

Azienda Sperimentale di Surigheddu: realizzazione di una sala operatoria e di un annesso laboratorio per l'isolamento, espansione, caratterizzazione, crioconservazione e trapianto di cellule staminali adulte da cordone ombelicale, placenta e midollo osseo di pecora.

Il progresso scientifico nel campo delle cellule staminali lascia intravedere nuove frontiere terapeutiche per la cura di patologie considerate a tutt'oggi incurabili o fortemente invalidanti. Le speranze riposte nelle applicazioni cliniche della terapia cellulare e genica sono determinate dagli incoraggianti risultati ottenuti grazie alla sperimentazione effettuata sui modelli animali.

Le cellule staminali si caratterizzano per le seguenti fondamentali peculiarità :

- sono cellule indifferenziate, non specializzate
- sono in grado di moltiplicarsi per lunghi periodi senza differenziarsi
- possono dare origine a cellule altamente specializzate.

I campi di impiego delle cellule staminali sono numerosi, promettenti e considerati di grande interesse sia in campo sperimentale che terapeutico.

Dal punto di vista clinico l'interesse delle staminali risiede nelle loro potenzialità terapeutiche nella cura di alcuni tumori, di alcune malattie degenerative e autoimmuni difficilmente curabili con metodi classici ed infine nel loro impiego in ingegneria tissutale e medicina rigenerativa.

Le cellule staminali possono essere classificate in base alle loro potenzialità differenziative (totipotenti, pluripotenti, tripotenti, unipotenti, etc.) oppure in base alla loro origine (embrionale, fetale, neonatale, adulta).

Recenti ricerche hanno dimostrato la possibilità di indurre nelle cellule staminali embrionali un differenziamento in vitro verso tipi cellulari di natura miocardica, endoteliale, nervosa, pancreatica ed epatica confermando ulteriormente le potenzialità delle terapia cellulare nella cura del morbo di Parkinson, del morbo di Alzheimer, del diabete mellito, dell'infarto del miocardio e di altre patologie di natura degenerativa.

In contrasto con tali risultati incoraggianti, però, bisogna considerare la possibile trasformazione neoplastica delle cellule staminali embrionali in seguito a trapianto. Diversi autori hanno infatti riportato la formazione di tumori in modelli animali evidenziando la necessità di ulteriori ricerche per l'approfondimento dei meccanismi di proliferazione e differenziazione delle staminali embrionali. Inoltre, problemi di natura etica e legale ostacolano fortemente gli studi sulle cellule staminali embrionali di origine umana come si può evincere dalla scarso numero di paesi, a livello mondiale, che abbiano intrapreso una politica permissiva nei confronti della clonazione terapeutica. In Italia la legge 40/2004 sulla procreazione assistita vieta sia la clonazione che la crioconservazione degli embrioni umani che qualsiasi forma di selezione a scopo eugenetico degli embrioni e dei gameti.

Le cellule staminali adulte sono state isolate nell'uomo e in differenti modelli animali. La lista dei tessuti nei quali è stato possibile identificarle è in continua crescita ed include organi dove sino a poco tempo fa non si riteneva possibile la loro esistenza, quali ad esempio il sistema nervoso centrale. Le cellule staminali adulte sono cellule indifferenziate in grado di autorigenerarsi, probabilmente per tutta la vita dell'organismo, e di differenziarsi in elementi cellulari maggiormente specializzati dei vari tessuti o organi, garantendo, in tal modo, l'omeostasi dell'organismo animale. Rispetto alle cellule staminali embrionali, le cellule staminali adulte mostrano un'inferiore capacità di *self renewal* in vitro e una ridotta potenzialità di differenziare nei vari lineages cellulari, tanto da essere definite "multipotenti" in contrasto con la "pluripotenzialità" delle cellule staminali embrionali.

Le caratteristiche di plasticità delle cellule staminali adulte, rendendo possibile la loro differenziazione in differenti tessuti dell'organismo animale, consentono il loro impiego in differenti protocolli di trapianto d'organo. Considerato che le cellule trapiantate dovrebbero interagire con le cellule dell'ospite in maniera da formare sincizi funzionali, la massima attenzione è richiesta al fine di individuare il tipo cellulare che consenta le maggiori potenzialità di differenziazione nel senso desiderato.

La verifica della sicurezza dell'impianto di cellule staminali, vista l'ipotesi di una potenziale induzione di tumori o di insorgenza di fenomeni di rigetto, rappresenta un punto fondamentale. Per tale motivo i modelli animali in sperimentazione pre-clinica si rivelano indispensabili. Inoltre, come è noto, i modelli animali superano totalmente ogni implicazione di carattere etico e il modello pecora, in particolare, si sta rivelando notevolmente interessante e valido negli studi sperimentali sulle cellule staminali sia per la medicina veterinaria che per la medicina umana. Storicamente il modello animale più utilizzato è stato quello murino che per dimensione e filogenesi è molto distante dal modello umano. Per tali ragioni, è ancora necessaria una attenta sperimentazione su modelli più vicini all'uomo, privilegiando l'impiego di animali più evoluti, come ad esempio la pecora ed il suino. Tra l'altro, lo studio sul modello ovino non solo risponde al requisito sopra evidenziato, ma presenta anche un costo di attuazione relativamente basso.

Cellule staminali adulte da cordone ombelicale di pecora

Il sangue del cordone ombelicale rappresenta un'utilissima risorsa di cellule staminali adulte, in particolare progenitori ematopoietici, rispetto ad altre sedi di recupero quali midollo osseo e sangue periferico. Il cordone ombelicale, infatti, consente di ottenere diversi vantaggi quali:

- 1) agevole fonte di recupero di cellule staminali ematopoietiche;
- 2) minore incidenza di rigetto del trapianto;
- 3) ridotte possibilità di infezioni virali;
- 4) raccolta meno invasiva e priva di implicazioni etico-morali.

Il numero di cellule staminali ottenibili da un singolo cordone ombelicale, tuttavia, limita unicamente a pazienti pediatrici la possibilità del loro trapianto. Il numero minimo di cellule richiesto è ancora sconosciuto. Massimizzare il numero e la qualità di cellule staminali derivanti da sangue di cordone ombelicale disponibili per il trapianto risulta, quindi, di enorme importanza. E', pertanto, fondamentale implementare le tecniche di raccolta e di conservazione di queste cellule. Risulta, inoltre, di estrema importanza l'espansione in vitro delle cellule staminali, in modo

da ottenere un numero sufficiente per le diverse applicazioni cliniche delle stesse, superando in tal modo il problema della esiguità numerica nel prelievo da cordone ombelicale.

Il Laboratorio Diagnostica Clinica ha acquisito una discreta esperienza grazie anche alla collaborazione con l'Istituto Zootecnico e Caseario per la Sardegna (AGRIS), l'Istituto di Ginecologia e Ostetricia del Dipartimento di Farmacologia, Ginecologia e Ostetricia dell'Università degli Studi di Sassari e con l'Istituto Tecnologie Biomediche del parco scientifico e tecnologico Polaris di Pula, ponendo le basi per un proseguimento proficuo dell'attività in tale campo. Il Laboratorio Diagnostica Clinica partecipa ai seguenti progetti di ricerca ancora in corso di valutazione sia come capofila (Placenta Derived Stem Cells for Inducine Immunological Tolerance in Transplantation – Bando Cellule Staminali del Ministero della Salute) che come Unità Operativa (Development and identification of a panel of markers for animal - equine, feline, canine, ovine -. Mesenchymal stem cells to be used in veterinary cell therapy Bando Ricerca Finalizzata del Ministero della Salute). E', inoltre, unità operativa nel progetto PRIN recentemente approvato dal titolo "Induzione di tolleranza immunologica in modelli animali mediante trapianto di cellule stromali mesenchimali da placenta" in collaborazione con il CREM di Brescia e con il Dipartimento di Biologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Sassari. Le collaborazioni ai sopraindicati progetti di ricerca hanno reso possibile la pubblicazione di diversi lavori scientifici:

1. "Attempt to Identify Hematopoietic Progenitor Cells from Umbilical Cord Blood in Sheep: preliminary study". Bonelli P, Nicolussi P, Cappai P, Cosmi S, Dessole S, Dattena M. ESF-EMBO Symposium on Stem Cells in Tissue Engineering. Sant Feliu de Guixols (Spain) 28 October - 2 November 2006.
2. "Sheep mesenchymal stem cells isolated from bone marrow: expansion, characterization and in vitro differentiation". Bonelli P, Cugia G, Liuzzo I, Antuofermo E, Cosmi S, Nicolussi P, Dessole S, Dattena M. XXIV International Congress of the International Society for Analytical Cytology (ISAC), Budapest (Hungary), 17-21 May, 2008.
3. "Monoclonal antibodies against human CD34 antigens do not cross-react with ovine umbilical cord blood cells". Bonelli P, Nicolussi P, Manetti R, Antuofermo A, Dattena M. Italian Journal of Animal Science, 2010, 9(1): 26-28.
4. Tesi di Dottorato del Dott. Piero Bonelli dal titolo: "*Cellule staminali da cordone ombelicale di pecora: problematiche relative alla loro identificazione*". Docente Guida: Prof. Salvatore Pau. Correlatori: Dott. ssa Paola Nicolussi, Dott.ssa Maria Dattena. Dottorato di ricerca, XIX Ciclo, in "Riproduzione, Produzione e Benessere Animale", conseguito il 15 febbraio 2007 presso la Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari.

Proposta

La competenza finora acquisita nelle diverse collaborazioni, accanto ai risultati conseguiti, induce a continuare gli studi intrapresi, valorizzando, nel frattempo, anche l'attività dell'Ente e le professionalità impegnate.

La realizzazione di una idonea sala operatoria nell'azienda di Surigheddu, dove si possa effettuare sia l'isolamento di cellule staminali da varie fonti sia operazioni di trapianto nell'ambito di protocolli sperimentali pre-clinici di medicina rigenerativa, consentirebbe all'Istituto di rendere la propria attività autonoma senza dover ricorrere alla collaborazione logistica con altri Enti, come di fatto è avvenuto fino ad oggi.

Nell'Azienda di Surigheddu è presente una struttura che con alcune modificazioni potrebbe essere riadattata e utilizzata in parte come sala operatoria con un laboratorio dotato di attrezzature per la prima manipolazione delle colture cellulari. Anche presso il Laboratorio Diagnostica Clinica sarà necessario prevedere le strumentazioni che consentano di completare e ultimare l'attività.

La realizzazione di tale progetto costituirebbe il primo nucleo di trasformazione dell'Azienda di Surigheddu in azienda sperimentale (stabulario per animali da reddito), progetto sul quale l'Istituto da tempo ha manifestato l'intenzione di investire, realizzando un'azienda che possa offrire ad un'utenza più allargata sperimentazioni su animali in qualità. Non esiste, infatti, nella Regione Sardegna, e anche nell'Italia continentale, un Ente pubblico che possa offrire e fornire tutte quelle attività proprie di un'azienda sperimentale, mentre è sempre più difficile attuare la sperimentazione clinica in campo, vista la complessa normativa vigente in materia sanitaria e di tutela dell'ambiente. Il succedersi di epidemie e la crisi del settore zootecnico rende gli allevatori meno disponibili alla collaborazione. Va aggiunto che la sperimentazione attuata in allevamenti "privati" non è garantita dal punto di vista della qualità, in quanto l'allevatore non segue sempre scrupolosamente i protocolli che gli vengono forniti. L'Istituto Zooprofilattico, infine, dispone delle

professionalità adeguate sia nel campo della sperimentazione animale sia nella gestione di un'azienda sperimentale.

Sala operatoria per ovini

Tale struttura potrà essere realizzata nel ricovero destinato alle pecore e precisamente è stata identificata la zona attualmente destinata al deposito del fieno. I lavori da eseguire sono:

- Suddivisione dello spazio in due zone: una destinata alla sala operatoria e una a laboratorio, separate da una parete
- Ri-pavimentazione dei locali con materiale lavabile e disinfettabile e antisdrucchiolo (vernice epossidica) con predisposizione di un pozzetto di raccolta con scarico
- Impianto di controllo della temperatura, evitando la creazione di turbolenze nell'aria a contatto con gli animali
- Apertura di una o più finestre verso l'esterno nella zona "Laboratorio"
- Chiusura di una porta già esistente e sostituzione con una finestra
- Posizionamento di inferriate alle finestre e alle porte di accesso dall'esterno
- Apertura di una porta per l'uscita degli animali dopo l'operazione verso i box di ricovero post-operatorio in una zona che funga anche da sala pre-operatoria indispensabile per la preparazione degli animali prima degli interventi
- Rifacimento dei box (non ricompresi nel progetto, già in corso di attuazione), in modo da renderli più ampi e più accoglienti, mediante abbattimento di alcune pareti divisorie e rifacimento dei pavimenti e delle pendenze per lo scolo delle deiezioni
- Dotazione di energia elettrica e di acqua (prese a muro e lavandino in sala operatoria)

I costi non sono quantificabili, in quanto non di competenza del Laboratorio Diagnostica Clinica.

Dotazioni strumentali per il laboratorio a Surigheddu e presso la sede centrale

- N 2 microscopi a luce invertita, di cui uno dotato di videocamera
- N. 2 incubatori a CO₂
- N. 1 cappa a flusso laminare con supporto
- N. 1 sistema di purificazione dell'acqua per la produzione di acqua pura e ultrapura
- Banconi di laboratorio (anche utilizzando materiale di riciclo)
- Armadio per reagenti (anche utilizzando materiale di riciclo)
- Sgabelli (anche utilizzando materiale di riciclo)
- N. 1 frigorifero tipo familiare
- N.1 congelatore -80°C

Dotazioni strumentali per la sala chirurgica

- N. 1 tavolo operatorio per animali di media taglia
- N. 1 lampada scialitica
- N. 1 armadio con serratura per conservazione farmaci anestetici
- N. 1 servente
- N. 1 carrello
- N. 2 set ferri chirurgici e contenitori
- N 1 piantana porta flebo

- N. 1 stufa sterilizzatrice

Previsione di spesa

Dotazioni strumentali per il laboratorio a Surigheddu e presso la sede centrale

• 1 microscopio a luce invertita	5.000 €
• 1 microscopio a luce invertita con video camera	7.800 €
• 2 incubatori a CO ₂	15.600 €
• 1 sistema purificazione acqua	13.000 €
• 1 frigorifero tipo familiare	300 €
• 1 cappa a flusso laminare	5.000 €
• N.1 congelatore -80°C	7.000 €

Totale costi previsti

53.700 Euro (IVA esclusa)

Per quanto riguarda armadi, banconi e sgabelli possono essere utilizzati anche arredi dimessi da altri laboratori.

Dotazioni strumentali per la sala chirurgica

• N. 1 tavolo operatorio animali media taglia	1.850 €
• N. 1 lampada scialitica	900 €

• N. 1 armadio con serratura per conservazione farmaci anestetici	470 €
• N. 1 carrello servente	220 €
• N. 1 carrello	300 €
• N. 2 set strumenti base	1.189,60 €
• N. 1 piantana porta flebo	75 €
• N. 1 stufa sterilizzatrice	950 €
• N. 1 stativo su ruote	480 €
• N. 1 aspiratore	480 €
• N. 2 portaflacone	16 €
• N. 2 cestelli tondi	80 €
• N. 1 scatola acciaio inox	75 €
• N. 1 divaricatore addominale	150 €
TOTALE (scontato)	9.155,60 IVA esclusa

Totale generale 62.855,60 IVA esclusa