

Relazione dell'attività scientifica svolta dal Centro di Ricerca "E. Menni", Fondazione Poliambulanza-Istituto Ospedaliero di Brescia nell'ambito del progetto "Valutazione dell'effetto delle cellule mesenchimali staminali isolate da placenta umana a termine caricate con il chemioterapico Paclitaxel nel controllo della progressione del carcinoma ovarico epiteliale"

Il carcinoma ovarico epiteliale è un tumore raro (incidenza di 17 casi su 100000 per anno) con una particolare elevata mortalità [AIOM Linee guida Tumori dell'ovaio 2015]. Oltre alle classiche terapie (chirurgia, chemioterapie, radioterapia, ormonoterapia) strategie terapeutiche innovative si stanno sviluppando per ottimizzare l'efficacia dei trattamenti antitumorali (e diminuire la loro tossicità sistemica).

Le cellule mesenchimali staminali/stromali (MSC) da diversi tessuti rappresentano una strategia innovativa per il controllo della progressione tumorale. Di particolare interesse è la loro capacità migratoria verso il sito tumorale^{1,2}. Inoltre, è stato dimostrato che le MSC sono in grado di incorporare chemioterapici senza che essi siano citotossici per la cellula mesenchimale³⁻⁷. Più recentemente il nostro gruppo, il Centro di Ricerca E. Menni (CREM) della Fondazione Poliambulanza, diretto dalla Prof.ssa Ornella Parolini, ha dimostrato che le MSC dalla membrana amniotica (hAMSC) di placenta umana a termine rappresentano non solo un notevole e versatile strumento terapeutico nell'ambito della medicina rigenerativa ma anche di poter avere un possibile utilizzo nel settore oncologico. In particolare le hAMSC sono in grado di incorporare il Paclitaxel (agente chemioterapico utilizzato per il trattamento di diverse neoplasie) e di rilasciarlo *in vitro*⁸, oltre ad avere un effetto anti-proliferativo sulle tumorali *per se*⁹. Le MSC da membrana amniotica sono facilmente reperibili e, trattandosi di materiale di scarto, il recupero e utilizzo delle MSC derivate da tali tessuti è eticamente accettato. Per di più, cellule derivate dalla membrana amniotica non esprimono antigeni MHC di classe II, presentano invece molecole quali HLA-G con funzione immunomodulante, suggerendo pertanto il loro possibile utilizzo in clinica soprattutto nei trapianti allogenici.

L'OBIETTIVO PRINCIPALE di questo progetto è la valutazione del potenziale effetto terapeutico delle cellule mesenchimali staminali da placenta umana a termine caricate con il chemioterapico Paclitaxel (PTX) nel controllo della progressione del carcinoma ovarico epiteliale.

Nello specifico, il raggiungimento di questo obiettivo prevede la realizzazione dei 3 seguenti obiettivi intermedi:

- a. la messa a punto di un modello di coltura *in vitro* tridimensionale di tumore ovarico
- b. preparazione delle hAMSC-PTX e CM-hAMSC-PTX
- c. valutazione dell'effetto anti-proliferativo delle hAMSC-PTX e CM-hAMSC-PTX su biopsie di tumore ovarico epiteliale

a. Per il modello *in vitro* da utilizzare, abbiamo scelto di mettere a punto un modello di sferoidi tumorali. Le cellule tumorali all'interno dello sferoide riproducono la stessa disposizione tridimensionale ed, allo stesso tempo, hanno un pattern di crescita simile ai tumori solidi nello stadio iniziale non vascolarizzato. Queste caratteristiche fanno degli sferoidi tumorali multicellulari un sistema più vicino alla struttura tumorale *in vivo* e li rendono un ottimo modello tridimensionale *in vitro* per lo studio dei diversi tumori. Inoltre, questo modello è particolarmente rilevante per il tumore ovarico che si diffonde come cellule tumorali che sopravvivono come aggregati cellulari o sferoidi nel fluido tumore peritoneale (ascite) e si diffondono per estensione diretta negli organi adiacenti la cavità peritoneale (colon, vescica, fegato, etc). Ampia semina di questi sferoidi spesso si constata in stadio avanzato e recidiva di malattia. Per questo progetto abbiamo scelto di sviluppare sferoidi *in vitro* avvalendoci di 3 differenti linee cellulari di carcinoma ovarico metastatico e di cellule primarie derivate da biopsie di liquido ascitico.

b. Le cellule mesenchimali stromali dalla membrana amniotica (hAMSC) di placenta umana a termine, raccolte dopo rilascio di consenso informato da parte della madre, sono state isolate e caratterizzate come descritto precedentemente utilizzando protocolli già in utilizzo presso il CREM¹⁰. Le hAMSC sono state caricate con il farmaco PTX come precedentemente descritto⁸. Nello specifico, le hAMSC sono state messe in coltura con PTX per 24 ore per la fase di incorporazione del farmaco. Dopo 24h dall'aggiunta di PTX le hAMSC sono state riseminate senza PTX per la fase di rilasciamento del farmaco nel terreno di coltura (CM-hAMSC-PTX).

c. Successivamente abbiamo studiato l'effetto delle hAMSC caricate o meno con PTX sulla proliferazione di sferoidi ottenuti da differenti linee cellulari di carcinoma ovarico e da diverse primarie derivate da biopsie di liquido ascitico. Gli sferoidi sono stati lasciati crescere per circa 1 giorno e successivamente sono stati messi in co-coltura con le hAMSC caricate o meno con paclitaxel. I risultati preliminari ottenuti da dimostrano che le hAMSC caricate con PTX e il loro CM hanno un effetto di inibizione della proliferazione delle cellule di carcinoma ovarico in un modello di coltura 3D quali gli sferoidi ottenuti sia da linee cellulari tumorali sia da cellule da paziente.

Inoltre, studi preliminari per determinare l'effetto del terreno rilasciato dalle hAMSC (caricate o meno con PTX) sulla migrazione di cellule da ascite hanno dimostrato che il terreno condizionato da hAMSC caricate con PTX (CM-hAMSC-PTX) è in grado di inibire la migrazione di cellule da ascite in modo significativo rispetto al controllo.

Pertanto, questi dati sono indicativi di un potenziale effetto delle hAMSC nel controllo della proliferazione tumorale e questo progetto sarà oggetto di ulteriori approfondimenti.

REFERENZE

1. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M, Marini FC. Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging. *Stem cells* (Dayton, Ohio) 2009;27.
2. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene therapy* 2008;15:730-8.
3. Bonomi A, Cocce V, Cavicchini L, Sisto F, Dossena M, Balzarini P, Portolani N, Ciusani E, Parati E, Alessandri G, Pessina A. Adipose tissue-derived stromal cells primed in vitro with paclitaxel acquire anti-tumor activity. *International journal of immunopathology and pharmacology* 2013;26:33-41.
4. Pacioni S, D'Alessandris QG, Giannetti S, Morgante L, De Pascalis I, Cocce V, Bonomi A, Pascucci L, Alessandri G, Pessina A, Falchetti ML, Pallini R. Mesenchymal stromal cells loaded with paclitaxel induce cytotoxic damage in glioblastoma brain xenografts. *Stem cell research & therapy* 2015;6:194.
5. Pascucci L, Cocce V, Bonomi A, Ami D, Ceccarelli P, Ciusani E, Vigano L, Locatelli A, Sisto F, Doglia SM, Parati E, Bernardo ME, Muraca M, Alessandri G, Bondiolotti G, Pessina A. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2014;192:262-70.
6. Pessina A, Bonomi A, Cocce V, Invernici G, Navone S, Cavicchini L, Sisto F, Ferrari M, Vigano L, Locatelli A, Ciusani E, Cappelletti G, Cartelli D, Arnaldo C, Parati E, Marfia G, Pallini R, Falchetti ML, Alessandri G. Mesenchymal stromal cells primed with paclitaxel provide a new approach for cancer therapy. *PloS one* 2011;6:e28321.
7. Pessina A, Cocce V, Pascucci L, Bonomi A, Cavicchini L, Sisto F, Ferrari M, Ciusani E, Crovace A, Falchetti ML, Zicari S, Caruso A, Navone S, Marfia G, Benetti A, Ceccarelli P, Parati E, Alessandri G. Mesenchymal stromal cells primed with Paclitaxel attract and kill leukaemia cells, inhibit angiogenesis and improve survival of leukaemia-bearing mice. *British journal of haematology* 2013;160:766-78.
8. Bonomi A, Silini A, Vertua E, Signoroni PB, Cocce V, Cavicchini L, Sisto F, Alessandri G, Pessina A, Parolini O. Human amniotic mesenchymal stromal cells (hAMSCs) as potential vehicles for drug delivery in cancer therapy: an in vitro study. *Stem cell research & therapy* 2015;6:155.
9. Magatti M, De Munari S, Vertua E, Parolini O. Amniotic membrane-derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. *Journal of cellular and molecular medicine* 2012;16:2208-18.
10. Magatti M, Pianta S, Silini A, Parolini O. Isolation, Culture, and Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from the Amniotic Membrane of the Human Term Placenta. *Methods in molecular biology* 2016;1416:233-44.