



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE  
MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE  
Corso di Laurea in Scienze Biologiche

*Terapia cellulare per la cura della  
malattia del Parkinson*

*Cell Therapy for Parkinson's Disease*

Tesi di Laurea di:  
Biondi Alessandro

Docente Referente  
Chiar.ma Prof.ssa:  
Carnevali Oliana

Sessione Straordinaria  
Anno Accademico  
2023/24

# INTRODUZIONE - Panoramica sulla malattia di Parkinson

- ▶ Seconda malattia neurodegenerativa più comune.
- ▶ Progressiva perdita di neuroni dopaminergici della substantia nigra, con serie di sintomi motori.
- ▶ L' interruzione nella trasmissione della dopamina compromette il funzionamento dei gangli della base, con conseguenze sul controllo motorio.



# INTRODUZIONE - Le attuali opzioni terapeutiche

Le strategie esistenti sono sintomatiche e comportano uso di farmaci o trattamento chirurgico:

- ▶ La levodopa, precursore della dopamina.
- ▶ La stimolazione cerebrale profonda (DBS) è una procedura chirurgica.

Questi approcci terapeutici possono perdere efficacia e provocare effetti collaterali indesiderati.

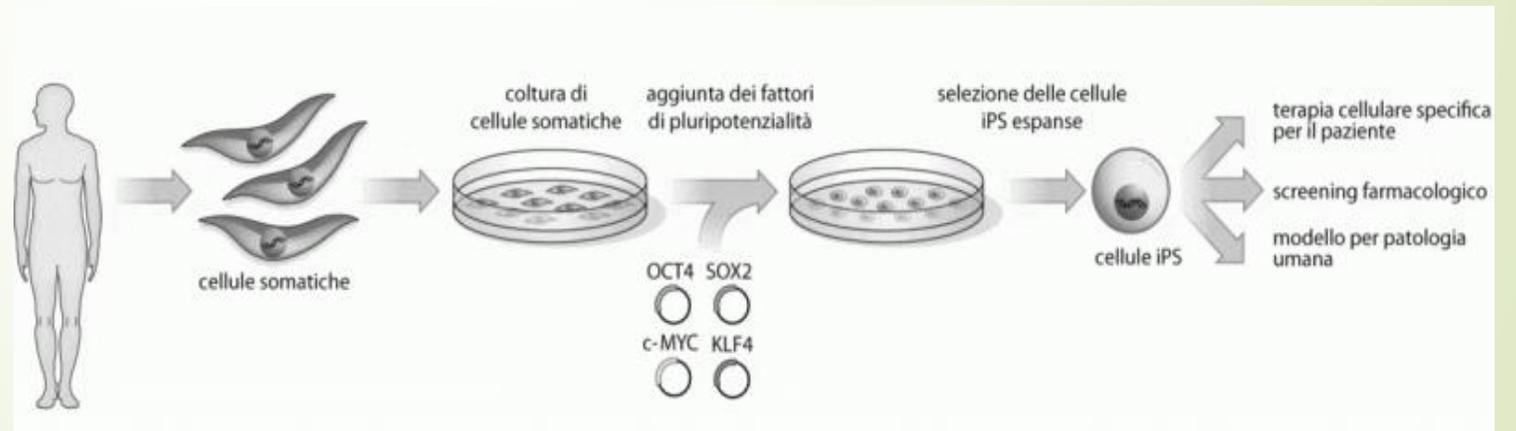


# LE VIE INTRAPRESE PER I NUOVI TRATTAMENTI – Terapia cellulare

La ricerca si è posta come obiettivo comune quello di trovare un trattamento adatto alla base della malattia di Parkinson. Questi sono gli approcci intrapresi :

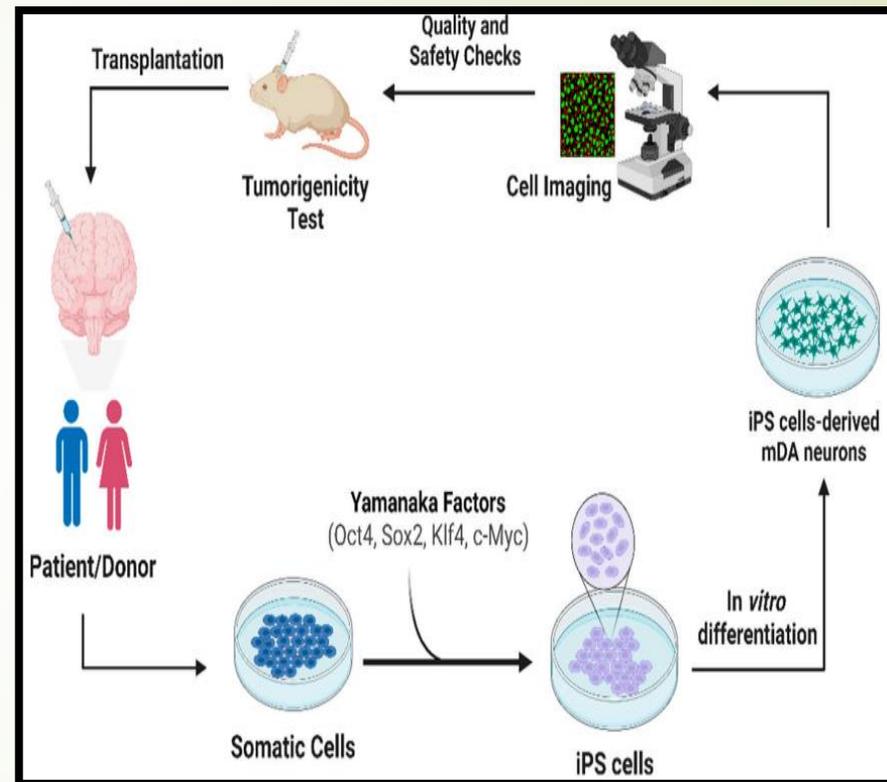
- Terapia cellulare basata su trapianto di Induced Pluripotent Stem cell (iPSC).
- Trapianto di Neuroni Dopaminergici (DAN), derivati da Human embryonic stem cells (hESC), in Non-human primates (NHP) trattati con 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP).
- Terapia cellulare basata su organoidi del mesencefalo derivati da iPSC per ripristino motorio in modello murino.
- Cotrapianto di Neural stem cells (NSC) e stereato di etile per promuovere plasticità sinaptica nei ratti mediante via Drd1/ERK/AP-1.

# TERAPIA CELLULARE BASATA SU TRAPIANTO DI iPSC



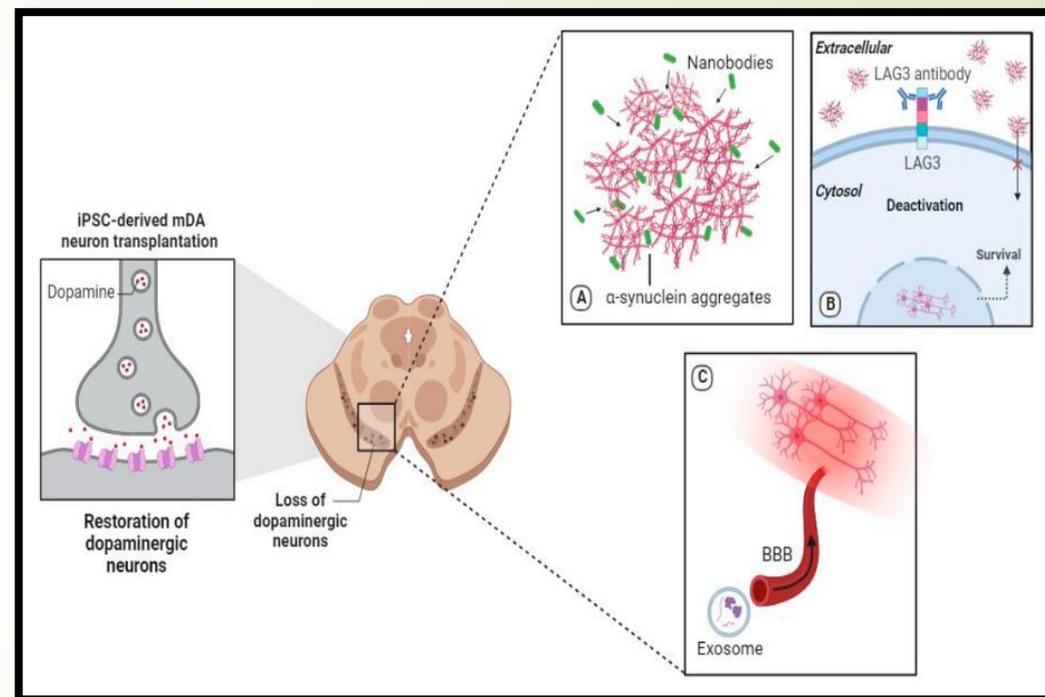
# TERAPIA CELLULARE BASATA SU TRAPIANTO DI iPSC

- Le iPSC sono cellule capaci di essere riprogrammate ad assumere uno stato simile alle cellule staminali.
- Le iPSC come promettente alternativa alle cellule staminali pluripotenti.
- L'applicazione clinica è ostacolata dal rischio di tumorigenicità, simile alle cellule staminali.

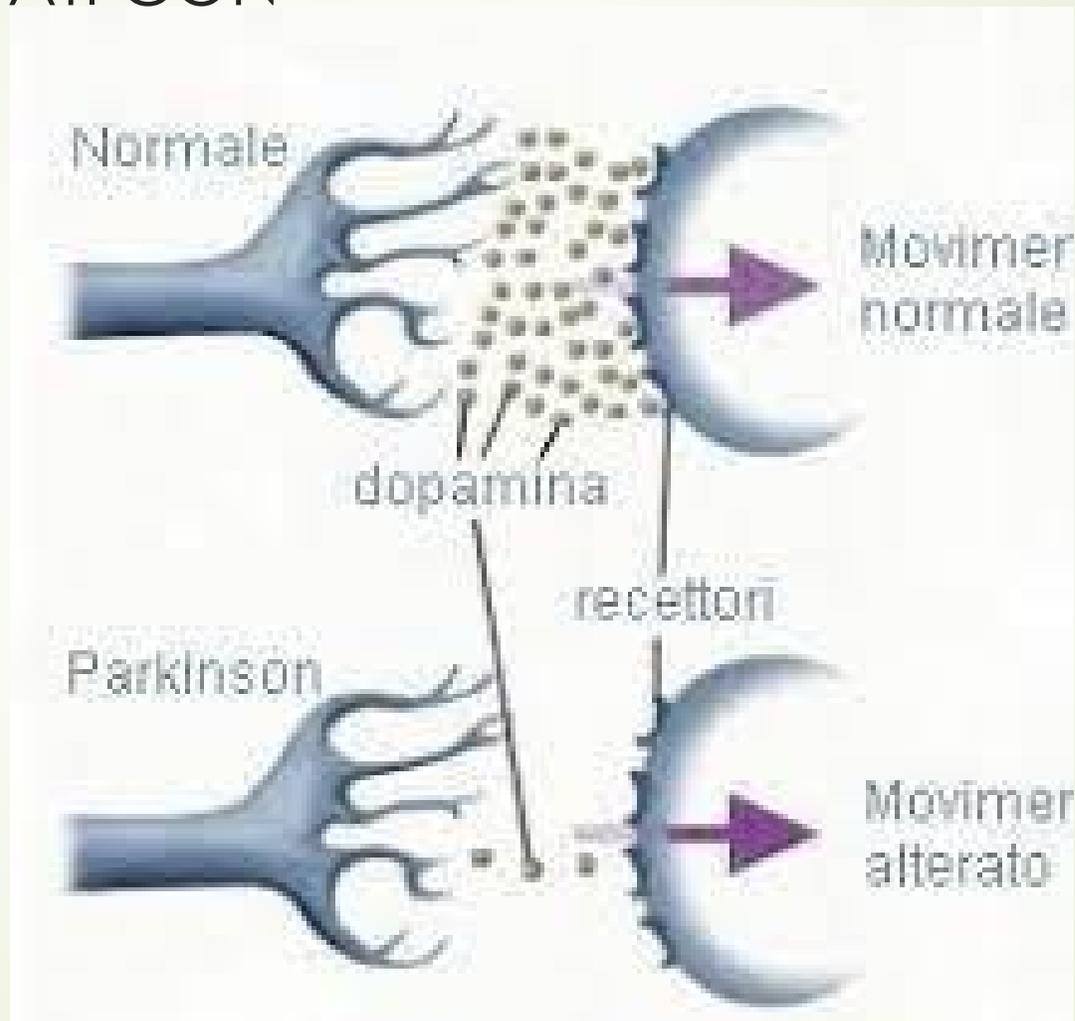


# TERAPIA CELLULARE BASATA SU TRAPIANTO DI iPSC

- ▶ Trapianto autologo di neuroni derivati da iPSC paziente-specifici è un potenziale approccio clinico.
- ▶ Limiti causati da microambiente neurotossico originato dall'aggregazione delle  $\alpha$ -sine.
- ▶ Nanobodies, la deplezione genetica degli anticorpi LAG3 e anti-LAG3 ed esosomi.

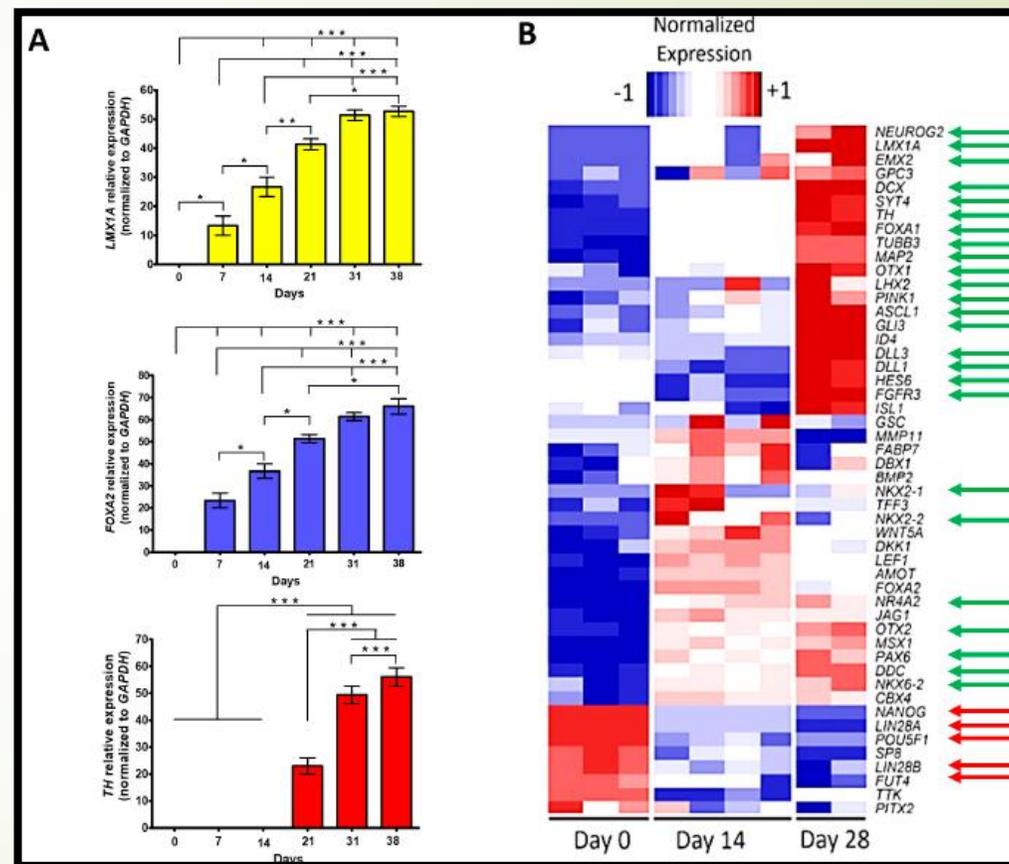


TRAPIANTO DI DAN, DERIVATI  
DA hESC, in NHP TRATTATI CON  
MPTP



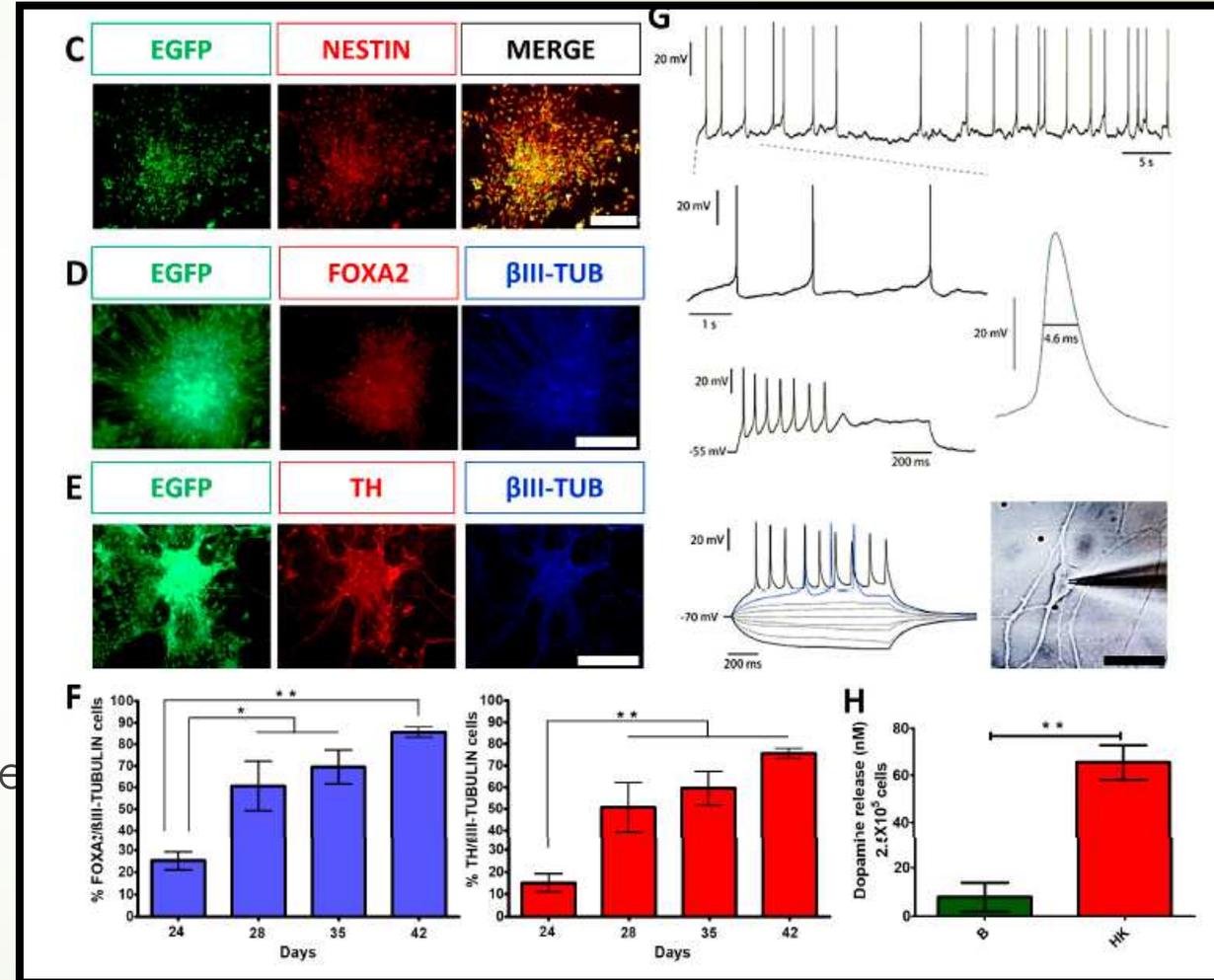
# TRAPIANTO DI DAN, DERIVATI DA hESC, IN NHP TRATTATI CON MPTP

- Indotta differenziazione in cellule H9-EGFP. Confermata, mediante Rt-qPCR per espressione di FOXA2 e LMX1A.
- Espressione di FOXA2: 0 FPKM a 0 giorni,  $26,5 \pm 9$  FPKM a 14 giorni e  $6.5 \pm 2.5$  FPKM a 28 giorni.
- Espressione Tirosina idrossilasi (TH) rilevata dal giorno 21 e aumentata giorni 31-38
- RNA-Seq rivelato sottoregolazione geni della pluripotenza (NANOG, LIN28A, LIN28B, e POU5F1) rispetto giorno 0.



# TRAPIANTO DI DAN, DERIVATI DA hESC, IN NHP TRATTATI CON MPTP

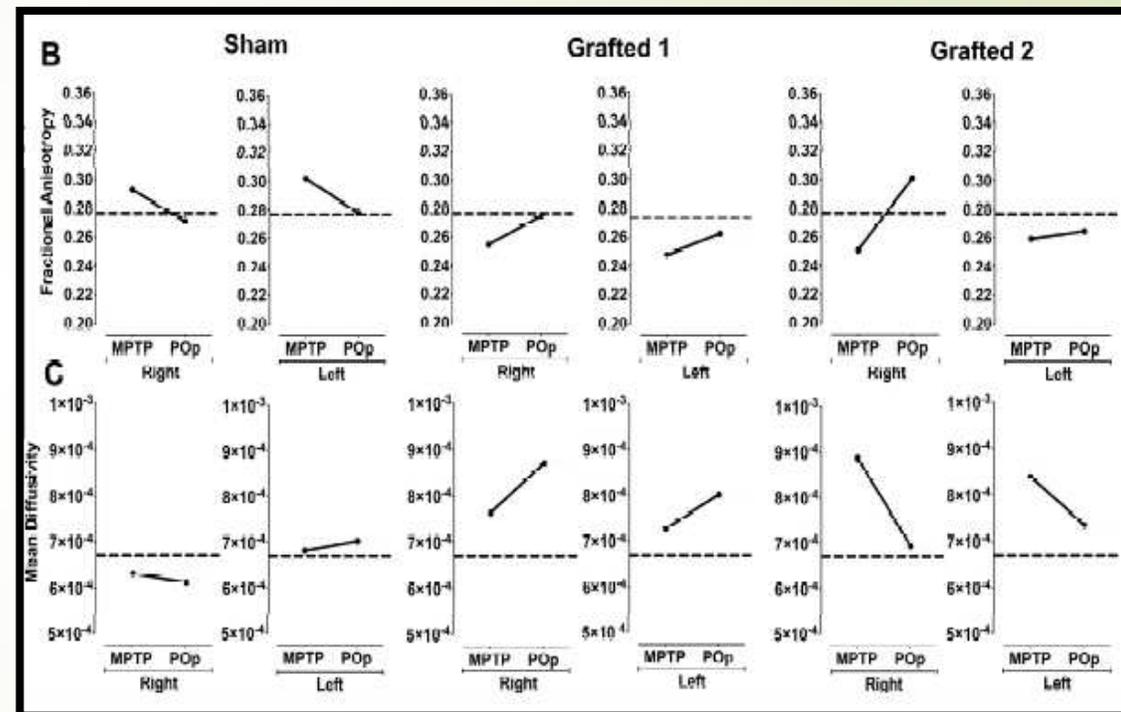
- Analisi quantitativa di coespressione per FOXA2/ $\beta$ III-tubulina e TH/ $\beta$ III-tubulina ha mostrato aumenti progressivi al giorno 42.
- Immunomarcatura mostra che il 72,2% era doppio positivo al giorno per MAP2 e FOXA2.
- Registrazioni elettrofisiologiche dimostrano al giorno 60 come le cellule non abbiano ancora acquisito caratteristiche mature.
- Al giorno 70 mediante HPLC in soluzione fisiologica (B) e dopo depolarizzazione chimica con mezzo isosmotico ad alto contenuto di potassio (HK) ha dimostrato che la procedura ha portato a DAN mature. Quindi le colture hanno rilasciato DA perché sono state stimolate con un mezzo ad alto contenuto di potassio. Pertanto questa procedura di differenziazione ha generato DAN maturi.



# TRAPIANTO DI DAN, DERIVATI DA hESC, IN NHP TRATTATI CON MPTP

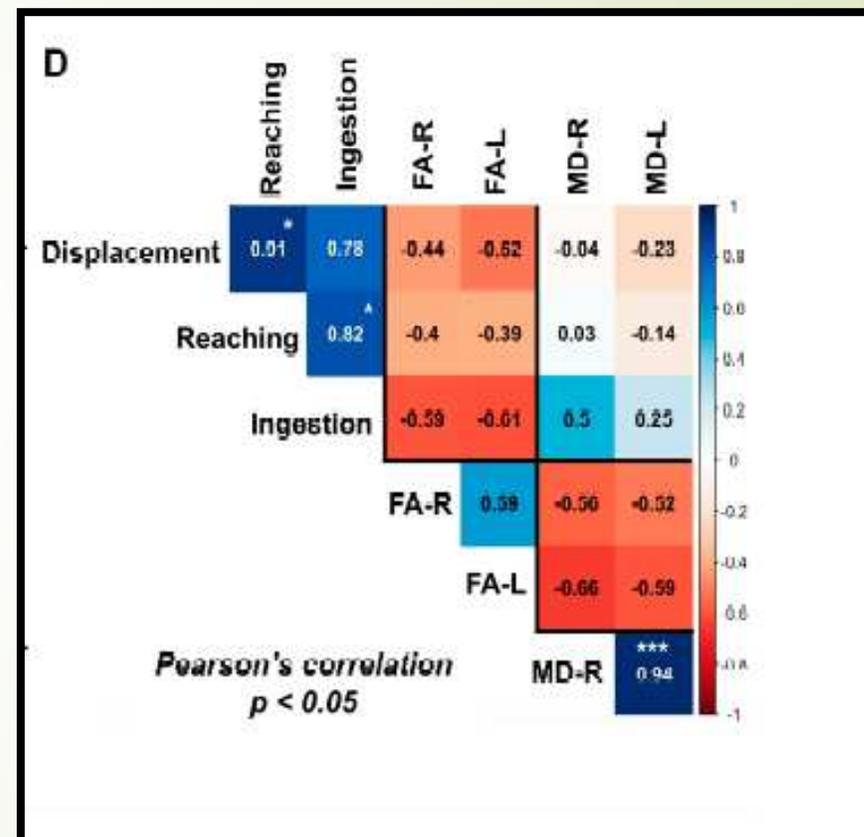
Le analisi dell'anisotropia frazionaria (FA) e diffusività media (MD) hanno evidenziato:

- In Sham NHP, FA diminuita nel putamen rispetto agli animali Grafted 1 e Grafted 2.
- MD nei Grafted 1 è aumentato e nei Grafted 2 riduzione bilaterale post-innesto.



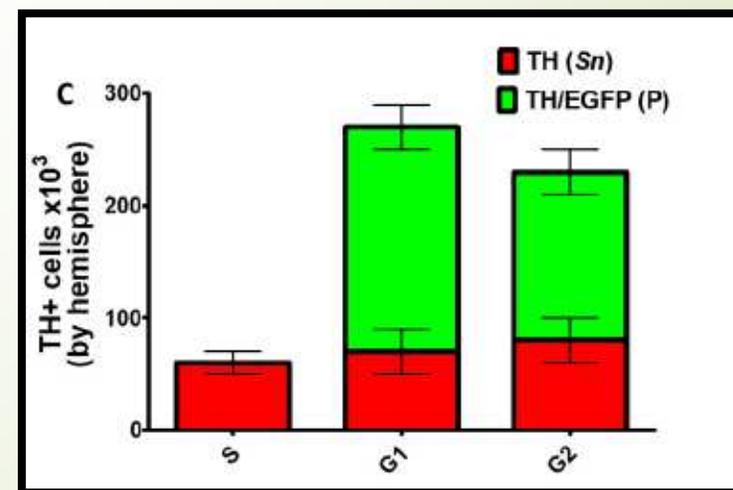
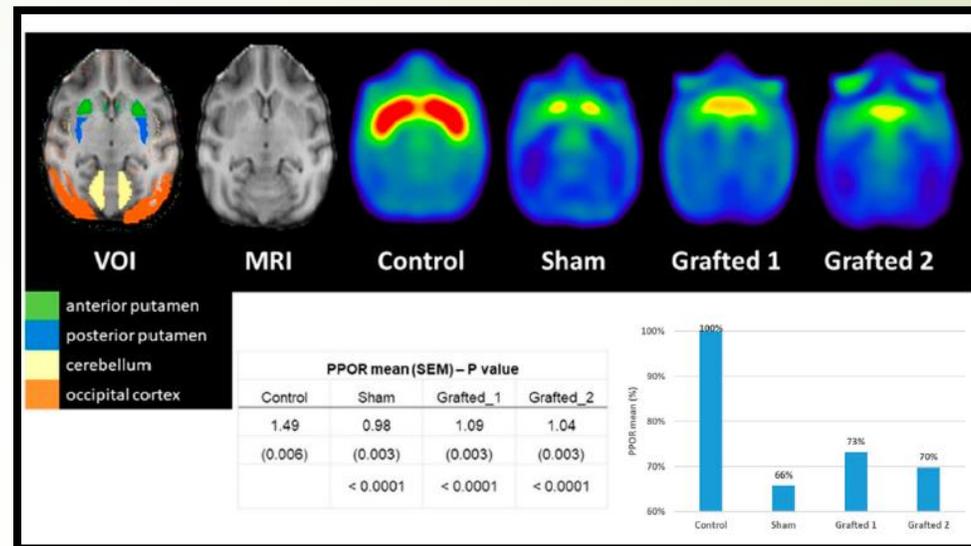
# TRAPIANTO DI DAN, DERIVATI DA hESC, IN NHP TRATTATI CON MPTP

- Eseguita analisi di correlazione di Pearson. Correlazione positiva tra raggiungimento, spostamento e ingestione (da 0,86 a 0,99).
- Valori FA in entrambi gli emisferi presentano correlazione positiva di 0,59.
- Per MD, correlazione positiva tra lato sinistro e destro (0,94).
- Confronto test comportamentali con FA (da -0,72 a -0,38) porta a correlazione negativa con spostamento, raggiungimento e ingestione.
- Aumento di FA e diminuzione dei tempi per eseguire compiti motori.



# TRAPIANTO DI DAN, DERIVATI DA hESC, IN NHP TRATTATI CON MPTP

- Eseguita scansione PET 11C-DTBZ.
- PPOR 11CDTBZ inferiore nello Sham rispetto al controllo e in Grafted 1 in Grafted 2 era maggiore.
- Aumentato legame 11C-DTBZ in entrambe i putamen.
- Mediante cellule TH positive evidenziate  $2.5 \times 10^5$  e  $2 \times 10^5$  cellule per emisfero in Grafted 1 e 2 rispettivamente.





# DISCUSSIONE



I vari studi osservati hanno dimostrato come la ricerca stessa, con l'obiettivo di trovare un approccio terapeutico definitivo, che è possibile affrontare la malattia di Parkinson. Questi approcci mirati e specifici consentono di combattere con precisione la degenerazione riducendo al minimo l'invasività. Attraverso la ricerca continua e un'attenta implementazione clinica, la terapia cellulare e l'uso innovativo di terapie mirate possono aprire la strada a un futuro migliore per coloro che vivono con la malattia di Parkinson. Anche se rimangono ancora diverse domande, di cui solo il tempo potrà darci risposta.

## BIBLIOGRAFIA

Surabhi Shastry, Junkai Hu, Mingyao Ying and Xiaobo Mao. Cell Therapy for Parkinson's. Disease Pharmaceutics 2023, 15, 2656. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122656>.

Adolfo López-Ornelas et al., Human Embryonic Stem Cell-Derived Immature Midbrain Dopaminergic Neurons Transplanted in Parkinsonian Monkeys Cells 2023, 12, 2738. <https://doi.org/10.3390/cells12232738>.

Takao Yasuhara, Masahiro Kameda, Tatsuya Sasaki, Naoki Tajiri and Isao Date. Cell Therapy for Parkinson's Disease. Cell Transplantation 2017, Vol. 26(9) 1551–1559.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE



## RIASSUNTO

La malattia di Parkinson (PD) è una malattia neurodegenerativa caratterizzata dalla progressiva perdita di neuroni dopaminergici della substantia nigra con riduzione della concentrazione di dopamina nello striato, questo provoca tremore a riposo, rigidità muscolare e bradicinesia. Nuove terapie per la malattia di Parkinson possono offrire solo un sollievo sintomatico e non affrontano la neurodegenerazione sottostante della malattia. I recenti sviluppi nella riprogrammazione cellulare hanno consentito lo sviluppo di terapie cellulari precedentemente irraggiungibili e la modellizzazione paziente-specifica della malattia di Parkinson attraverso cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). Le iPSC possiedono la capacità intrinseca di pluripotenza, consentendo la loro differenziazione diretta in diversi lignaggi cellulari, come i neuroni dopaminergici, offrendo così una strada promettente per affrontare il problema della neurodegenerazione nel contesto della malattia di Parkinson. Questa revisione narrativa fornisce una panoramica completa degli effetti della dopamina sui pazienti con malattia di Parkinson, illustra la versatilità delle iPSC e le loro capacità rigenerative ed esamina i vantaggi dell'utilizzo del trattamento con iPSC per la malattia di Parkinson rispetto alle attuali misure terapeutiche .



Le cellule staminali embrionali umane si differenziano in cellule specializzate, inclusi i neuroni dopaminergici del mesencefalo (DAN) e i primati non umani (NHP) iniettati con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina sviluppano alcune alterazioni osservate nei pazienti con malattia di Parkinson (PD). Si sono ottenuti DAN ben caratterizzati da hESC e trapiantati in due scimmie parkinsoniane per valutare i loro cambiamenti comportamentali e di imaging. I DAN delle hESC esprimevano marcatori dopaminergici, generavano potenziali d'azione e rilasciavano dopamina (DA) in vitro. Questi neuroni sono stati trapiantati bilateralmente nel putamen dei NHP parkinsoniani e, utilizzando tecniche di risonanza magnetica, si calcolano l'anisotropia frazionaria (FA) e la diffusività media (MD), per rilevare in vivo cambiamenti assonali e della densità cellulare nel cervello. Dopo l'innesto, gli animali hanno migliorato parzialmente alcune attività motorie. Il miglioramento dei movimenti motori era inversamente correlato con l'aumento del FA bilaterale. La MD non era correlata al comportamento ma presentava una correlazione negativa con FA. L'analisi post-mortem dei cervelli NHP ha mostrato che i DAN trapiantati sono sopravvissuti a lungo termine nel putamen, senza sviluppare tumori, negli animali immunodepressi. Tuttavia questi risultati devono essere confermati con gruppi più ampi di NHP ma i risultati di questo gruppo di ricerca supportano l'integrazione e la sopravvivenza dei DAN umani in questo modello preclinico di PD