



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea**  
**Scienze biologiche**

---

Efficient derivation of human trophoblast stem cells from  
primed pluripotent stem cells

Derivazione delle cellule staminali umane del trofoblasto da  
cellule staminali pluripotenti innescate

Tesi di Laurea di:  
di:

Giulia Ciabattoni

Docente Referente  
Chiar.mo Prof.

Oliana Carnevali

Sessione Luglio 2023

Anno Accademico 2022/23

# Cellule staminali

- Autorinnovamento
- Pluripotenza

## Interesse bio - medico:



Medicina rigenerativa



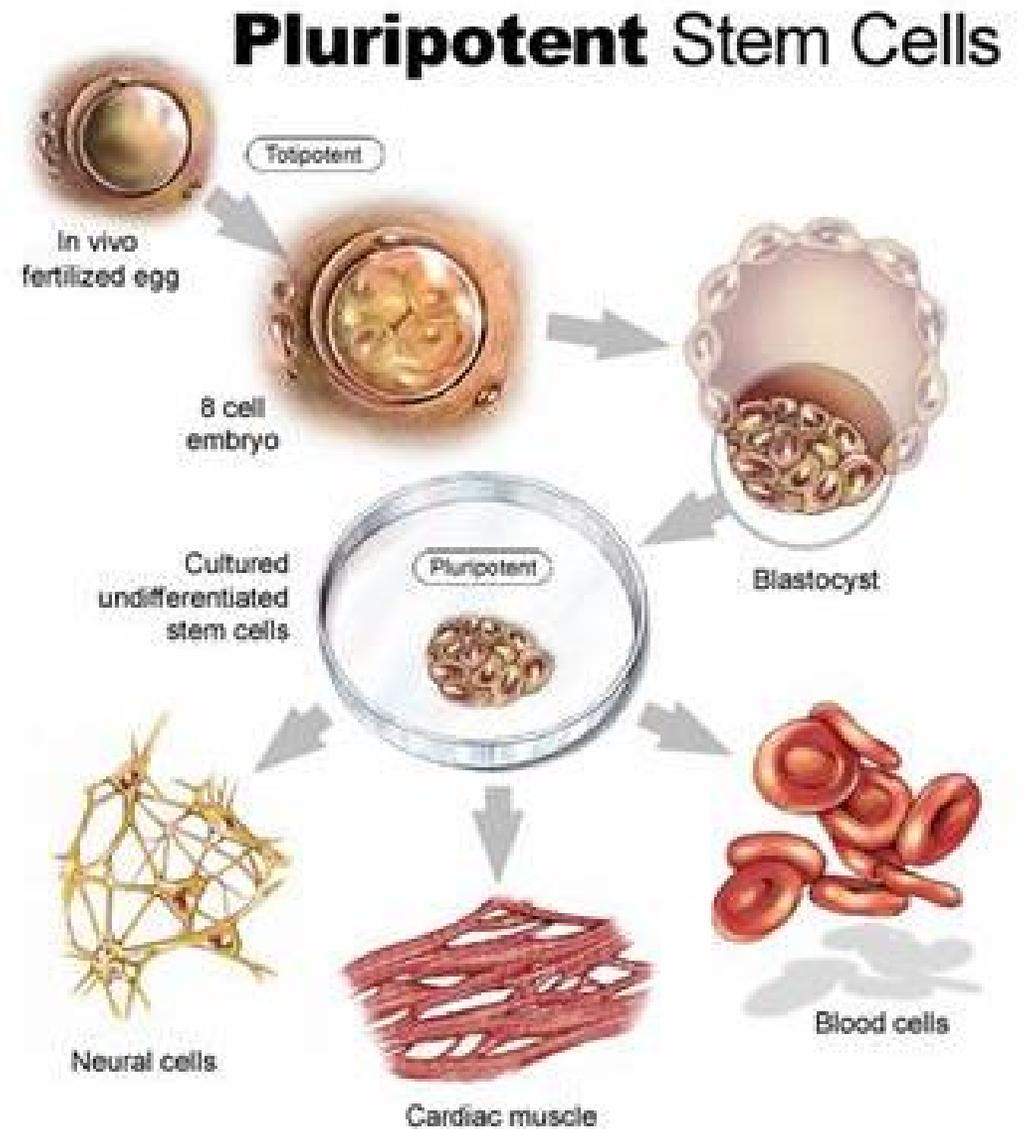
Terapia cellulare



Trapianto di organi

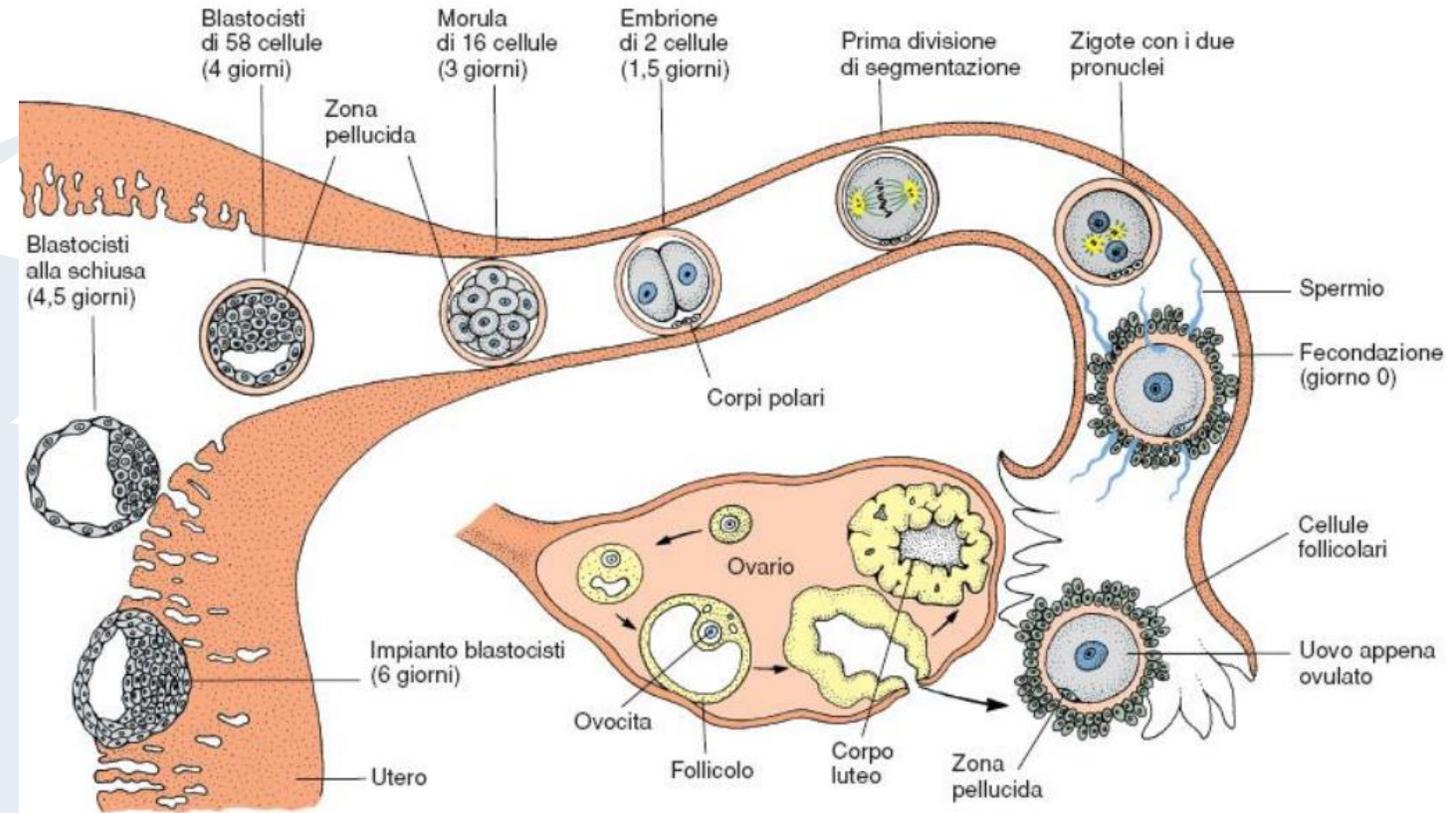


Modellizzazione di patologie



# Stadi delle cellule staminali embrionali

- **Totipotenti**, nelle prime fasi della segmentazione
- **Pluripotenti**, a partire dalla compattazione
- **Multipotenti**, delle fasi più avanzate dello sviluppo fetale e in alcuni tessuti adulti
- **Unipotenti**, delle linee somatiche adulte

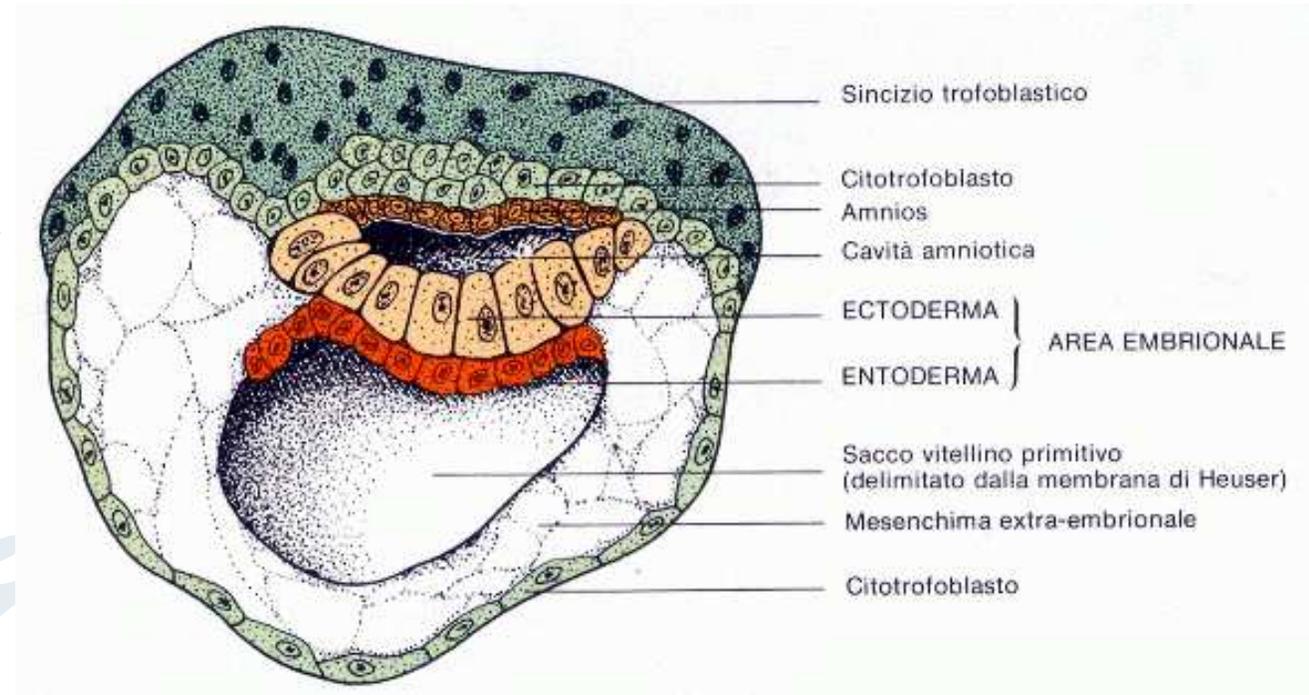




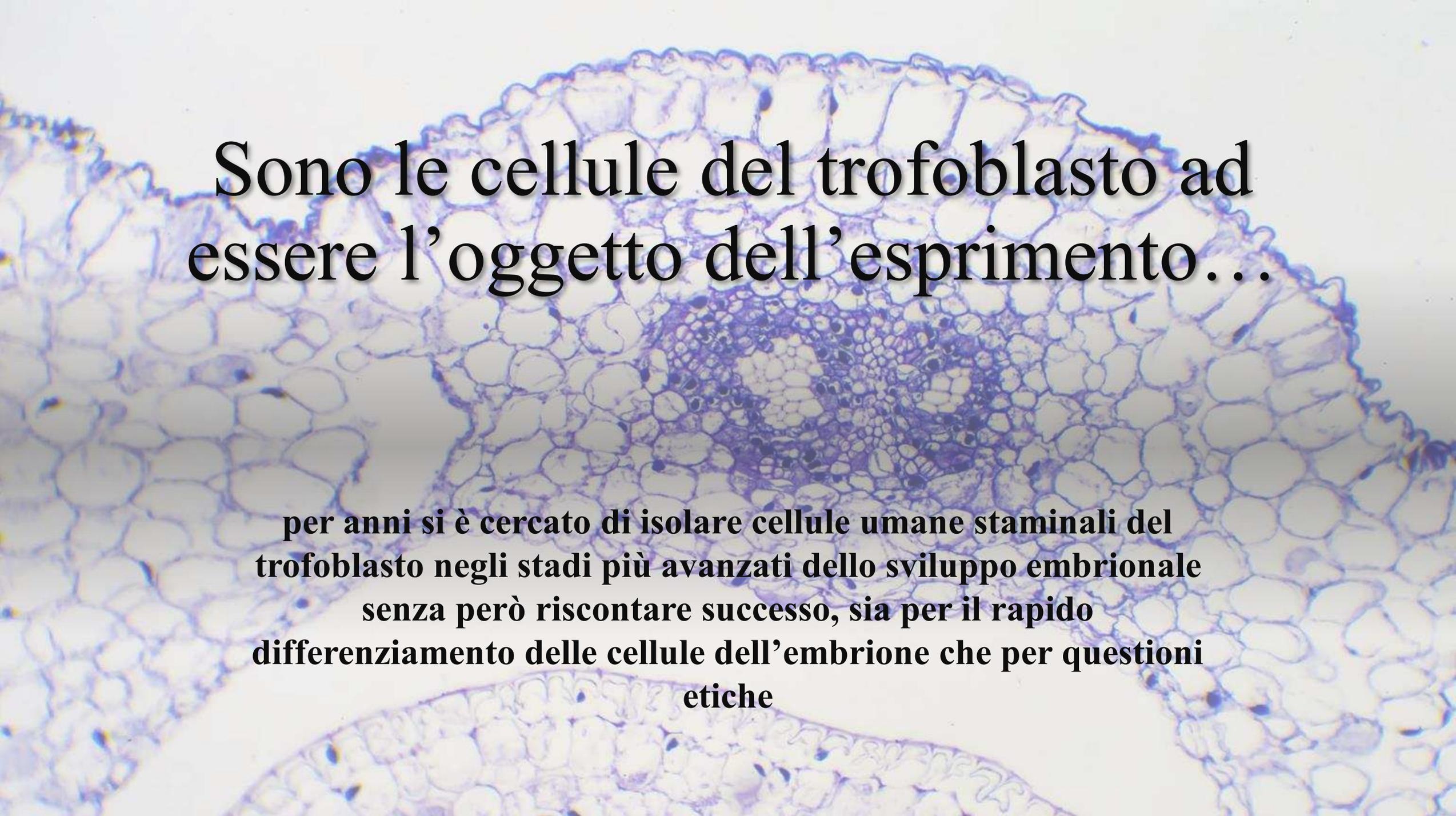
Tipologie di cellule staminali:	iPS	ESC	Fetali	Adulte del sangue	Adulte della pelle	Adulte del cervello	Cordonali
<b>FONTE</b>	Cellule fetali ed adulte immature e differenziate	Blastocisti	Tessuti fetali	Midollo osseo o sangue periferico	Pelle	Cervello	Cordone ombelicale
<b>POTENZIALITA'</b>	PLURIPOTENTI	PLURIPOTENTI	MULTIPOTENTI	MULTIPOTENTI	MULTIPOTENTI	MULTIPOTENTI	MULTIPOTENTI
<b>ESPANDIBILITA'</b>	SI	SI	A seconda del tessuto di origine	LIMITATA	SI	SI	NO
<b>UTILIZZO CLINICO</b>	NON ANCORA	STUDI DI FASE I	SI	SI	SI	NON ANCORA	SI
<b>EFFICACIA CLINICA</b>	NON ANCORA	NON ANCORA	SI	SI	SI	NON ANCORA	SI
<b>MANIPOLABILITA' GENETICA</b>	OTTIMA	OTTIMA	LIMITATA	LIMITATA	LIMITATA	LIMITATA	LIMITATA

*Allo stadio di 32 cellule distinguamo:*

- **Cellule della massa interna (ICM)**, si differenzieranno nei tre foglietti embrionali
- **Cellule periferiche**, coincideranno con le cellule del trofoblasto



**Figura 1** : Rappresentazione embrione umano allo stadio di 32 cellule

A microscopic image of a human embryo section, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The image shows a cross-section of the embryo, with the trophoblast layer visible as a dense, multi-layered structure surrounding the inner embryonic tissues. The trophoblast cells are characterized by their large, polygonal shape and prominent nuclei. The text is overlaid on the image, providing context for the study of these cells.

**Sono le cellule del trofoblasto ad essere l'oggetto dell'esperimento...**

**per anni si è cercato di isolare cellule umane staminali del trofoblasto negli stadi più avanzati dello sviluppo embrionale senza però riscontrare successo, sia per il rapido differenziamento delle cellule dell'embrione che per questioni etiche**

***Obiettivi dell'esperimento:***

utilizzo delle *hPSCs* (*cellule umane staminali pluripotenti*), e in particolare *hESCs* (*cellule umane staminali embrionali*), come fonte per il differenziamento delle cellule del trofoblasto che non sarebbero facilmente ottenibili da embrioni umani.

***Ipotesi:***

è possibile far passare le cellule pluripotenti staminali per uno stato di de – differenziamento, inducendole successivamente al differenziamento in cellule *hTS<sup>PS</sup>*, ovvero cellule con caratteristiche uguali a quelle sviluppatesi naturalmente dalla blastocisti ma derivanti dalle *hPSCs*. È possibile la riuscita dell'esperimento tramite un terreno di coltura con appropriati fattori di crescita. Il successo dell'esperimento è incrementato tramite l'aggiunta del fattore BMP4 nel terreno di crescita.

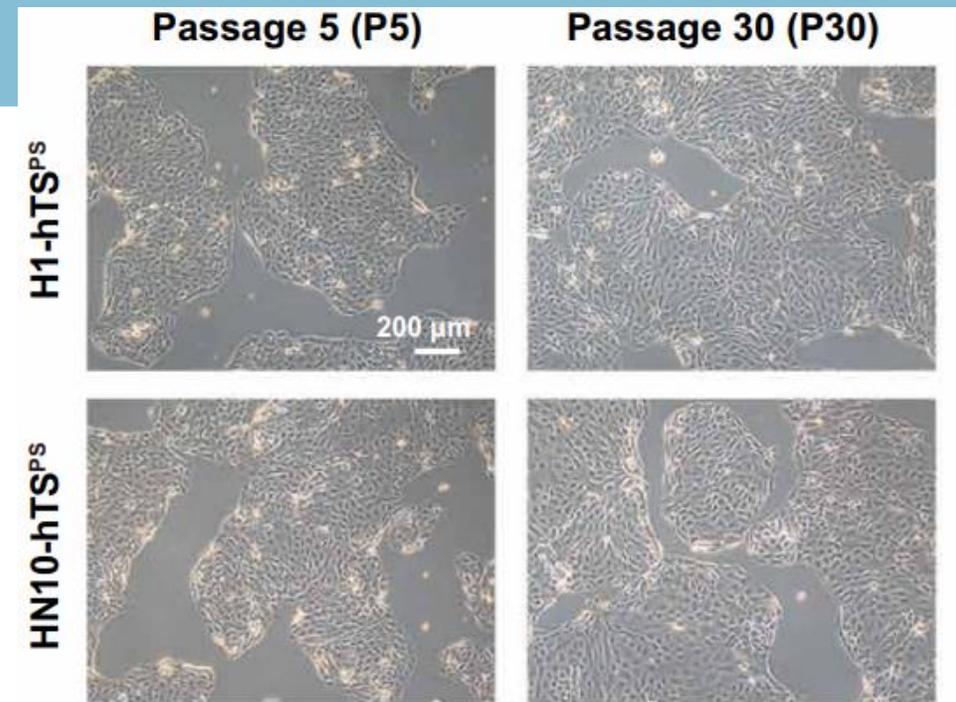
***Dimostrazioni:***

le *hTS<sup>PS</sup>* sono simili alle *hTSCs* derivanti direttamente dalla blastocisti per morfologia, espressione genica, potenziale di differenziamento e proliferazione cellulare.

Sono state scelte due linee cellulari appartenenti alle hESCs: **H1** e **HN10**, saranno indotte al differenziamento in **hTS<sup>PS</sup>**. Vengono coltivate entrambe in un mezzo di coltura contenente acido ascorbico, EGF, inibitore della GSK3, inibitore del fattore TGF  $\beta$ .

Figura: andamento della coltivazione delle due linee cellulari. Si osserva una morfologia molto simile a quella delle cellule umane del trofoblasto derivate direttamente dalla blastocisti.

Percentuale di riuscita: il 2.73% delle cellule della linea H1 si sono differenziate in **hTS<sup>PS</sup>**, mentre per le cellule della linea HN10 la percentuale è molto più alta ed è pari al 23.10%.

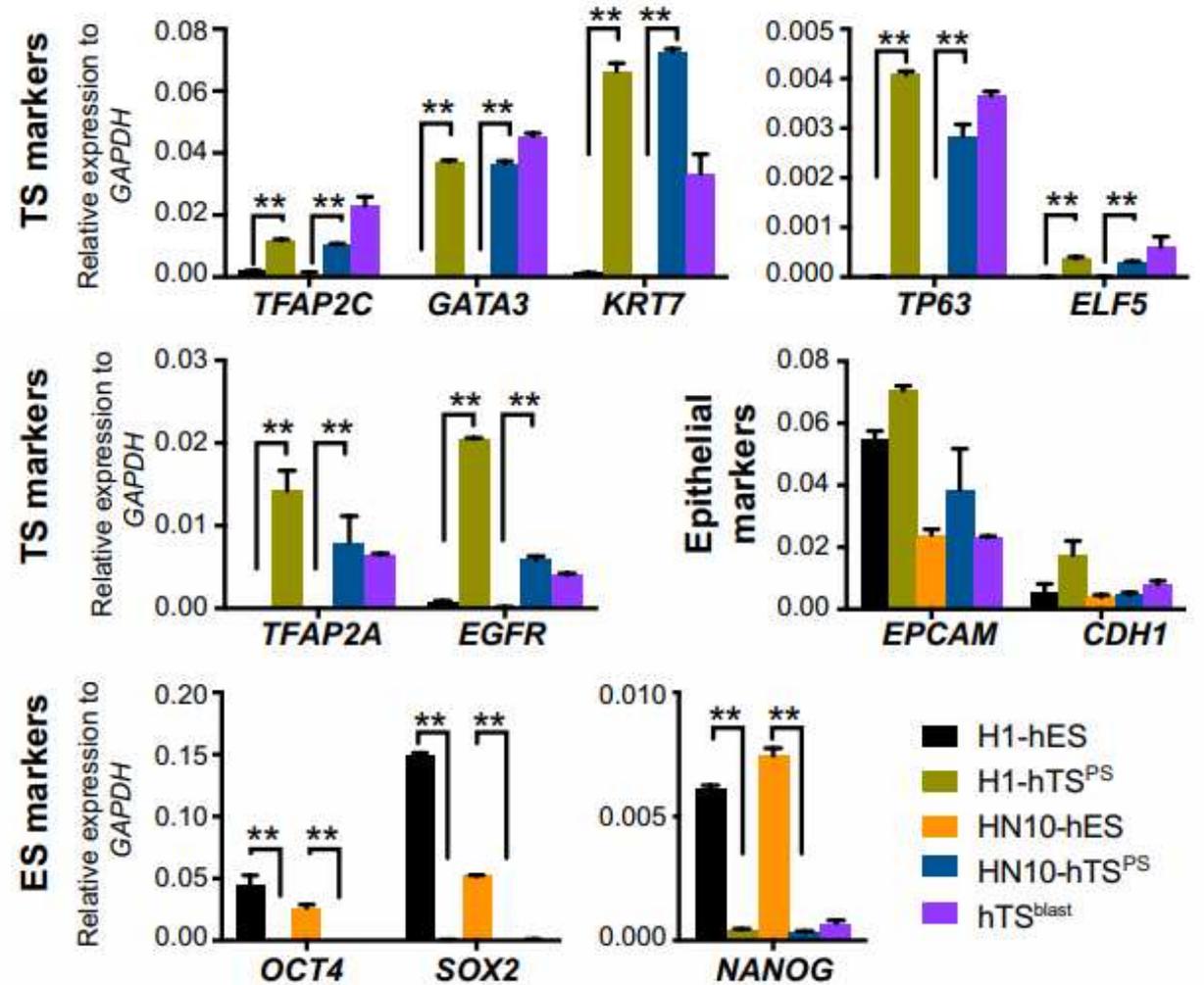


**Figura 2:** le immagini rappresentano la capacità di adattamento delle due linee cellulari. Si osserva una morfologia molto simile a quella delle cellule umane del trofoblasto derivate direttamente dalla blastocisti.  
Scala in 200  $\mu\text{m}$

Tramite una Real Time PCR quantitativa è possibile osservare la diversa espressione genica nelle due linee cellulari H1 e HN10.

È possibile dimostrare come il differenziamento sia meglio riuscito con le cellule della linea HN10 piuttosto che con la H1, le prime presentano i tipici marcatori genici del trofoblasto e non presentano quelli della staminalità.

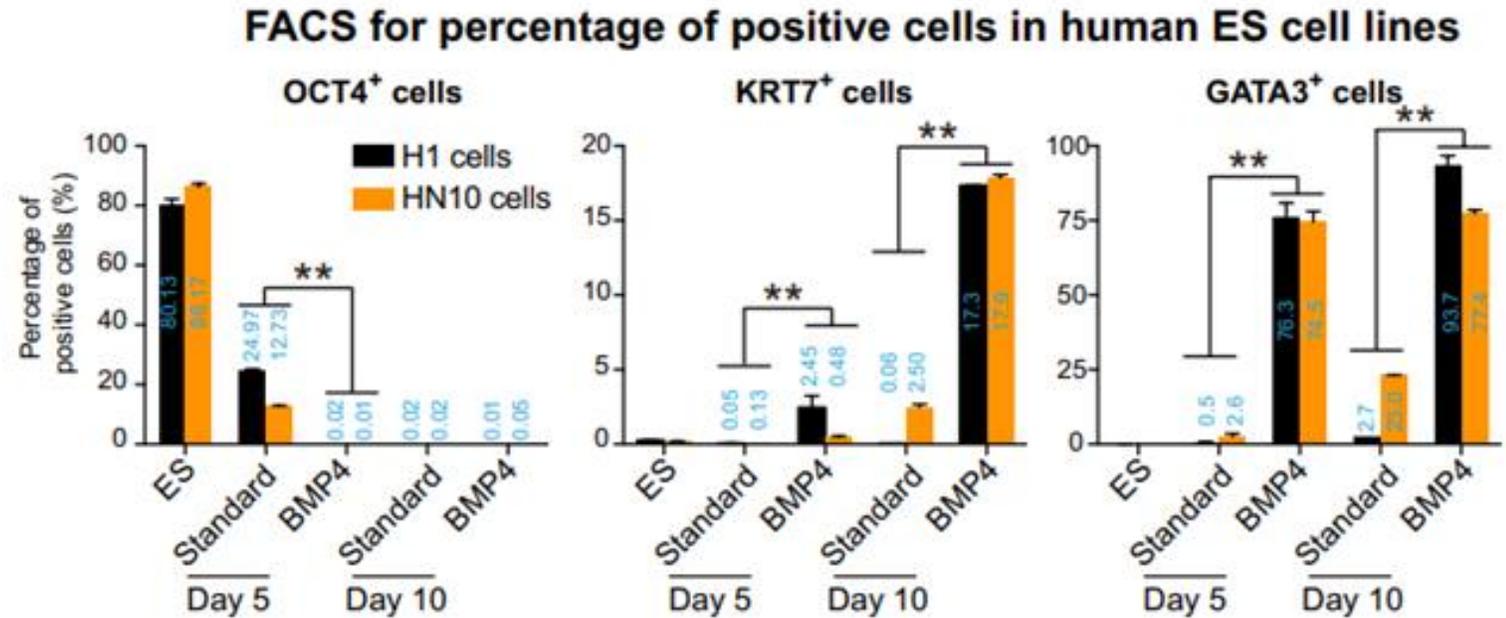
I marcatori genici che permettono lo studio sono **OCT4**, **SOX2**, **NANOG**, nel caso di cellule staminali embrionali mentre **GATA3**, **KRT7**, **TFAP2C**, **ELF5**, **TIP6**, **TFAP2A** sono marcatori delle cellule del trofoblasto.



**Figura 3:** RT - PCR quantitativa per l'espressione dei geni marker per le TSC, cellule epiteliali e ESC nelle cellule **hTSPS** derivanti dalle H1 e HN10.

Nonostante il successo del precedente differenziamento, è stato visto come aggiungendo nel terreno di coltura il fattore di crescita e di differenziamento *BMP4*, la percentuale delle cellule del trofoblasto derivate da quelle embrionali indotte sia notevolmente più elevata.

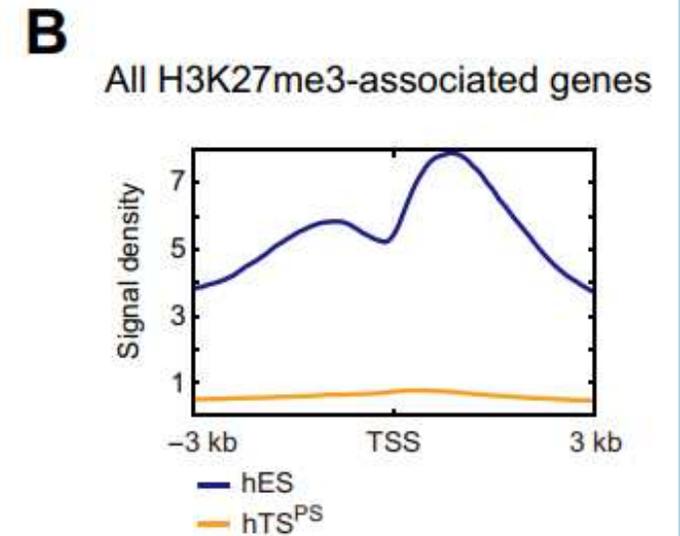
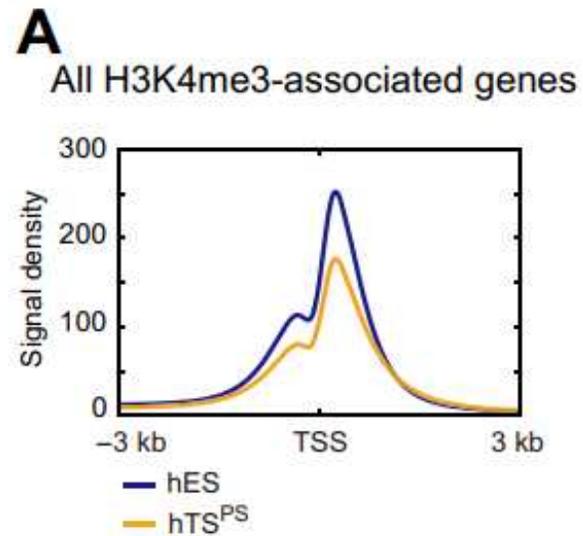
Nelle *hTSPs* derivate da entrambe le linee cellulari H1 e HN10 in presenza di *BMP4*, l'espressione di **KRT7** è aumentata dal 2 al 20% e quella di **GATA3** dal 20 al 90%. Viceversa è diminuita la percentuale dei marcatori per le cellule staminali embrionali.



**Figura 4:** analisi dell'espressione dei geni OCT4, KRT7 e GATA3 durante il differenziamento confrontando la coltivazione nel terreno con e senza fattore BMP4.

**Figura A:** simile grado di metilazione dell'istone  $H3K4me3$  nelle  $hESC$  e nelle  $hTS^{PS}$ .

**Figura B:** differente grado di metilazione dell'istone  $H3K27me3$  nelle  $hESC$  e nelle  $hTS^{PS}$ . Le cellule staminali del trofoblasto hanno un'espressione molto più bassa dei geni che hanno un promotore metilato a livello dell'istone  $H3K27me3$ , quindi meno accessibile.

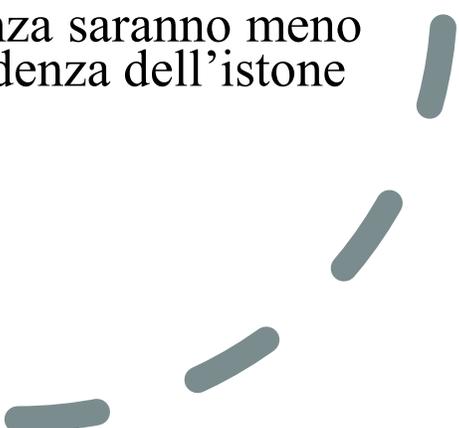




In questo studio è stato dimostrato come sia possibile far derivare  $hTS^{PS}$  da  $hPSC$  indotte, con una migliore efficienza in presenza di BMP4.

È stato visto come la morfologia, il ciclo cellulare e il differenziamento delle  $hTS^{PS}$  derivanti dalle  $hPiSC$  siano simili rispetto alle cellule del trofoblasto derivate naturalmente dalla blastocisti; l'osservazione dell'andamento del ciclo cellulare è stata condotta facendo crescere le  $hTS^{PS}$  in un mezzo di coltura specifico per le cellule del trofoblasto (TC).

È stato importante anche lo studio del differente pattern di metilazione dell'istone H3K27me3 e H3K4me3: durante il differenziamento delle cellule in  $hTS^{PS}$ , l'istone H3K27me3 risulta maggiormente metilato e di conseguenza saranno meno disponibili i promotori dei geni in corrispondenza dell'istone considerato.



Lo studio delle cellule del trofoblasto in vitro è fondamentale per capire come avvenga lo sviluppo placentare e risulta anche un importante strumento per innovativi trattamenti per patologie associate allo sviluppo della placenta durante lo sviluppo embrionale.

L'ostacolo rimane il fatto che le *hPSCs* indotte non risultano essere direttamente utilizzabili come fonte per l'ottenimento delle *hTSCs*, ma devono prima essere ripristinate ad uno stato indifferenziato.

## Referenze:

- <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abf4416>
- <https://www.eurostemcell.org/it/cellule-staminali-embrionali-da-dove-vengono-e-di-cosa-sono-capaci>
- <https://www.eurostemcell.org/it/cellule-staminali-embrionali-da-dove-vengono-e-di-cosa-sono-capaci>
- [https://www.ansa.it/canale\\_scienza\\_tecnica/notizie/biotech/2023/06/15/ottenuti-embrioni-umani-sintetici-con-cellule-staminali\\_8db1e184-f14d-4487-8992-1412a82f20c6.html](https://www.ansa.it/canale_scienza_tecnica/notizie/biotech/2023/06/15/ottenuti-embrioni-umani-sintetici-con-cellule-staminali_8db1e184-f14d-4487-8992-1412a82f20c6.html)
- [https://www.treccani.it/enciclopedia/cellule-staminali\\_%28XXI-Secolo%29/#:~:text=La%20definizione%20di%20cellula%20staminale,di%20differenziarsi%20in%20tipi%20cellulari](https://www.treccani.it/enciclopedia/cellule-staminali_%28XXI-Secolo%29/#:~:text=La%20definizione%20di%20cellula%20staminale,di%20differenziarsi%20in%20tipi%20cellulari)
- <https://www.medimagazine.it/nuova-ricerca-sullimmortalita-delle-cellule-staminali/>

