



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO

P.O.R. ABRUZZO – OBIETTIVO 3 PER IL 2000/2006
PROTOCOLLO DI INTESA TRA REGIONE ABRUZZO,
COMITATO DI COORDINAMENTO REGIONALE DELLE UNIVERSITA' ABRUZZESI
E
UFFICIO SCOLASTICO REGIONALE
PER L'ATTUAZIONE DEL MACROPROGETTO
INNOVAZIONE, COMPETITIVITÀ, GOVERNANCE
(PROGETTO REGIONALE FORMAZIONE TECNICO SCIENTIFICA
E
PROGETTO IN_CO: AZIONI INTEGRATE PER LO SVILUPPO DI
“INTERMEDIARI DELLA CONOSCENZA TECNOLOGICA, ORGANIZZATIVA E GESTIONALE”)
“ASSEGNI REGIONALI PER ATTIVITÀ DI RICERCA E ALTA FORMAZIONE “ IN MATERIE TECNICO
SCIENTIFICHE, INTERVENTO IC4E – sotto - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO-

Relazione Attività periodo Gennaio- Giugno 2007

ASSEGNISTA DI RICERCA:

Dott.ssa Alessia Ioannoni

Tutor/ Responsabile Scientifico:

Prof.ssa Barbara Barboni

Nome istituzione a cui afferisce laboratorio ospitante:

Università degli studi di Chieti “G. D’Annunzio”

Nome e qualifica del responsabile del laboratorio ospitante:

Prof. L. Stuppia , professore straordinario di genetica medica

Durata soggiorno laboratorio ospitante:

6 mesi

Durante il trimestre aprile-giugno 2007 la dott.ssa Alessia Ioannoni ha collaborato con l'Università di Chieti, presso l'istituto di Biologia e Genetica, al fine di studiare le metodiche di coltura di amniociti. Lo scopo è quello di acquisire la tecnica di coltura delle cellule per studiarne in seguito le capacità differenziative.

In questa prima fase del progetto sono stati utilizzati campioni di liquido amniotico proveniente da amniocentesi eseguite in sede di macellazione da pecore tra i 70 e i 90 giorni di gestazione, calcolata attraverso la misurazione del CRL (crown-rump length), lunghezza del feto misurata dalla testa al coccige, e dalla misurazione del diametro dei cotiledoni. Durante i primi due mesi sono stati raffrontati alcuni protocolli di isolamento cellulare riportati in letteratura arrivando alla definizione dei parametri sperimentali critici per riuscire ad avere un recupero ed una crescita cellulare soddisfacenti. In seguito si è migliorata la resa dell'isolamento cellulare attraverso numerose prove di laboratorio e rielaborando protocolli diversi. Quindi si è proceduto come segue: il campione di liquido amniotico è stato centrifugato a 1800 rpm per 15 minuti ed il pellet cellulare ottenuto risospeso in circa 2 ml di Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).

Il pool cellulare è stato colorato con Trypan Blue, colorante vitale in grado di discriminare le cellule vitali (non colorate) da quelle non vitali (colorate in blu) e contato con camera di Burker. Le cellule sono state quindi piastrate alla densità di 2 milioni/petri in piastre da 10 cm di diametro. Il terreno utilizzato per nutrire le cellule è composto da DMEM con l'aggiunta di 20% di FCS (Fetal Calf Serum) e di 5ng/ml di fibroblasts growth factor. Le cellule sono state incubate in condizioni standard (37°C, 5% CO₂) e dopo 48 ore è stata verificata la loro adesione al substrato di coltura. Successivamente il medium è stato cambiato ogni 48 ore. Quando le cellule hanno raggiunto la confluenza sono state passate diluendole 1:4.

Al fine di poter stabilire la buona riuscita della coltura è stato indispensabile identificare i tipi cellulari presenti in coltura. L'identificazione è stata effettuata sfruttando la reazione con anticorpi che riconoscano antigeni di superficie e antigeni citoscheletrici. A tal proposito alcuni campioni cellulari sono stati fatti crescere su vetrino coprioggetto sterile. Una volta moltiplicatesi, le cellule in coltura sono state fissate in paraformaldeide al 4% per 10 minuti e quindi sottoposte ad un protocollo di immunocitochimica. Il protocollo prevede un passaggio in Triton 0,5% in PBS per 30 min. Le cellule sono state poi incubate con l'anticorpo primario per 1 ora. Gli anticorpi utilizzati sono stati: desmina; smooth muscle actin (SMA), markers citoscheletrici; fibroblast surface protein (FPS) marker di superficie. Dopo 3 lavaggi in PBS è seguita l'incubazione con anticorpi secondari FITC coniugati per 30 minuti. I nuclei delle cellule sono stati inoltre contrastati con DAPI. I vetrini sono stati infine osservati al microscopio a fluorescenza.

Gli amniociti proliferanti, aderiti su vetrino coprioggetto, hanno mostrato una positività per SMA e FPS mentre risultano negative per la desmina.

Questi risultati preliminari indicano che si è riusciti ad isolare e coltivare in vitro cellule del liquido amniotico di origine ovina. Tali cellule hanno reagito con gli anticorpi utilizzati permettendoci di attribuire la loro appartenenza, pur essendo necessarie ulteriori conferme, alla linea delle cellule mesenchimali.

Allo stato attuale sono in corso valutazioni per verificare la possibilità di dimostrare il potenziale staminale di queste cellule. Infatti da studi condotti su amniociti umani risulta un potenziale staminale proprio delle cellule che andrà confermato anche sulle stesse cellule di origine ovina. Sono necessarie ulteriori prove di immunocitochimica che evidenzino la positività delle cellule ovine per antigeni, come Oct-4, marker di staminalità. Tuttavia il primo dei problemi da affrontare in proposito è quello di stabilire se gli anticorpi siano in grado di riconoscere gli antigeni ovini. Tutti gli anticorpi in commercio sono infatti creati per la specie umana e spesso non cross-reagiscono con antigeni di diversa origine.