



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

**Rendiconto 5 per mille ANNO 2020**

**Contributo percepito € 361.304,38**

**In data 26.10.2021**

Ente della Ricerca Sanitaria

Denominazione Ente:

**FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**

Codice fiscale: **04724150968**

Sede legale: **Via Francesco Sforza 28 - 20122 MILANO**

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: **protocollo@policlinico.mi.it**

Dati del rappresentante legale: **Dott. Ezio Belleri \***

**Titolo del progetto:**

**IL RUOLO DEL MICROCIRCOLO NELLE MALATTIE NEUROLOGICHE:  
NUOVI INSIGHTS DA MODELLI CELLULARI 3D**

**Resp. Scientifico: Prof.ssa Stefania Corti**

<b>Data di inizio progetto: 01/09/2022</b>	<b>Data di fine progetto: 31/08/2023</b>
<b>Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 50.000,00</b>	<b>Costo complessivo del progetto (se co-finanziato): €</b>

<b>VOCI DI SPESA</b>	<b>COSTO COMPLESSIVO</b>	<b>QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE</b>
Personale di ricerca (borse di studio)		€ 28.000,00
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)		€ 18.000,00
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)		€ 2.000,00

Elaborazione dati		
Spese amministrative		
Altro (spese di pubblicazione)		€ 2.000,00
<b>TOTALE</b>		<b>€ 50.000,00</b>

Il Responsabile del Progetto  
Prof.ssa Stefania Corti

*Stefania Corti*

Il Direttore Generale \*  
Dott. Ezio Belleri

*Ezio Belleri*

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Direttore Generale\*  
Dott. Ezio Belleri

*Ezio Belleri*

\* (per conto del Legale Rappresentante Arch. Marco Giachetti - Deliberazione Consiliare n. 21 del 30.4.2019)

<b>Titolo</b>	<b>IL RUOLO DEL MICROCIRCOLO NELLE MALATTIE NEUROLOGICHE: NUOVI INSIGHTS DA MODELLI CELLULARI 3D</b>
<b>Background e razionale</b>	<p>La disfunzione del microcircolo, anche legata all'invecchiamento, è alla base di molte malattie neurologiche di natura vascolare, ma anche neurodegenerativa. Il microcircolo costituisce circa il 3% del volume cerebrale e il suo ruolo è fondamentale in tutti i processi fisiopatologici del sistema nervoso centrale (SNC).</p> <p>I meccanismi alla base delle interazioni tra patologie vascolari, neurodegenerative e infiammatorie e le alterazioni del microcircolo rimangono attualmente ancora poco chiariti, in parte a causa della mancanza di modelli affidabili che ricapitolano la patologia umana.</p> <p>Negli ultimi anni, si è assistito ad un crescente sviluppo nella ricerca di modelli cellulari basati su cellule staminali. Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), cellule differenziate da iPSC e colture cellulari tridimensionali sono state recentemente utilizzate per studiare molte condizioni umane, comprese le malattie neurologiche, per facilitare gli studi eziopatogenetici e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. L'organoide cerebrale è un tessuto auto-organizzato in grado di riprodurre in miniatura l'architettura e la funzionalità di base dell'encefalo umano. Il grande vantaggio della tecnologia degli organoidi umani è che essi possono riprodurre le caratteristiche di vari processi fisiologici e patologici specifici dell'uomo assenti negli animali e nei modelli cellulari 2D. Gli organoidi forniscono uno strumento rivoluzionario nello studio delle varie patologie partendo da cellule derivate dai pazienti senza procedure invasive.</p> <p>L'introduzione della vascolarizzazione in questi modelli è un punto critico di questa tecnologia affrontato al momento in pochi settings sperimentali.</p> <p>La stragrande maggioranza degli attuali organoidi cerebrali descritti in letteratura sono privi di microvascolarizzazione, con conseguente apporto limitato di ossigeno e nutrienti alle loro parti più interne e con impossibilità di studiare tali aspetti nell'ambito delle patologie neurologiche.</p> <p>Per dare risposta a questo importante quesito in questo progetto svilupperemo organoidi cerebrali vascolarizzati implementando il protocollo da noi recentemente descritto per lo sviluppo di organoidi cerebrali (Faravelli et al., articolo sottomesso) in associazione al protocollo di sviluppo di una vascolarizzazione cerebrale 3D sviluppato da Pham et al., 2018.</p> <p>Utilizzeremo, come sorgente per il modello 3D, in prima istanza cellule iPSC di controllo e successivamente iPSC derivate da un paziente con una malattia neurologica che colpisce in particolare il microcircolo: l'amiloidosi cerebrale.</p> <p>L'angiopatia amiloide cerebrale (CAA) è una malattia dei piccoli vasi nota per essere la causa più frequente di emorragia cerebrale spontanea e comporta un progressivo declino delle funzioni cognitive e gravi disabilità. La CAA è causata dall'accumulo di fibrille amiloidi A<math>\beta</math> nelle pareti dei vasi sanguigni arteriosi di piccole e medie dimensioni e nei capillari del parenchima del sistema nervoso centrale e delle leptomeningi. Gli accumuli di questa proteina sono evidenti e causano la malattia di Alzheimer (AD) se localizzati a livello parenchimale. I meccanismi che spiegano la diversa localizzazione dei depositi nel cervello non sono del tutto chiariti e di conseguenza mancano trattamenti specifici. Numerose</p>

	<p>proteine sono associate all'A<math>\beta</math> depositato nelle placche parenchimali e/o nei vasi cerebrali come l'inibitore tissutale delle metalloproteinasi-3 (TIMP3), la norrina (NDP), il collagene-<math>\alpha</math>-2(VI) (COL6A2) o la ripetizione del sushi contenente proteine -1 (SRPX1).</p> <p>In questo progetto, genereremo e caratterizzeremo organoidi cerebrali vascolarizzati da linee iPS controllo e da una linea iPS CAA eseguendo una caratterizzazione neuropatologica per dimostrare che questi modelli ricapitolano le principali caratteristiche delle strutture cerebrali normali e di CAA. Questi esperimenti genereranno dati preliminari che ci permetteranno di preparare una proposta per bandi nazionali/internazionali sull'uso degli organoidi cerebrali vascolarizzati come sistema di modello in vitro di CAA. Ci aspettiamo che il completamento di questi obiettivi fornisca importanti conoscenze sulla patogenesi e sullo sviluppo terapeutico per i pazienti affetti da CAA e altre malattie neurodegenerative e vascolari.</p>
<p><b>Obiettivi</b></p>	<p><b>Obiettivo 1: Generazione di organoidi cerebrali vascolarizzati controllo e CAA.</b></p> <p>Gli organoidi cerebrali sono stati utilizzati per ricapitolare i processi di sviluppo cerebrale e alcune malattie neurologiche. Tuttavia, la mancanza di vasi sanguigni e di microcircolo, che regolano la neurogenesi e alla base di diversi disturbi cerebrali, limita l'utilizzo degli organoidi cerebrali. Data l'origine mesodermica delle cellule endoteliali e l'origine ectodermica delle cellule neuronali, un ostacolo alla generazione di organoidi cerebrali vascolarizzati è rappresentato dalla difficoltà di applicare simultaneamente due diversi protocolli di induzione differenziativa.</p> <p>Per superare questa difficoltà, sono state proposte sperimentalmente varie strategie, spesso complicate e non completamente efficaci. Ci proponiamo di seguire quella che attualmente ha il migliore compromesso di fattibilità e resa, migliorandola (Pham et al., 2018). Per la generazione di organoidi cerebrali utilizzeremo una modifica del metodo free floating in bioreattori sviluppato nel nostro laboratorio (Faravelli et al., manuscript sottomesso) partendo da iPSC controllo e CAA (una linea per tipo). Parallelamente, differenzieremo cellule endoteliali dalle stesse iPSC di partenza e le incorporeremo negli organoidi in sviluppo (giorno 30) per vascolarizzarli (Pham et al., 2018). Dopo due settimane verificheremo la presenza di strutture CD31+ che circondano l'organoide con complessi strutture simili a capillari che crescono nei suoi strati esterni e interni.</p> <p><b>Obiettivo 2: Caratterizzazione di organoidi cerebrali vascolarizzati controllo e CAA.</b></p> <p>Per verificare il corretto differenziamento delle cellule endoteliali (EC), eseguiremo PCR quantitative e analisi immunocitochimiche per determinare l'espressione di geni vascolari specifici (PECAM1, VE-caderina, VWF, VEGFR1, VEGFR2 e PDGFR<math>\beta</math>).</p> <p>L'organizzazione corticale neuronale e la formazione dei vasi sanguigni saranno monitorate mediante analisi immunocitochimica seguita da analisi confocale. Esamineremo varie popolazioni di cellule vascolari, strutture della barriera ematoencefalica (BBB), morte cellulare e caratteristiche delle cellule corticali in organoidi cerebrali vascolarizzati. Tutte le analisi saranno condotte a 70 giorni di sviluppo degli organoidi. Eseguiremo ricostruzioni tridimensionali al confocale, anche con metodica whole mount, per determinare la corretta morfologia dei vasi e del loro lume. Per determinare la funzionalità dell'endotelio valuteremo la sua capacità di incorporare la DiI-lipoproteina acetilata a bassa densità (DiI-Ac-LDL). Per determinare se le EC sviluppino caratteristiche simili alla BBB esamineremo l'espressione di proteine delle tight junctions, Claudin5 (CLDN5) e ZO-1, e il trasportatore di efflusso p-Glycoprotein che aiuta il riciclo delle piccole molecole lipofile dall'endotelio al flusso sanguigno.</p>

Per valutare la maturazione degli organoidi cerebrali, eseguiremo analisi di immunocitochimica e Real-time RT PCR a diversi stadi di sviluppo per diversi marcatori neuroectodermici e di differenziamento neuronale tra cui PAX6 e p-VIM, TBR2, DCX, il marcatore neuronale maturo TUJ1 e i marcatori dello strato corticale (TBR1, CTIP2, SATB2, REELIN). La funzionalità degli organoidi sarà monitorata mediante calcium imaging. Monitoreremo inoltre la presenza di cellule astrocitarie positive per S100 o GFAP. Analizzeremo le strutture neurovascolari (endotelio/astrociti/neuroni regionalmente organizzati) mediante microscopia confocale ed elettronica. Valuteremo l'eventuale incremento di cellule neuronali in presenza di microcircolo.

Monitoreremo l'espressione di marcatori di infiammazione (IL-1/IL-6/TNFalpha), l'accumulo di A $\beta$  vascolare e parenchimale, la variazione numerica dei processi sinaptici e altri fenotipi patologici associati ad aspetti di malattia del piccolo vaso negli organoidi CAA.

Gli organoidi vascolarizzati possono servire da modello per studiare le malattie e le patologie neurovascolari e del microcircolo umane. Inoltre, lo sviluppo di organoidi cerebrali vascolarizzati aprirà la strada ad altre applicazioni in medicina, tra cui studi di farmacodinamica per valutare la permeabilità dei farmaci sui vasi cerebrali. Con il nostro studio otterremo ulteriori conoscenze sulla fisiopatologia alla base della CAA e forniremo importanti strumenti per lo sviluppo terapeutico per i pazienti con danno del microcircolo associati a CAA e ad altre malattie neurodegenerative e cerebrovascolari.