegneria Tissutale e della terapia cellulare. Le Ad-MSC sono in grado di differenziarsi anche nel *lineage* non mesodermico, in cellule endoteliali, epatociti, neuroni, cellule pancreatiche. Questa loro abilità non è ancora stata spiegata, ma si ritiene sia dovuta alla presenza sulla superficie di marker appartenenti alle cellule staminali progenitrici. Le differenze che ci sono tra donatori rendono variabile il potenziale terapeutico delle Ad-MSC, in riferimento alla loro crescita ed efficacia di differenziamento. Attualmente si stanno studiando sistemi sempre più sofisticati per trattare patologie che non hanno ancora una cura e per ridurre rischi ed effetti avversi del trapianto cellulare, come la combinazione delle cellule staminali con *scaffolds* o modelli "organ-on-a-chip" [7,8].

#### **1.5 SCOPO DELLA TESI**

Questo lavoro di tesi presenta lo studio sperimentale di Barbon e colleghi [9], che propone di utilizzare le cellule Ad-MSC opportunamente indotte, come modello *in vitro* della responsività cellulare verso il microambiente endoteliale, che può assomigliare alla nicchia endoteliale sinusoidale. In particolare, è stata indagata la capacità di queste cellule di esprimere e rilasciare FVIII dopo una stimolazione endoteliale specifica e senza alcuna manipolazione genetica, al fine di promuovere l'acquisizione di una funzionalità simil-LSEC. L'obiettivo finale è quello di dimostrare la possibilità di utilizzare le cellule Ad-MSC per la terapia cellulare dell'Emofilia A.

## 2. APPROCCIO SPERIMENTALE

---

### 2.1 COLTURA *IN VITRO* DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO DI ORIGINE UMANA (Ad-MSC)

Le colture cellulari primarie Ad-MSC di origine umana sono state acquistate dalla ditta Tebu-bio (Le Perray-en-Yvelines, Francia) e coltivate nel terreno proliferativo *Human Mesenchymal Stem Cell (hMSC) Expansion Media*, seguendo il protocollo fornito dal produttore. In sintesi, la *vial* contenente le cellule è stata scongelata in bagno termostatico a 37°C in agitazione. Sotto una cappa a flusso laminare, il contenuto della *vial* è stato spostato in una provetta sterile da 15 mL, assieme a 10 mL di terreno di coltura completo e centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti (min). Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 5 mL di terreno hMSC all'interno di una flask T-25 e incubato a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, e 90% di umidità. Le cellule hanno raggiunto una confluenza del 70-80% tra i 3 e i 7 giorni dopo la semina e le successive sub-colture sono state allestite ad una densità di 7000 cellule/cm<sup>2</sup>.

### 2.2 ANALISI MORFOLOGICA TRAMITE MICROSCOPIA OTTICA

Le colture Ad-MSC sono state osservate quotidianamente tramite il microscopio ottico DM/IL (Leica, Wetzlar, Germania), per valutare la vitalità cellulare e la morfologia specifica nelle differenti fasi di sub-confluenza. Le micrografie a contrasto di fase sono state realizzate con una fotocamera Nikon Digital Sight Ds-SMcc (Nikon Corporation, Tokyo, Giappone).

### 2.3 CARATTERIZZAZIONE DELL'IMMUNOFENOTIPO TRAMITE CITOFLUORIMETRIA

Dopo l'espansione in coltura, le cellule sono state raccolte mediante un trattamento con EDTA/tripsina, centrifugate a 1.500 rpm per 5 min e risospese in tampone fosfato salino (PBS) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germania) addizionato con lo 0,2% di albumina di siero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich). Le cellule sono state poi incubate per 15 min a temperatura ambiente (TA) al buio con 5 µL dei seguenti anticorpi primari: anti-CD14, anti-CD45, e anti-CD105 coniugati con fluoresceina isotiocianato (FITC) (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA); anti-CD29, anti-CD44 e anti-CD90 (BioLegend, San Diego, CA, USA) coniugati con ficoeritrina (PE). I controlli negativi sono stati preparati trattando le cellule con 5 µL degli anticorpi isotipici coniugati a FITC e PE (Santa Cruz and BioLegend). I dati relativi ad un totale di 10.000 eventi (i.e., cellule) sono stati acquisiti tramite il citofluorimetro FACS Canto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e analizzati con *Flowing Software 2* (Turku Bioscience Centre, Turku, Finlandia). I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule positive rispetto ai controlli isotipici negativi.



## **2.4 DIFFERENZIAMENTO ENDOTELIALE**

Per l'induzione del differenziamento endoteliale, le cellule Ad-MSC al quarto passaggio in coltura sono state seminate su piastre *multiwell* da 6 pozzetti ad una densità di 10.000 cellule/cm<sup>2</sup>. Dopo aver raggiunto il 70-80% della confluenza, le cellule sono state sottoposte ad un trattamento di induzione specifica verso il *lineage* endoteliale. A tal fine, le cellule sono state coltivate per 7, 14 e 21 giorni (gg) nel terreno differenziativo *Endothelial Growth Medium* (EGM)-2 (Lonza, Basilea, Svizzera) contenente i fattori di crescita VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), hFGF-b (*human basic Fibroblast Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*), eparina, acido ascorbico e il 2% di siero fetale bovino. In parallelo, il controllo indifferenziato è stato preparato coltivando le cellule Ad-MSC in terreno proliferativo.

## **2.5 TEST DI MIGRAZIONE CELLULARE**

L'effetto induttivo del microambiente endoteliale sulla migrazione delle cellule Ad-MSC è stato valutato tramite l'esperimento della "camera di Boyden". Le Ad-MSC ( $5 \times 10^4$  cellule/cm<sup>2</sup>) sono state seminate sul lato superiore di un filtro poroso (con pori di 5.0  $\mu$ m) (Corning Inc., Corning, NY, USA) in terreno differenziativo EGM-2. I filtri sono stati alloggiati nei pozzetti di una piastra *multiwell* da 24 contenenti terreno proliferativo (camera inferiore). Contemporaneamente, l'effetto chemotattico indotto dal trattamento endoteliale è stato analizzato seminando le cellule Ad-MSC in terreno proliferativo sulla parte superiore del filtro e aggiungendo il terreno EGM-2 nella camera inferiore. Come controllo, le cellule sono state mantenute in terreno proliferativo sia sul lato superiore del filtro che nella camera inferiore. Dopo 24 ore (h), le colture Ad-MSC sono state fissate in paraformaldeide (PFA) al 4% (Sigma-Aldrich), e la membrana superiore del filtro è stata tamponata per rimuovere le cellule non migrate. La membrana è stata quindi separata dal filtro e incubata con 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI) per la marcatura nucleare. Dopo aver acquisito le immagini al microscopio a fluorescenza, la migrazione/chemiotassi delle cellule Ad-MSC attraverso il filtro è stata quantificata contando il numero dei nuclei nel lato inferiore della membrana in 5 campi casuali per filtro (ingrandimento 100x) tramite il software Image J (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

## **2.6 ACQUISIZIONE DI CARATTERISTICHE SIMIL-ENDOTELIALI**

### **2.6.1 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA TRAMITE REAL-TIME PCR (qPCR)**

L'acquisizione delle caratteristiche simil-endoteliali da parte delle cellule Ad-MSC sottoposte a trattamento induttivo è stata dapprima investigata a livello dell'RNA messaggero (mRNA), verificando l'*up*-regolazione dell'espressione di specifici marcatori dopo il differenziamento cellulare. A tal fine, l'RNA totale è stato estratto

sia dalle cellule differenziate che dai controlli indifferenziati usando il reagente Trizol® (Sigma-Aldrich) e seguendo il protocollo della ditta produttrice. Dopo la quantificazione tramite lo spettrofotometro Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Amburgo, Germania), l'RNA isolato è stato analizzato per l'espressione di CD34, PDGFR $\alpha$  (*Platelet-derived Growth Factor Receptor alpha*), VE-caderina (*Vascular Endothelial cadherin*), CD31, vWF (*von Willebrand Factor*) e FVIII. Per la quantificazione relativa, l'espressione del gene target in tutti i campioni testati è stata identificata come una differenza *n-fold* rispetto ad un campione di riferimento chiamato "calibrator", rappresentato in questo studio da cellule endoteliali della vena ombelicale umana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC). Dopo la stabilizzazione in coltura, l'RNA totale delle cellule HUVEC è stato isolato e quantificato come descritto precedentemente. Per la qPCR, l'RNA totale (500 ng per 100 $\mu$ L del volume finale di reazione) isolato dai campioni e dal "calibrator" è stato retrotrascritto usando *random primer* e l'enzima trascrittasi inversa *Multi-Scribe Reverse Transcriptase* contenuti nel kit *High-Capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La miscela di reazione è stata incubata per 10 min a 25°C e poi a 37°C per 120 min. In seguito, i livelli trascrizionali (i.e., livelli di espressione genica) dei geni target sono stati misurati attraverso una *Real-Time PCR* quantitativa (qPCR), usando metodi di quantificazione relativa (calcolo del parametro  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). La reazione di PCR è stata validata verificando che le efficienze di amplificazione dei geni target e del gene *housekeeping* gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) fossero simili. Inoltre, per la quantificazione dell'espressione dei marcatori endoteliali sopra menzionati sono stati utilizzati primer specifici marcati con sonde TaqMan® (*TaqMan® Gene Expression Assays* acquistati dalla ditta Applied Biosystems ed elencati in **Tabella 1**).

| Target Gene    | TaqMan® Probe ID | Species | Amplicon Length (bp) |
|----------------|------------------|---------|----------------------|
| CD34           | Hs02576480_m1    | Human   | 63                   |
| PDGFR $\alpha$ | Hs00998026_m1    | Human   | 60                   |
| VE-cadherin    | Hs00170986_m1    | Human   | 70                   |
| CD31           | Hs01065282_m1    | Human   | 67                   |
| vWF            | Hs01109446_m1    | Human   | 56                   |
| FVIII          | Hs00252034_m1    | Human   | 127                  |

**Tabella 1. Oligonucleotidi per l'analisi di qPCR.** *TaqMan® Gene Expression Assays* usati per l'amplificazione dei rispettivi geni target.

L'analisi di qPCR è stata eseguita usando lo strumento ABI PRISM 7300 *Sequence Detection System*, preparando una miscela di reazione (30  $\mu$ L) contenente 15  $\mu$ L di *TaqMan Universal PCR Master Mix 2x*, 1,5  $\mu$ L di 20 $\times$  *TaqMan Gene Expression Assay* (Applied Biosystems), 12,5  $\mu$ L di acqua e 1  $\mu$ L di cDNA. Sono stati eseguiti 50 cicli di amplificazione a 95°C (15 secondi, sec) e 60°C (1 min). I livelli di espressione

dell'mRNA sono stati normalizzati rispetto all'espressione di GAPDH quantificata per ciascun campione.

#### 2.6.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA TRAMITE CITOFLUORIMETRIA

Dopo l'analisi qPCR, l'attivazione di specifici marker endoteliali da parte delle Ad-MSK differenziate è stata valutata tramite uno studio di espressione proteica. L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita marcando le cellule differenziate per 21 gg e le colture indifferenziate con i seguenti anticorpi primari: anti-CD34 e anti-CD31 coniugati con FITC; anti-VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) e anti-VE-caderina coniugati con cianina PerCP-Cy™5.5 (PC 5.5) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

#### 2.7 ESPRESSIONE E RILASCIO DEL FATTORE VIII (FVIII) DELLA COAGULAZIONE

La capacità delle Ad-MSK di rilasciare FVIII dopo la stimolazione endoteliale è stata valutata tramite la tecnica Dot blot. Il terreno di coltura delle cellule Ad-MSK differenziate per 7, 14 e 21 gg e dei rispettivi controlli indifferenziati è stato prelevato e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi. Per l'analisi Dot blot, i campioni (8 µL) sono stati depositati su una membrana Immobilon® (Merck-Millipore, Darmstadt, Germania) per 90 min a TA. La membrana è stata poi trattata per 2 h con PBS contenente il 5% (p/p) di latte scremato e incubata per 2 h con l'anticorpo primario anti-*human* FVIII (Affinity Biologicals, Hamilton, ON, Canada) in PBS/latte scremato. Dopo i lavaggi (3 × 5 mL, per 10 min), la membrana è stata incubata per 2 h con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi (Affinity Biologicals). La membrana è stata infine colorata con l'ECL® staining kit (GE-Healthcare, Buckinghamshire, Regno Unito) e visualizzata con il dispositivo di *imaging* a chemiluminescenza Molecular Imager VersaDoc MP4000 (BioRad, Hercules, CA, USA) per il rilevamento dell'immunoblot e l'acquisizione dell'immagine. Per l'analisi semiquantitativa dell'espressione proteica è stata eseguita un'analisi densitometrica del Dot blot usando il software Image J e normalizzando i dati rispetto i campioni indifferenziati.

#### 2.8 VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ DI COAGULAZIONE DEL SANGUE

La presenza del FVIII biologicamente attivo nel surnatante delle Ad-MSK è stata determinata con il test aPTT (tempo di tromboplastina parziale attivata), che definisce il tempo, in secondi, necessario per la formazione di un coagulo. L'aPTT è stato valutato usando il kit HemosIL aPTT SynthASil con fosfolipidi sintetici e silice come attivatori e lo strumento *Automated Coagulation Laboratory (ACL) analyzer* (ACL TOP 700 e ACL TOP 500, Instrumentation Laboratory SpA, Milano, Italia). Il range di valori normali di aPTT *ratio* è 0,82-1,20. Il test si è basato sul confronto delle capacità dei differenti campioni di correggere l'aPTT di un plasma totalmente

deficitario di FVIII, ma contenente una quantità normale degli altri fattori. Quindi, l'aPTT è stato misurato su un plasma umano deficitario del FVIII o una miscela (1:1) del plasma deficitario e terreno di coltura raccolto da Ad-MSD non trattate (campione 1) e cellule trattate con stimoli endoteliali per 7 (campione 2) e 14 gg (campione 3). Inoltre, ad ogni campione è stato aggiunto l'anticoagulante citrato di sodio (9:1). I risultati sono stati presentati come tempo aPTT (sec), aPTT *ratio* e attività del FVIII (%).

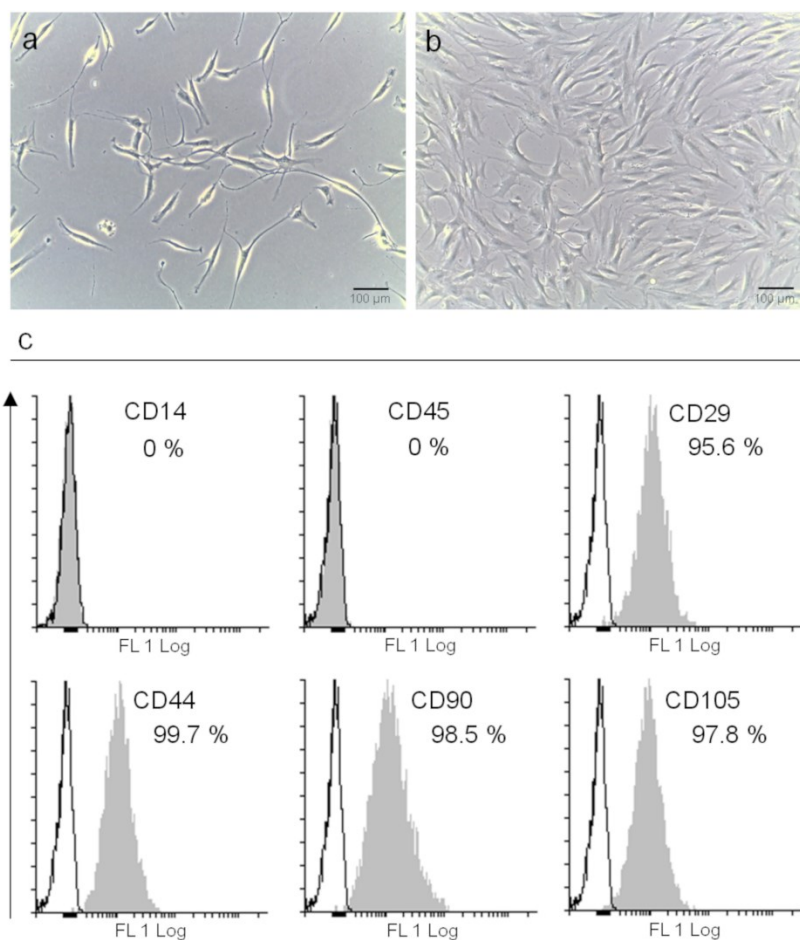
## **2.9 ANALISI STATISTICHE**

Tutti i dati sono stati espressi come la media di almeno tre differenti esperimenti  $\pm$  la deviazione standard. La significatività statistica è stata determinata eseguendo il Test T non appaiato. Le differenze tra i campioni sono state considerate significative con  $p\text{-value} \leq 0,05$ .

### 3. RISULTATI

#### 3.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE COLTURE Ad-MSC

Le cellule Ad-MSC sono state innanzitutto analizzate per le loro caratteristiche di staminalità. La caratterizzazione morfologica delle Ad-MSC tramite microscopia ottica ha evidenziato la loro forma allungata (i.e., *spindle-shaped*), tipica delle cellule mesenchimali/stromali, successivamente mantenuta nei vari passaggi di sub-coltura (**Figura 1 a,b**). Contemporaneamente, l'immunofenotipo specifico delle cellule Ad-MSC è stato caratterizzato tramite citofluorimetria e definito come CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> (**Figura 1c**).

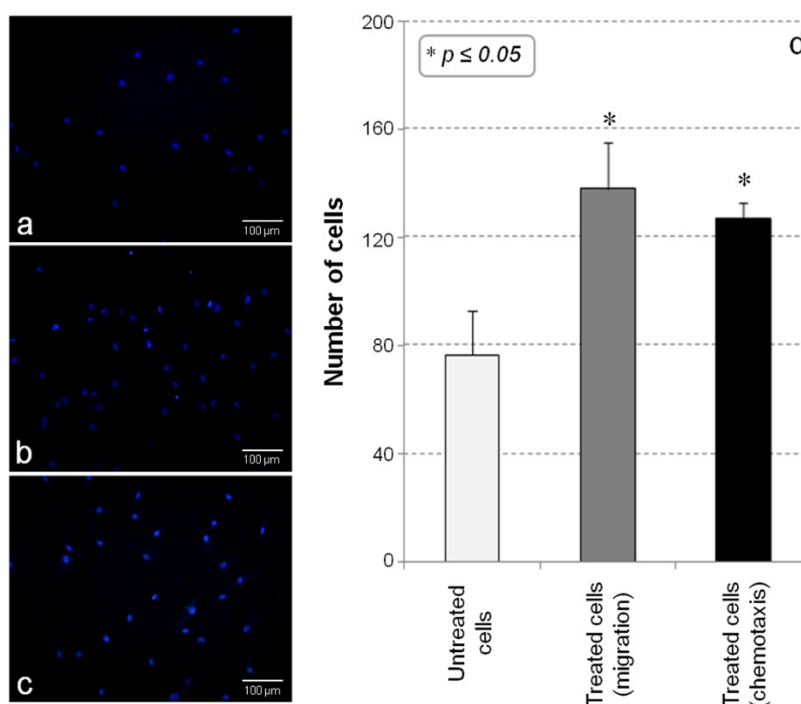


**Figura 1. Caratterizzazione delle colture Ad-MSC.** Analisi morfologica tramite microscopio ottico al passaggio 3, in condizioni di sub-confluenza (**a**) e confluenza (**b**) (*Scale bar*: 100 µm). (**c**) Valutazione citometrica dell'immunofenotipo delle cellule Ad-MSC. I dati sono presentati come percentuale di cellule positive (profilo grigio) rispetto ai controlli isotipici (profilo bianco).

#### 3.2 CAPACITÀ DI MIGRAZIONE CELLULARE

La capacità delle cellule Ad-MSC di rispondere al microambiente endoteliale è stata valutata testando la loro migrazione attraverso un filtro poroso sotto la stimolazione di fattori endoteliali (VEGF, hFGF-b, EGF, IGF-1, eparina, e acido

ascorbico), che erano presenti sul lato superiore o inferiore della membrana. La Figura 2 mostra le immagini della coltura non trattata (**Figura 2 a**) e le cellule trattate con il terreno endoteliale (**Figura 2 b,c**). La conta dei nuclei dimostra che le cellule Ad-MSC sono responsive al microambiente endoteliale, come evidenziato dal significativo aumento ( $p \leq 0,05$ ) del numero di cellule che attraversano il filtro rispetto alla coltura di controllo (**Figura 2 d**). In particolare, i fattori di crescita endoteliali specifici hanno mostrato l'abilità sia di stimolare la migrazione cellulare che di esercitare un forte effetto chemiotattico sulle colture trattate.

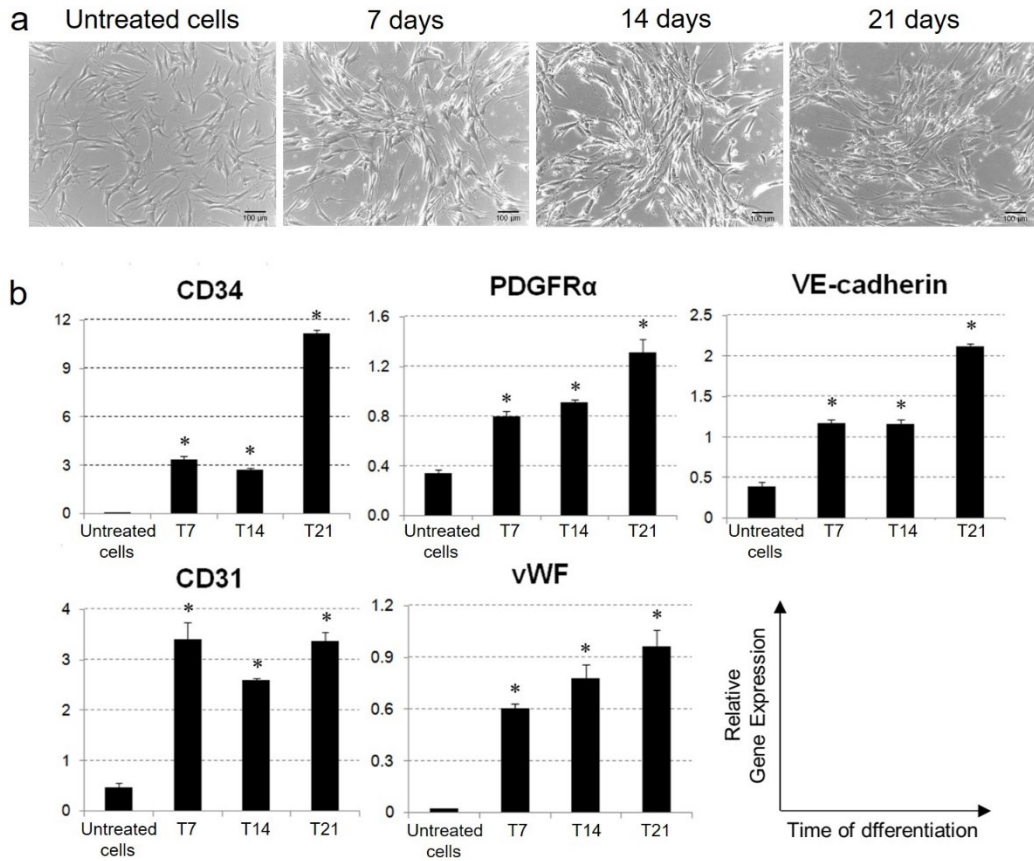


**Figura 2. Valutazione della migrazione cellulare.** Analisi al microscopio a fluorescenza delle cellule Ad-MSC migrate attraverso il filtro poroso dopo 24 h di incubazione: cellule non trattate (**a**) in confronto a colture trattate con terreno differenziativo (endoteliale) per la valutazione della migrazione (**b**) o della chemiotassi (**c**) (Scale bar: 100 µm). (**d**) Effetti sulla migrazione cellulare e chemiotassi da parte dei fattori di crescita endoteliale. I risultati sono riportati come media di tre differenti esperimenti  $\pm$  deviazione standard (\*  $p < 0,05$ ).

### 3.3 DIFFERENZIAMENTO ENDOTELIALE

Per testare la responsività delle cellule Ad-MSC al microambiente endoteliale *in vitro*, le cellule sono state sottoposte ad un trattamento di differenziazione specifico attraverso la stimolazione per 7, 14 e 21 gg, con un *medium* di crescita endoteliale contenente fattori di induzione specifici (VEGF, gFGF-b, EGF e IGF-1). In parallelo, le cellule sono state fatte crescere in un *medium* di proliferazione, considerandole come controllo indifferenziato. È stata dimostrata la capacità del trattamento differenziativo di indurre cambiamenti nella morfologia delle Ad-MSC sin dai primi sette giorni di stimolazione. Quando le cellule sono state coltivate in

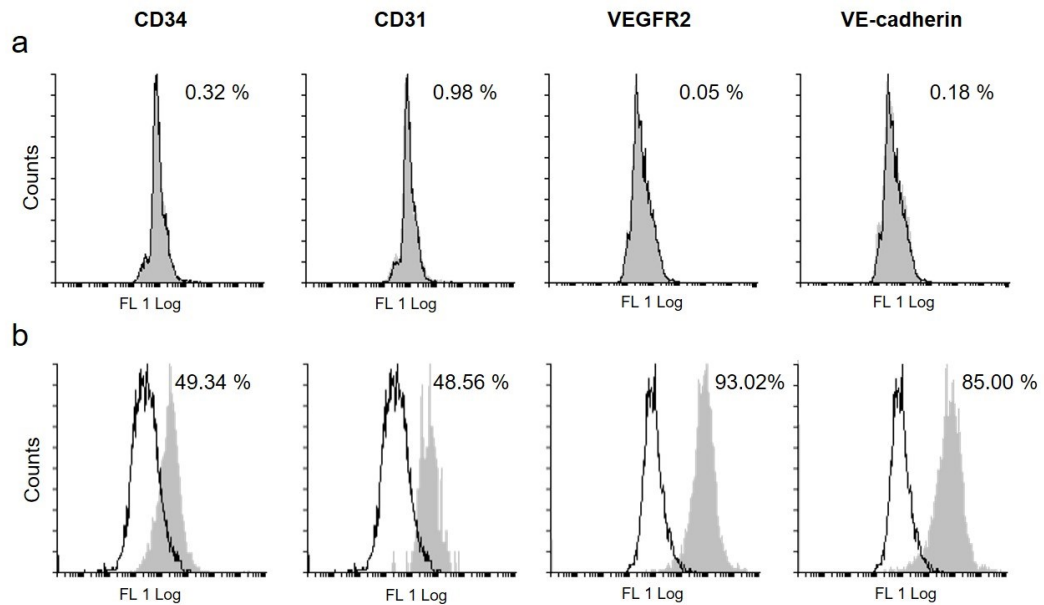
un *medium* endoteliale, hanno bloccato la proliferazione, hanno acquisito una morfologia più allungata e hanno incominciato ad organizzarsi in strutture simil-capillari (**Figura 3 a**).



**Figura 3. Morfologia e profilo di espressione genetica delle cellule Ad-MSC differenziate.** (a) Micrografia a contrasto di fase della popolazione Ad-MSC nel *medium* proliferativo (cellule non trattate) o nel *medium* per il differenziamento endoteliale per 7, 14, 21 gg (*Scale bar*: 100  $\mu$ m). (b) Analisi di *Real-Time* PCR dell'espressione dell'mRNA di marker endoteliali in cellule indifferenziate e trattate con stimoli induttivi per 7 (T7), 14 (T14) e 21 (T21) gg. L'espressione relativa dei geni target è stata definita come una differenza *n-fold* in confronto con il campione "calibrator" (colture HUVEC); l'espressione del gene *housekeeping* (GADPH) è stata considerata per validare l'efficienza di amplificazione dei geni target. Nella parte in basso a destra della figura, sono indicati i parametri presi in considerazione per gli assi x e y degli altri grafici. (\*  $p < 0.01$ ).

Lo studio di espressione genica ha rivelato che il trattamento induttivo specifico ha significativamente stimolato la trascrizione di geni associati al *lineage* endoteliale, quali CD34, PDGFR $\alpha$ , VE-caderina, CD31, vWF. Questo conferma l'elevata responsività delle Ad-MSC al microambiente endoteliale *in vitro* (**Figura 3 b**). L'analisi di citofluorimetria delle cellule Ad-MSC differenziate e dei controlli non trattati conferma i risultati ottenuti dall'indagine di espressione genica, dimostrando che la stimolazione con specifici fattori di crescita aumenta anche l'espressione di proteine vascolari/endoteliali (**Figura 4**). In particolare, le colture Ad-MSC sono risultate negative per CD31, CD34, VEGFR2 e VE-caderina quando

mantenute in condizioni basali (**Figura 4 a**), ma hanno mostrato la capacità di rispondere alla stimolazione endoteliale tramite l'attivazione dell'espressione di queste proteine di *lineage* specifico (**Figura 4 b**).

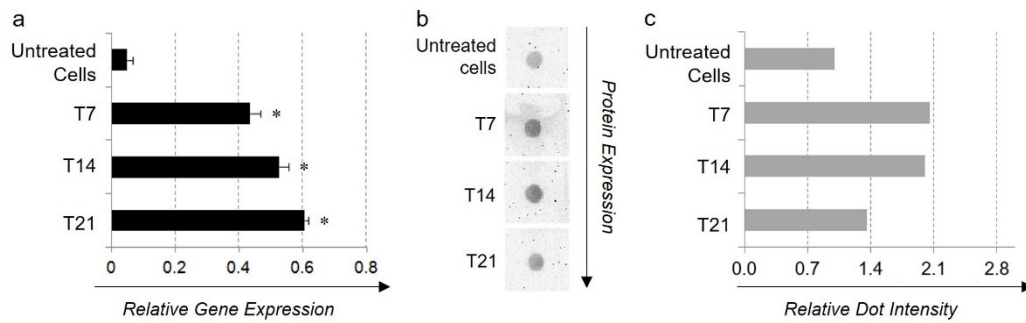


**Figura 4. Studio di espressione proteica.** Studio di citofluorimetria per valutare l'espressione di proteine endoteliali nelle cellule Ad-MSC non trattate (**a**) e mantenute in *medium* induttivo per 21 gg. I dati sono presentati come percentuale di cellule positive (profilo grigio) in confronto al controllo isotipico (profilo bianco).

### 3.4 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE E DEL RILASCIO DEL FVIII

Lo scopo finale del differenziamento delle cellule Ad-MSC è quello di verificare la capacità di stimolare l'espressione e il rilascio del FVIII in risposta ad un trattamento di induzione specifica. Gli studi di espressione genica (**Figura 5 a**) e proteica (**Figura 5 b**) hanno evidenziato che le cellule Ad-MSC esprimevano il gene e la proteina del FVIII in condizioni basali. Quando coltivate nel terreno di coltura endoteliale induttivo, hanno significativamente *up*-regolato la trascrizione del gene FVIII ( $p < 0,01$ ) in confronto al controllo non trattato, mentre non sono state individuate differenze significative tra i campioni trattati (**Figura 5 a**). Inoltre, l'analisi Dot blot eseguita sui surnatanti cellulari ha dimostrato la sintesi e il rilascio sostenuto nel tempo della proteina FVIII (**Figura 5 b**).

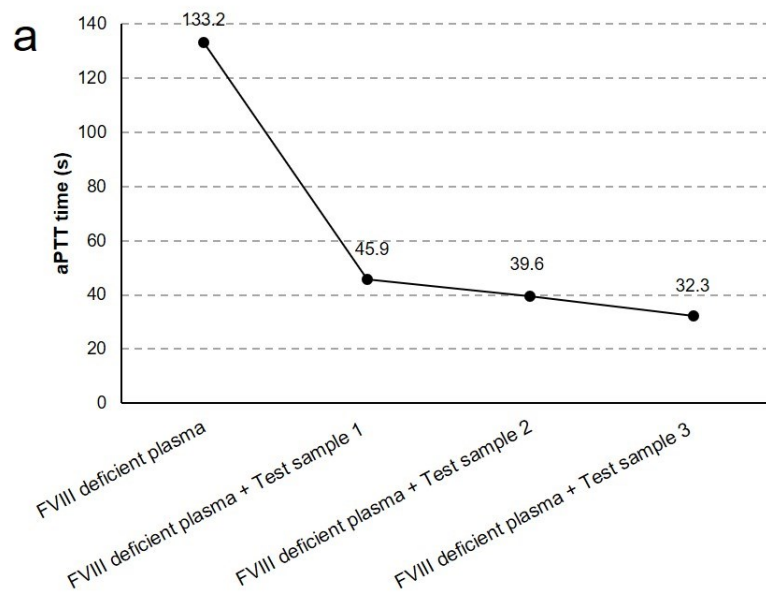




**Figura 5. Espressione del FVIII.** (a) Analisi tramite *Real-Time* PCR dell'mRNA per il FVIII espresso nelle cellule non trattate e nelle colture Ad-MSC mantenute nel *medium* induttivo per 7 (T7), 14 (T14), 21 (T21) gg (\* $p < 0,01$  in confronto con le cellule non trattate). (b) Analisi Dot blot del rilascio di FVIII nel terreno di coltura delle cellule non trattate e delle cellule differenziate per 7 (T7), 14 (T14), 21 (T21) gg. (c) Analisi densitometrica del Dot blot e misurazione dell'intensità relativa dei *dot* proteici, attraverso l'uso del software Image J. I risultati sono stati normalizzati rispetto il campione indifferenziato.

### 3.5 ANALISI DELLA CAPACITÀ DI COAGULAZIONE DEL SANGUE

Il test aPTT è stato svolto con l'obiettivo di investigare gli eventuali effetti del rilascio di FVIII sulla coagulazione del sangue, per definire la funzionalità della proteina. Il terreno di coltura raccolto dalle cellule indifferenziate (campione 1) o dalle cellule Ad-MSC stimolate con fattori endoteliali per 7 (campione 2) e 14 gg (campione 3) è stato miscelato con plasma deficitario di FVIII e il tempo aPTT è stato misurato in secondi (**Figura 6 a**). La correzione dell'aPTT tramite questa miscela, ha suggerito che il campione di Ad-MSC aggiunto conteneva probabilmente il fattore di coagulazione mancante (FVIII), permettendo di ipotizzarne la funzionalità. Inoltre, la correzione del tempo di coagulazione del plasma deficitario è risultata proporzionale alla concentrazione (% attività) del FVIII nel campione (**Figura 6 b**), interpolato con una curva di calibrazione costruita usando del plasma umano. I risultati del test di coagulazione sono stati riportati anche come aPTT *ratio* (aPTT(r)), ovvero il rapporto tra aPTT del paziente e tempo normale di coagulazione (**Figura 6 b**), che viene spesso utilizzato per migliorare la comparabilità dei risultati tra i test eseguiti in laboratori clinici diversi.



**b**

| Sample                                 | aPTT ratio | FVIII activity (%) |
|--|------------|--------------------|
| FVIII deficient plasma                 | 4.47       | 0.2                |
| FVIII deficient plasma + Test sample 1 | 1.54       | 4.1                |
| FVIII deficient plasma + Test sample 2 | 1.33       | 6.9                |
| FVIII deficient plasma + Test sample 3 | 1.08       | 26.2               |

**Figura 6. Test di coagulazione del sangue.** (a) Riduzione dell'aPTT dopo aver miscelato il plasma deficitario del FVIII con il terreno di coltura raccolto dalle cellule indifferenziate (campione 1) e dalle cellule Ad-MSC stimulate con fattori endoteliali per 7 (campione 2) e 14 (campione 3) gg. (b) I risultati dello studio aPTT riportano il valore di aPTT *ratio* e la percentuale di attività del FVIII.

#### 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

---

Nonostante le basi genetiche dell'Emofilia A siano ormai ben note, rimane ancora controversa la fonte cellulare coinvolta nella produzione del fattore VIII della coagulazione. Tuttavia, è stato dimostrato che uno dei principali siti di sintesi di tale fattore è l'endotelio dei sinusoidi epatici. Gupta e colleghi hanno dimostrato come sia possibile sostituire cellule epatiche parenchimali con il trapianto di cellule epatiche o extra-epatiche derivate da donatori sani [10]. Allo stesso modo, la sostituzione di cellule endoteliali (EC) di siti vascolari specifici, come i sinusoidi epatici, potrebbe avere significative implicazioni terapeutiche, in quanto tali cellule giocano un ruolo centrale nello sviluppo, nell'organizzazione, nella riparazione e nella funzionalità del fegato. Inoltre, le cellule endoteliali sono in grado di sintetizzare i fattori della coagulazione e di contribuire al *signaling* intercellulare e all'immunoregolazione. Pertanto, la rigenerazione di un endotelio non più funzionale - non solo del fegato, ma anche di altri organi - mediante l'utilizzo di cellule staminali da donatore sano, può offrire nuove opportunità terapeutiche in ambito medico-clinico.

Diversi autori hanno già dimostrato l'efficacia della terapia cellulare nella correzione del fenotipo emofilico, ricorrendo al trapianto di cellule tessuto-specifiche quali quelle endoteliali mature o cellule staminali derivanti da midollo osseo. In effetti, tra le diverse forme di terapia cellulare, quella basata sull'impiego di cellule staminali piuttosto che di cellule già specializzate, risulta essere la strategia più promettente, in virtù del maggiore potenziale proliferativo e differenziativo delle popolazioni cellulari con caratteristiche di staminalità. In particolare, le principali candidate per l'uso terapeutico in medicina rigenerativa sembrano essere le cellule staminali adulte, identificate in vari tessuti in età post-natale. Esse, pur avendo capacità proliferative e differenziative più limitate rispetto alle cellule staminali embrionali, non sollevano alcun problema di carattere etico per quanto riguarda il loro isolamento ed impiego clinico; inoltre, sono comunque in grado di garantire il proprio autorinnovamento (*self-renewal*) e la sostituzione degli elementi cellulari tessuto-specifici terminalmente differenziati per il turnover fisiologico del distretto in cui sono localizzate, o la riparazione dello stesso in seguito ad infortuni o all'insorgenza di stati patologici. A questa categoria appartengono le cellule staminali derivate dal tessuto adiposo (Ad-MSC) che, grazie alla capacità di differenziare in molteplici tipi cellulari, sono candidate per diverse applicazioni cliniche, dalla riparazione di organi (fegato, pancreas), alla guarigione delle ferite e al trattamento di malattie autoimmuni, neurodegenerative, vascolari e metaboliche. Le capacità rigenerative delle Ad-MSC *in vivo* sono indotte dal loro secretoma, arricchito con una varietà di fattori paracrini (i.e., citochine pro- e anti-infiammatorie, antiossidanti, proangiogenici, interleuchine, antiapoptotici, fattori di crescita come VEGF, HGF, FGF, IGF-1) [8].

Tale secretoma risulta responsabile degli effetti trofici esercitati dalle Ad-MSC sulla protezione, la sopravvivenza e il differenziamento di diverse cellule/tessuti endogeni, oltre che delle loro proprietà immunomodulatorie. Nonostante siano state già studiate e applicate in campo clinico per scopi rigenerativi, le cellule Ad-MSC non erano ancora state considerate per il trattamento dell'Emofilia A.

La ricerca presentata in questo lavoro di tesi ha verificato la possibilità di condizionare, tramite un microambiente endoteliale ricreato *in vitro*, una coltura primaria di Ad-MSC, valutandone la capacità di secernere FVIII dopo una specifica stimolazione. Si tratta del primo studio riportato in letteratura sulla capacità delle cellule staminali adipose di produrre FVIII *in vitro* dopo stimolazione endoteliale e senza ricorrere alla trasfezione genica. Sulla base di questa indagine preliminare *in vitro*, le Ad-MSC saranno testate per il trapianto nella circolazione epatica di modelli di ratto affetti da Emofilia A, al fine di correggere il fenotipo patologico.

Per poter svolgere funzioni di tipo rigenerativo, le cellule staminali devono possedere la capacità di migrare dalla loro nicchia di origine o dal sito dell'impianto al circolo sanguigno, attraverso il quale raggiungono il sito danneggiato (*homing*). Il test effettuato con la "Camera di Boyden", ha confermato che le cellule Ad-MSC esposte a fattori promotori della proliferazione e dell'angiogenesi (VEGF, hFGF-b, EGF, IGF-1, eparina e acido ascorbico), presentano una migliore attività di migrazione e chemiotassi rispetto al controllo non trattato. Poiché questi segnali microambientali possono essere presenti nella nicchia vascolare associata al compartimento sinusoidale endoteliale del fegato, è possibile ipotizzare un effetto istruttivo sul reclutamento delle cellule Ad-MSC durante la somministrazione locale e sistemica della terapia cellulare.

Il potenziale differenziativo delle Ad-MSC in senso endoteliale è già stato ampiamente dimostrato da una serie di studi incentrati sulla promozione dell'angiogenesi dei tessuti danneggiati mediante terapia basata sulle cellule staminali per generare nuove cellule endoteliali. Al contrario, pochissime ricerche hanno pensato di sfruttare questa proprietà per contribuire alla produzione di FVIII e ripristinare la componente delle cellule endoteliali che non è funzionale nei pazienti affetti da Emofilia A. In questo studio, l'acquisizione di caratteristiche simili a quelle di cellule endoteliali da parte di Ad-MSC indotte, è stata dimostrata a livello genico e proteico. Sono stati considerati sia i marker che vengono espressi nella fase precoce, tipici delle cellule staminali/progenitrici (i.e., CD34 e PDGFR $\alpha$ ), ma anche quelli che caratterizzano le cellule endoteliali mature (i.e., CD31, VE-caderina e vWF).

Come evidenziato dai risultati dell'analisi qPCR, nella maggior parte dei casi, l'espressione dei geni target e il periodo di differenziamento erano direttamente proporzionali. Solo l'espressione di CD31 è risultata essere regolata dall'induzione endoteliale e mantenuta allo stesso livello per tutto il periodo di stimolazione.

Diversamente, l'espressione degli altri marcatori genici considerati, risultava crescere gradualmente durante tutta la durata del trattamento induttivo.

Parallelamente, l'analisi di citometria a flusso ha confermato l'acquisizione dell'espressione di CD34, CD31 e VE-caderina nelle Ad-MSC indotte in senso endoteliale, evidenziando anche la positività delle colture stimolate al recettore VEGFR2, che è stato dimostrato essere un marcatore di precursori endoteliali funzionali.

Un ulteriore elemento a sostegno della terapia con cellule staminali per il trattamento dell'Emofilia A è il fatto che un modesto aumento dei livelli di espressione di FVIII è sufficiente per ottenere un fenotipo sano. In questo studio *in vitro*, è stato confermato che le Ad-MSC esprimono il gene FVIII a livelli inferiori nello stato indifferenziato, dimostrando la capacità di aumentarne l'espressione genica nel tempo in risposta agli stimoli specifici forniti dal microambiente endoteliale. Oltre all'espressione dell'mRNA FVIII, è stato fondamentale dimostrare la produzione e la secrezione di proteine all'interno del mezzo di coltura cellulare. Lo studio di espressione proteica ha consentito il rilevamento del FVIII secreto, sia nella coltura indifferenziata che nel surnatante delle cellule trattate. L'esecuzione del test aPTT ha, infine, permesso la valutazione della funzionalità e dell'attività del FVIII secreto. Lo studio ha evidenziato una riduzione significativa del tempo di tromboplastina parziale attivata, proporzionale all'attività del fattore coagulativo, nelle miscele del plasma deficitario del FVIII con i surnatanti delle colture differenziate.

Nel complesso i dati raccolti da questa ricerca hanno confermato l'elevata responsività delle Ad-MSC al microambiente endoteliale, offrendo indicazioni importanti sull'eventuale possibilità di utilizzare queste cellule *in vivo* per ripristinare la capacità coagulativa nel contesto della patologia emofilica.

Gli studi *in vitro*, come questo, non sono sufficienti per definire l'applicabilità, ma soprattutto l'efficacia di un possibile trattamento terapeutico anche a livello clinico. Risulta infatti difficile riprodurre l'eterogeneità e la complessità del microambiente *in vivo*, caratterizzato da un grande numero di fattori solubili e molecole segnale, nonché le reazioni biochimiche che stanno alla base delle interazioni cellule-cellula e cellula-matrice, del turnover e del metabolismo cellulare. Ulteriori difficoltà potrebbero derivare dalla conversione tra concentrazioni *in vitro* e dosi *in vivo* e dal mantenimento della coltura *in vitro* per lunghi periodi.

In conclusione, il presente studio *in vitro*, tramite diversi test tra cui analisi di espressione genica e proteica, ha dimostrato che le Ad-MSC, se opportunamente stimolate con fattori di crescita induttivi tessuto-specifici, sono in grado di esprimere marker specifici del *lineage* endoteliale, e di produrre e secernere il FVIII della coagulazione. Dall'elevata responsività ottenuta nei vari test, le cellule Ad-

MSC possono essere considerate delle ottime candidate per la terapia cellulare, dell'Emofilia A. Queste evidenze sperimentali rappresentano un punto di partenza per l'allestimento di sperimentazioni precliniche su animali modello affetti da Emofilia A.

## 5. BIBLIOGRAFIA

---

- [1] Cafuir LA, Kempton CL. *Current and emerging factor VIII replacement products for hemophilia A*. Therapeutic Advances in Hematology. 2017; 8(10):303-313. doi: 10.1177/2040620717721458.
- [2] Keam SJ. *Efanesoctocog Alfa: First Approval*. Drugs. 2023; 83(7): 633-638. doi: 10.1007/s40265-023-01866-9.
- [3] Pasca S, Zanon E, Mannucci PM, Peyvandi F. *Emicizumab in acquired hemophilia A: pros and cons of a new approach to the prevention and treatment of bleeding*. Blood Transfus. 2023; 21(6): 549-556. doi: 10.2450/2023.0247-22.
- [4] Nathwani AC. *Gene therapy for hemophilia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2022; 2022(1): 569-578. doi: 10.1182/hematology.2022000388.
- [5] Leebeek FWG, Miesbach W. *Gene therapy for hemophilia: a review on clinical benefit, limitations, and remaining issues*. Blood. 2021; 138(11): 923-931. doi: 10.1182/blood.2019003777. PMID: 34232980.
- [6] Fomin ME, Togarrati PP, Muench MO. *Progress and challenges in the development of a cell-based therapy for hemophilia A*. J Thromb Haemost. 2014; 12(12): 1954-65. doi: 10.1111/jth.12750.
- [7] Al-Ghadban S, Artiles M, Bunnell BA. *Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine: Looking Forward*. Front Bioeng Biotechnol. 2022; 9:837464. doi: 10.3389/fbioe.2021.837464. PMID: 35096804; PMCID: PMC8792599.
- [8] Al-Ghadban S, Bunnell BA. *Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Potential*. Physiology (Bethesda). 2020; 35(2):125-133. doi: 10.1152/physiol.00021.2019.
- [9] Barbon S, Stocco E, Rajendran S, Zardo L, Macchi V, Grandi C, Tagariello G, Porzionato A, Radossi P, De Caro R, Parnigotto PP. *In Vitro Conditioning of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by the Endothelial Microenvironment: Modeling Cell Responsiveness towards Non-Genetic Correction of Haemophilia A*. Int J Mol Sci. 2022; 23(13): 7282. doi: 10.3390/ijms23137282.
- [10] Gupta S, Inada M, Joseph B, Kumaran V, Benten D. *Emerging insights into liver-directed cell therapy for genetic and acquired disorders*. Transpl Immunol. 2004; 12: 289-302.