UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

SCIENZE BIOLOGICHE

Utilità clinica delle cellule staminali mesenchimali nel trattamento della malattia di Alzheimer

Tesi di Laurea di:

Alice Fraccaroli

Docente Referente:

Chiar.mo Prof.
Oliana Carnevali

Sessione:
Anno Accademico: 2022-2023

MALATTIA DI ALZHEIMER

La **malattia di Alzheimer** è una **patologia neurodegenerativa** a **decorso cronico** e **progressivo**. Essa costituisce la causa più comune di **demenza,** soprattutto negli anziani.



La percentuale di persone con malattia di Alzheimer aumenta con l'età:

- **Età 65-74:** 3%
- **Età 75-84**: 17%
- **Età ≥ 85:** 32%

La patologia è 2 volte più frequente nelle donne rispetto agli uomini, in parte perché le donne hanno una maggiore aspettativa di vita.

Dal **5 al 15%** dei casi circa è **familiare**. Metà di questi casi ha un **esordio precoce** (presenile, < 65 anni).

Nella maggior parte dei casi, l'**eziologia della malattia** di Alzheimer è sconosciuta. Essa è tipicamente correlata a specifiche **mutazioni genetiche** (almeno **5 diversi loci genici,** localizzati sui **cromosomi 1, 12, 14, 19 e 21)**

- Le mutazioni nei geni per la **proteina precorritrice dell'amiloide**, della **presenilina I** e **presenilina II** possono alterare la processazione della proteina precursore dell'amiloide, conducendo alla deposizione e all'aggregazione di **fibrille di beta-amiloide**, che è il principale componente delle **placche neuritiche** (o **senili**).

Il β-amiloide può anche alterare le attività di chinasi e fosfatasi in modi che alla fine portano all'**iperfosforilazione di tau** (proteina che stabilizza i microtubuli) e alla formazione di **grovigli neurofibrillari.**

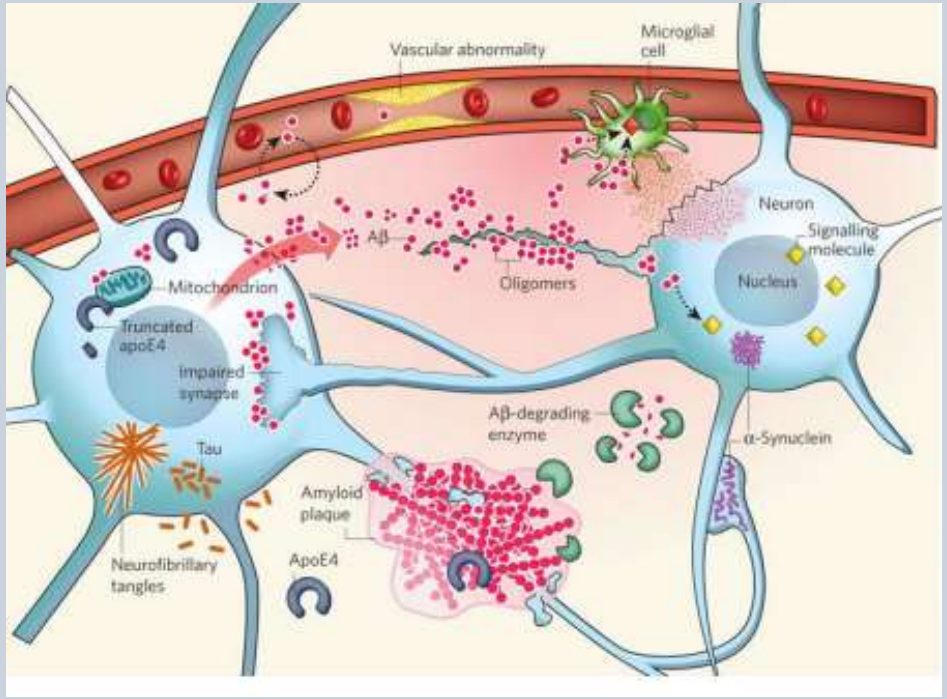


Figura 1: Placche neuritiche e grovigli neurofibrillari

- Altri fattori genetici comprendono gli **alleli epsilon** dell'**apolipoproteina E** (**apoE**). Le proteine apo E influenzano il deposito di beta-amiloide, l'integrità del citoscheletro e l'efficacia della riparazione neuronale.

- Anche i **fattori di rischio vascolare** (ad es. ipertensione, diabete, fumo, ecc.) possono aumentare il rischio di malattia di Alzheimer., mentre, non è ancora stata stabilita una relazione della malattia con altri fattori (ad es. bassi livelli ormonali o esposizione a metalli).

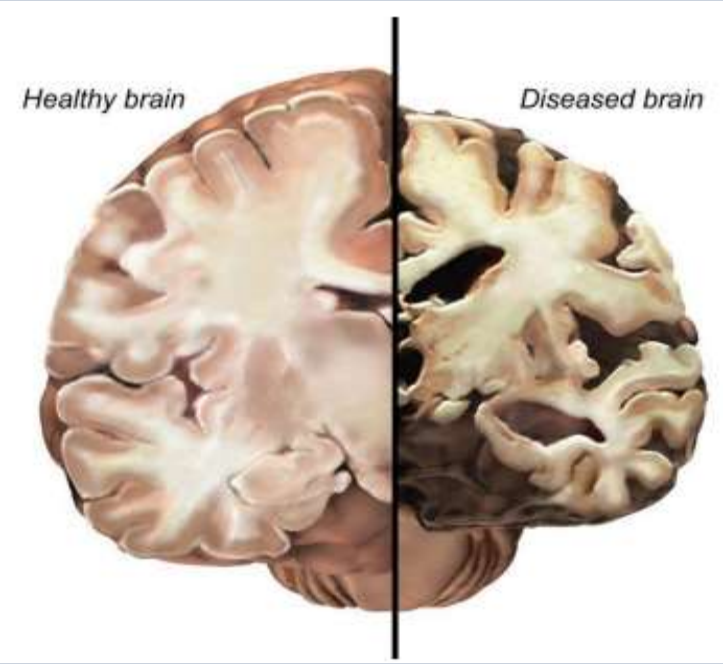


Figura 2: Alterazioni morfologiche di cervello con Alzheimer

- Le **placche neuritiche** sono formazioni extracellulari costituite da un nucleo in cui si accumula **proteina amiloide**, e una parte periferica in cui si depositano **detriti neuronali** (processi assonici o dendritrici degenerati).

- I **grovigli neurofibrillari** si formano in seguito alla deposizione anomala di proteina tau iperfosforilata (coppie di tau si attorcigliano l'uno intorno all'altra) a livello del **corpo cellulare dei neuroni**.

L'accumulo di **beta-amiloide** e i **grovigli neurofibrillari** determinano morte neuronale, perdita di sinapsi neuronali e deficit progressivo di neurotrasmettitori, che si traduce in un'**atrofia grossolana** delle zone colpite del cervello (**IPOTESI AMILOIDE**)

PRINCIPALI SINTOMI DELLA MALATTIA DI ALZHEIMER

- **Perdita di memoria a breve termine;**
- **Ragionamento deteriorato**, difficoltà nella **gestione di attività complesse** e **scarsa capacità di giudizio**;
- **Disfunzione del linguaggio** (ad es. difficoltà a pensare parole comuni, errori di pronuncia e/o di scrittura)
- **Disfunzione visuospaziale** (ad es. incapacità di riconoscere volti o oggetti comuni);
- **Disturbi comportamentali** (ad es. vagabondaggio, agitazione, urla, idee di persecuzione);

APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Le **cellule staminali mesenchimali** (**MSC**) sono cellule staminali somatiche che possono essere isolate da varie fonti, tra cui:

- midollo osseo;
- tessuto adiposo;
- cordone ombelicale;
- liquido amniotico;
- placenta;

Originariamente le MSC venivano identificate come **cellule stromali** (o di supporto) per le cellule staminali ematopoietiche nel midollo osseo.

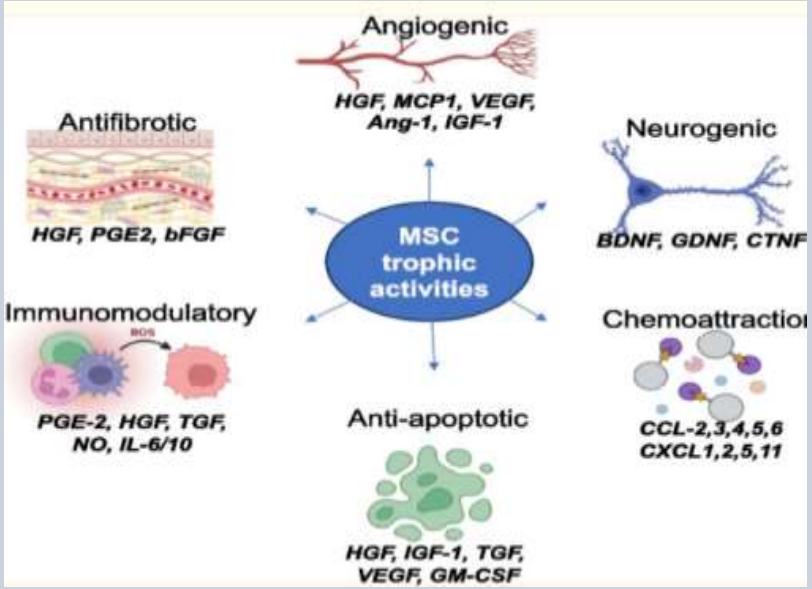


Figura 3: funzioni trofiche chiave delle MSC e dei fattori bioattivi partecipanti alla riparazione dei tessuti e all'immunomodulazione

Ricerche recenti hanno fornito prove che le MSC esercitano **effetti terapeutici** non solo attraverso l'**attecchimento** e la **differenziazione**, ma anche attraverso la secrezione di **molecole biologicamente attive** (fattori di crescita) che esercitano effetti benefici su altre cellule.

I fattori secreti dalle MSC mediano le funzioni **angiogenica, mitogenica, antifibrotica, anti-apoptotica, anti-cicatrice** e **neurogena**.

Le principali caratteristiche delle **cellule staminali mesenchimali** includono:

- morfologia simile ai **fibroblasti**;
- espressione delle proteine della superficie cellulare **CD73, CD90 e CD105;**
- mancanza di espressione dei marcatori specifici del lignaggio **CD45, CD34, CD14, CD19, CD11b** e **HLA-DR;**

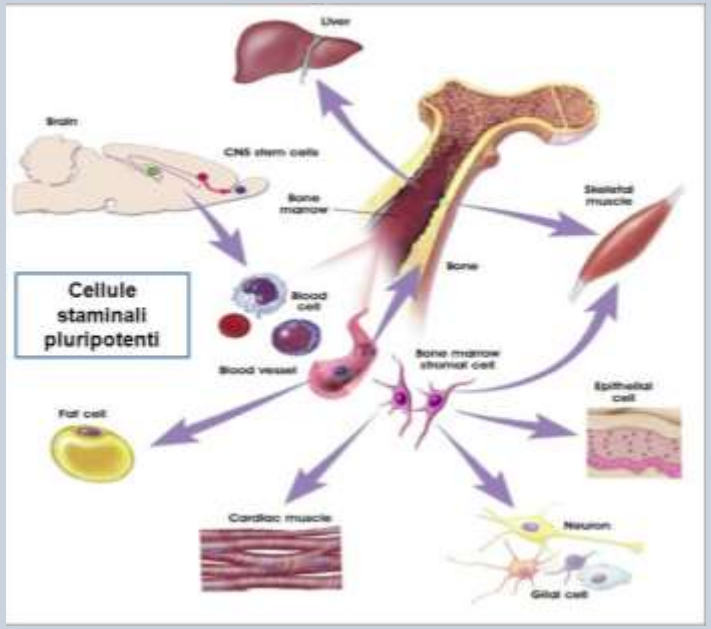


Figura 4: derivati delle BM-MSC

Le MSC derivate dal midollo osseo (**BM-MSC**) sono le più utilizzate in quanto presentano tutte le caratteristiche tipiche delle MSC.

Tuttavia, non possono essere ottenute facilmente poiché il donatore deve sottoporsi ad una **procedura dolorosa** e **invasiva** di aspirazione del midollo osseo, solitamente dalla cresta iliaca.

Il presente studio descrive alcuni dei meccanismi con i quali le MSC agiscono riparando danni del sistema nervoso, focalizzandosi sul trattamento della **malattia di Alzheimer.**

Osservando la loro capacità di arrestare la **progressione della malattia** e rigenerare il **tessuto neurale danneggiato**, le MSC sono state proposte come candidati per la **terapia cellulare.**

È stato osservato che le **vescicole extracellulari** derivate dalle BM-MSC (**BM-MSC-EV**) possono migliorare la malattia di Alzheimer attraverso il rilascio di **miR-29c-3p** nei neuroni. Ciò determina l'inibizione di **BACE1** e l'attivazione della **via Wnt/β-catenina**

Il meccanismo d'azione delle BM-MSC-EV è stato studiato in un **modello di ratto** affetto da malattia di Alzheimer (**AD**)

E' stato evidenziato che le **BM-MSC-EV** hanno trasportato **miR-29c-3p** nei neuroni AD, dove ha **inibito** l'espressione di **BACE1** e ha **attivato** la via **Wnt/β-catenina**, svolgendo così un ruolo terapeutico sui neuroni AD.

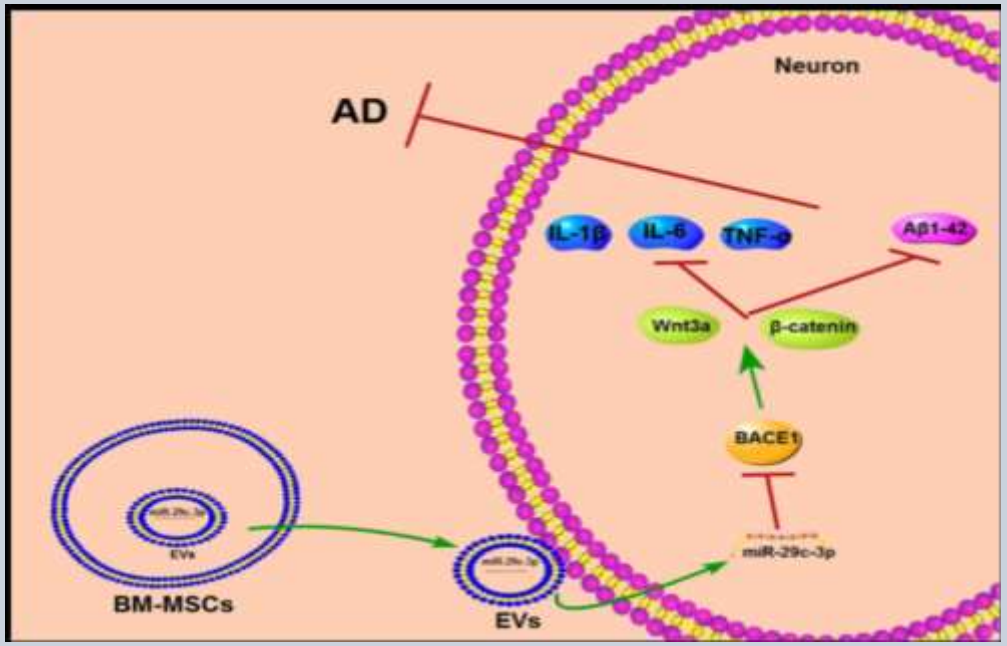


Figura 5 : Le BM-MSC-EV sono internalizzate dalle cellule neuronali e rilasciano il miR-29c-3p trasportato per sovraregolare l'espressione di miR-29c-3p nei neuroni. La sovraregolazione di miR-29c-3p inibisce BACE1 e attiva la via Wnt/β-catenina per ridurre i livelli di Aβ1-42 e di citochine infiammatorie (IL-1β, IL-6 e TNF-α), svolgendo così un ruolo terapeutico nella il trattamento dell'AD.

Successivamente, ai neuroni AD trattati con EV è stato ulteriormente aggiunto l'**inibitore della via Wnt/β-catenina DKK1.**

L'inibizione della via Wnt/β-catenina dovuta al silenziamento di miR-29c-3p nelle BM-MSC ha compromesso gli **effetti terapeutici** dell'EV sull'AD

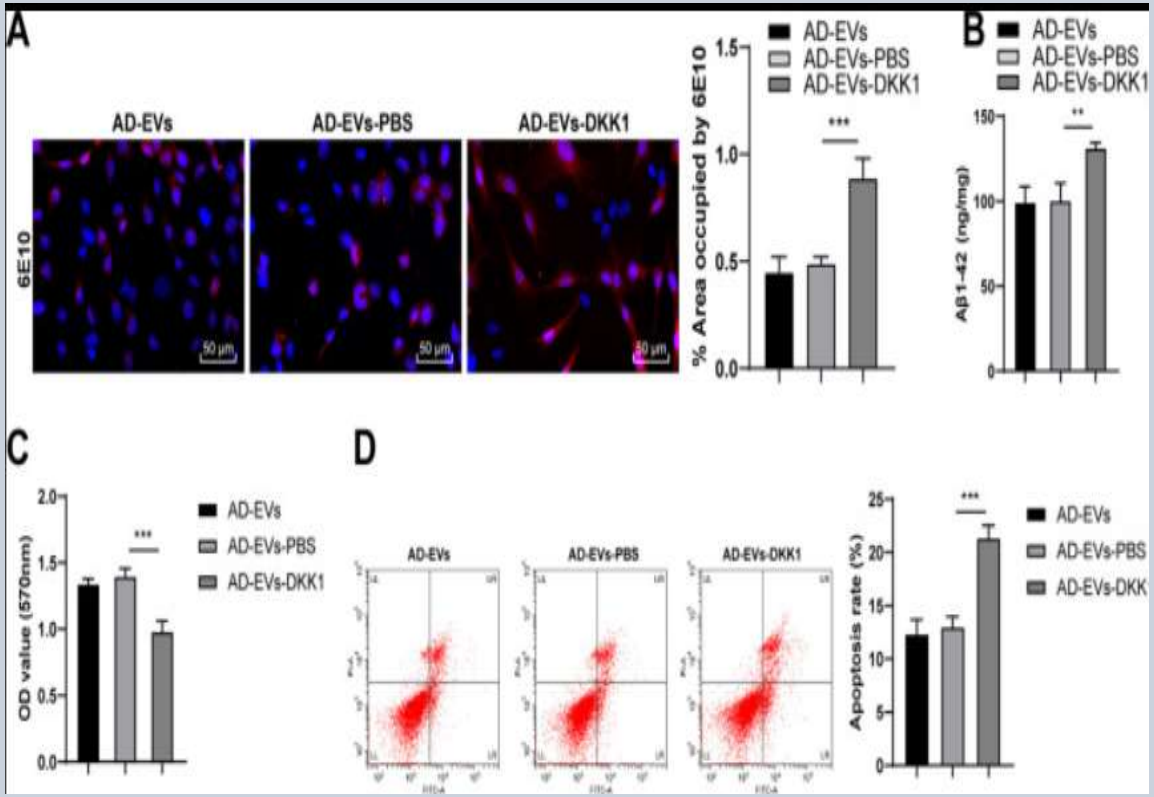


Figura 6: L'inibitore della via Wnt/β-catenina DKK1 è stato aggiunto ai neuroni AD trattati con BM-MSC-EV, con l'aggiunta di PBS come controllo.

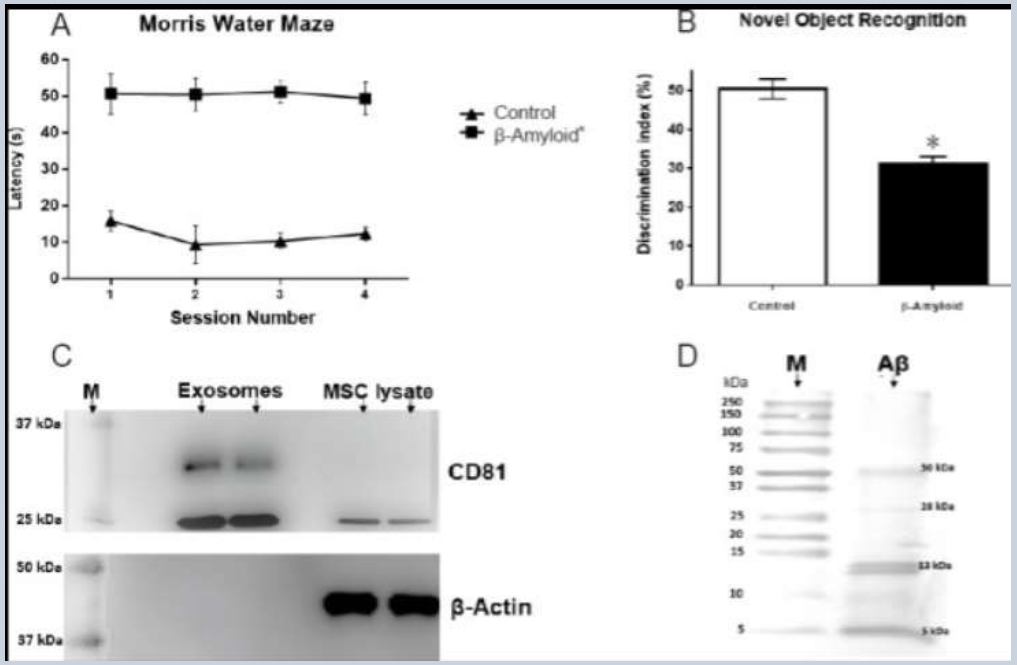
(A) Il contenuto di Aβ nei neuroni dell'ippocampo AD è stato rilevato utilizzando il test di immunofluorescenza;

(B) Il livello di Aβ1-42 nei neuroni dell'ippocampo AD è stato rilevato utilizzando il saggio ELISA;

(C) Il test MTT è stato utilizzato per rilevare la vitalità dei neuroni dell'ippocampo AD;

(D) La citometria a flusso è stata utilizzata per rilevare il tasso di apoptosi dei neuroni dell'ippocampo AD.

Un altro studio ha dimostrato che gli **esosomi** derivati da cellule staminali mesenchimali possono migliorare la **plasticità neurale** e migliorare il **deterioramento cognitivo** in un modello murino di malattia di Alzheimer.



Modelli murini di malattia di Alzheimer sono stati stabiliti mediante iniezione di **aggregati di beta amiloide 1-42** nel giro dentato bilateralmente.

Sono stati eseguiti test del labirinto acquatico di Morris e del riconoscimento di nuovi oggetti per valutare i deficit cognitivi dei topi a 14 e 28 giorni dopo la somministrazione.

Figura 7: effetti della somministrazione di Aβ1–42 sull'apprendimento e sulla memoria del topo e sul rilevamento immunologico dei marcatori esosomiali.

(A) Nel test del labirinto acquatico di Morris, i topi del gruppo beta-amiloide hanno mostrato una latenza significativamente più breve nel trovare la piattaforma rispetto ai topi del gruppo di controllo normale (nessun intervento chirurgico). I dati del grafico rappresentano il tempo necessario per raggiungere la piattaforma (secondi).

(B) Il test di riconoscimento di oggetti nuovi mostra la capacità del topo di discriminare un oggetto familiare da uno nuovo. I topi del gruppo beta-amiloide hanno un rapporto di discriminazione inferiore rispetto ai topi del gruppo di controllo normale. Il grafico rappresenta la percentuale di interazione con un nuovo oggetto;

(C) Saggio rappresentativo Western Blot per la composizione degli esosomi. Il marcatore CD81 è espresso sia nel pellet di ultracentrifugazione che nel lisato MSC; L'espressione di β-actina è stata rilevata solo nel lisato di MSC;

(D) (D) Saggio western blot rappresentativo per l'aggregazione di Aβ. I peptidi Aβ1–42 possono aggregarsi in diverse forme, di diverso peso molecolare

Successivamente, la neurogenesi nella zona subventricolare è stata determinata mediante **immunofluorescenza.**

I risultati hanno mostrato che gli esosomi derivati dalle cellule staminali mesenchimali stimolavano la neurogenesi nella zona subventricolare e alleviavano il deterioramento cognitivo indotto dalla beta amiloide 1-42.

Questi effetti sono simili a quelli mostrati nelle cellule staminali mesenchimali.

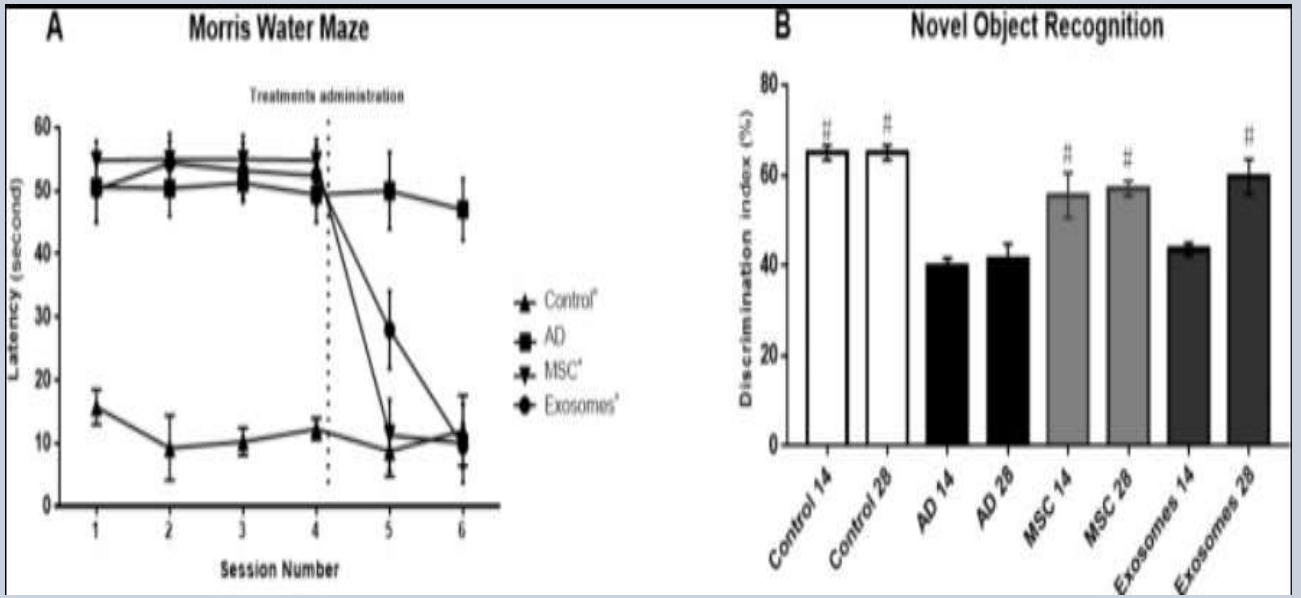


Figura 8: Effetti della somministrazione di esosomi sul deterioramento cognitivo di un modello murino di malattia di Alzheimer.

(A) Il tempo di nuoto dei topi durante diverse sessioni del test Morris Water Maze. Le sessioni di test sono state effettuate 14 e 28 giorni dopo i trattamenti. Nella quinta sessione del test del labirinto acquatico di Morris, i topi dei gruppi esosomi e MSC hanno avuto prestazioni migliori rispetto ai topi del gruppo AD. La linea tratteggiata rappresenta i trattamenti. Alla sesta sessione del test Morris Water Maze, non è stata riscontrata alcuna differenza tra i gruppi di controllo, esosomi e MSC (*).

(B) Il test di riconoscimento di oggetti nuovi è stato eseguito dopo trattamenti di 14 e 28 giorni. Dopo 14 giorni, il miglioramento del deterioramento cognitivo, è stato riscontrato solo nel gruppo MSC rispetto ai gruppi esosomi e AD. Dopo 28 giorni di trattamento, non è stata riscontrata alcuna differenza nel rapporto di discriminazione tra esosomi, MSC e gruppi di controllo normali (controllo).

Questi risultati suggeriscono che la somministrazione di esosomi e MSC ha ridotto il deterioramento cognitivo.

In un altro studio, è stato dimostrato che l'**iniezione intracerebroventricolare di BM-MSC** in un modello murino di Alzheimer ha migliorato il deterioramento cognitivo, riducendo l'**infiammazione astrocitica** e favorendo la **sinaptogenesi.**

- I topi modello AD mostrano un aumento di **NF-κB** nell'ippocampo.
- I topi modello AD trattati con BM-MSC non hanno mostrato questo aumento ma hanno mostrato un aumento dei livelli di **microRNA-146a** nell'ippocampo.



Figura 9: struttura NF-kB

Il **Nuclear factor kappaB** (NF-kB) è un fattore di trascrizione nucleare presente in tutte le cellule che producono citochine, fattori di crescita, chemochine, molecole di adesione, ecc. sia in condizioni normali che in numerose patologie.

Una volta attivato, NF-kB controlla direttamente o indirettamente l'attività di geni che regolano numerosi processi cellulari importanti per la risposta immunitaria. In molte malattie infiammatorie croniche, è dimostrata un'attivazione esagerata e prolungata di NF-kB

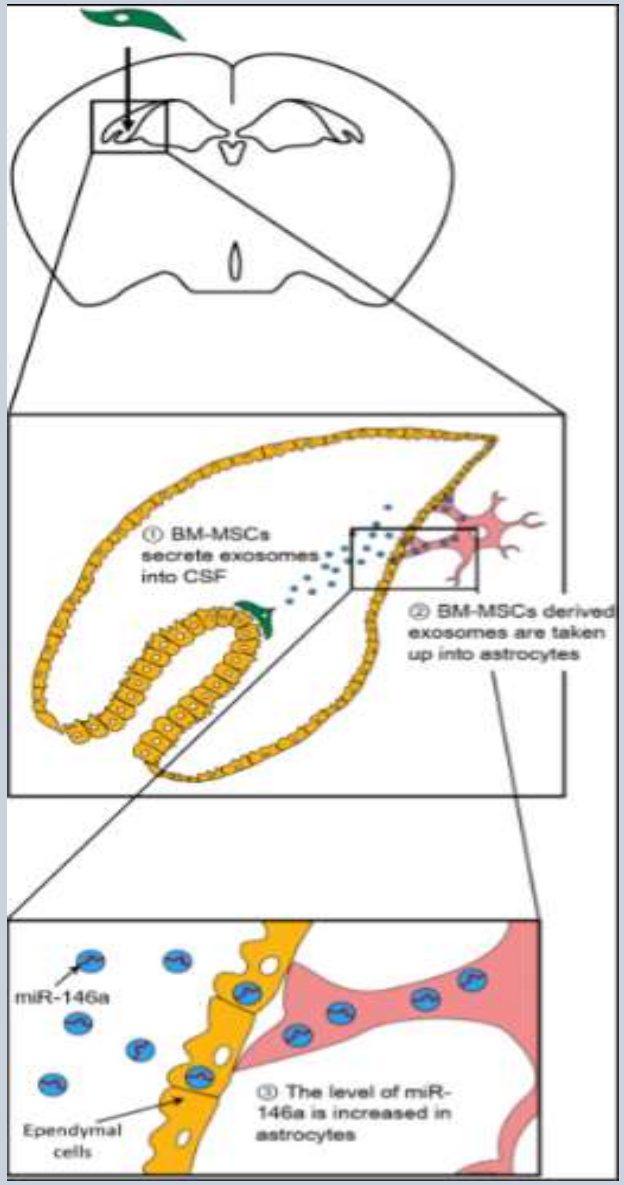


Figura 10: Schema della terapia BM-MSC

Le **BM-MSC** iniettate per **via intracerebroventricolare** sono attaccate al **plesso coroideo** nel ventricolo laterale secernono **esosomi** nel liquido cerebrospinale.

Esperimenti in vitro hanno mostrato che il **miR-146a esosomiale** secreto dalle BM-MSC veniva assorbito negli **astrociti**, nei quali sono stati osservati un livello aumentato di **miR-146a** e un livello ridotto di **NF-κB.**

Gli astrociti sono cellule chiave per la **formazione delle sinapsi** e, quindi, il ripristino della funzione astrocitaria potrebbe aver portato alla **sinaptogenesi** e alla correzione del **deterioramento cognitivo**.

CONCLUSIONI

In conclusione, gli studi appena citati supportano il potenziale clinico e l'utilità delle MSC nel trattamento della **malattia di Alzheimer.**

E' stato dimostrato che il trattamento con MSC migliora i **tassi di sopravvivenza, riduce la patologia**, corregge il **declino delle funzioni cognitive**, migliora i **sintomi della malattia** e **riduce il verificarsi di ricadute**.

Grazie alla loro capacità di proliferazione e differenziazione multilineare, produzione di fattori di crescita e relativa facilità di isolamento da diverse parti del corpo, le MSC possono essere applicate in numerose condizioni.

Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche nella medicina rigenerativa affinché le MSC possano trattare efficacemente malattie/disturbi.

BIBLIOGRAFIA

- Alzheimer's Association: 2022 Alzheimer's Disease Facts and Figures. Alzheimers Dement 18 (4):700–789, 2022. doi: 10.1002/alz.12638
- 1. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, et al: Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. Alzheimers Dement (NY) 4:575–590, 2018. doi: 10.1016/j.trci.2018.06.014
- 2. González A, Calfío C, Churruca M, Maccioni RB: Alzheimers Res Ther 14 (1):56, 2022. doi: 10.1186/s13195-022-00996-8
- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10334654/#CR46
- https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34086603/
- https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31089063
- https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32612165/
- https://www.alcmeone.it/patologie/nuclear-factor-kappa-b-nfkb-e-suo-ruolo-nellinfiammazione-

RIASSUNTO

Le **cellule staminali mesenchimali** (MSC) hanno un enorme potenziale nella medicina rigenerativa. Con le loro proprietà immunomodulanti e rigenerative, esse hanno numerose applicazioni nel **settore clinico**.

Le MSC hanno proprietà di **differenziazione multilineare**, di **segnalazione paracrina** e possono essere isolate da vari tessuti, il che le rende un candidato chiave per applicazioni in numerosi sistemi di organi.

Il presente studio evidenzia i meccanismi d'azione delle MSC sul **sistema nervoso**, in particolare nel trattamento della **malattia di Alzheimer**.

Le MSC continuano ad essere testate per riparare, rigenerare o modulare altri sistemi di organi malati o feriti.