

RENDICONTAZIONE FINALE PRODUTTIVITA' SCIENTIFICA DOTTORESSA MIRELLA MEREGALLI TRIENNIO 2014-2017

L'attività di ricerca svolta dal nostro gruppo di lavoro è di tipo traslazionale e verifica la possibilità di trasformare le scoperte scientifiche che arrivano dal laboratorio in applicazioni cliniche. L'obiettivo, in altre parole, è quello di costruire una sorta di **ponte tra la scienza e la medicina**, per poter utilizzare nel modo migliore le scoperte dei ricercatori. L'interesse primario del gruppo è costituito, da anni, dallo studio delle cellule staminali adulte con potenzialità miogeniche per una loro applicazione clinica e, nello specifico, per il loro utilizzo nello sviluppo di nuove terapie cellulari per la lotta alle distrofie muscolari, in particolare alla distrofia muscolare di Duchenne, patologia che rimane ancora priva di cure efficaci e risolutive.

Nel 2014, abbiamo pubblicato sulla rivista scientifica "*Frontiers in Physiology*" una review che descrive i progressi fatti nell'isolamento di nuove sottopopolazioni di cellule staminali e nella creazione di nicchie artificiali di cellule staminali, argomentando come queste tecnologie emergenti offrano importanti premesse per futuri approcci terapeutici alle malattie muscolari e all'atrofia muscolare associate all'invecchiamento. La terapia cellulare è ad oggi uno degli approcci più promettenti; è stato, infatti, dimostrato ampiamente che le cellule possono partecipare attivamente alla rigenerazione tessutale; in tal senso la recente identificazione di differenti tipologie di cellule staminali multipotenti, alcune delle quali particolarmente adeguate per essere utilizzate in protocolli di terapia cellulare, ha creato nuove interessanti prospettive nel trattamento di malattie genetiche che ancora oggi non hanno una terapia efficace e risolutiva. Negli ultimi 10 anni, infatti, sono stati fatti importanti passi avanti nella conoscenza delle cellule staminali: la definizione di nicchia, l'identificazione di segnali regolatori della mobilizzazione e dell'homing; progressi questi che costituiscono degli strumenti fondamentali per lo sviluppo di nuovi promettenti protocolli di terapia cellulare. Le cellule mesenchimali (MSCs), in particolare, sono cellule staminali non ematopoietiche con potenzialità di differenziare in diversi lineages; tali cellule possono essere isolate da diverse fonti tissutali, quali il tessuto adiposo, il midollo osseo e lo stesso tessuto muscolare, e sono in grado di rilasciare molecole con proprietà anti-infiammatorie capaci di modulare la risposta immunitaria umorale e cellulare. Recentemente sono stati pubblicati molti studi realizzati a livello preclinico e clinico che prevedono l'utilizzo di cellule mesenchimali. In tal senso, abbiamo descritto sulla rivista scientifica "*Stem Cells International*", le caratteristiche delle cellule MSCs e come tale popolazione cellulare, grazie alle proprie potenzialità immuno-modulanti, possa essere considerata uno strumento prezioso per il trattamento di patologie infiammatorie, degenerative ed autoimmuni. Dalla letteratura emerge come la distrofia muscolare di Duchenne sia una malattia caratterizzata da assenza della distrofina, da infiammazione cronica, da danni al sarcolemma, e dalla degenerazione dei muscoli scheletrici. Tra i molteplici meccanismi patologici proposti per la DMD, lo stress ossidativo e l'infiammazione sono direttamente coinvolti nel processo distrofico. Numerosi elementi caratteristici del fenotipo distrofico, soprattutto l'infiammazione e l'attivazione della risposta immunitaria innata o acquisita, sono caratteristiche importanti di tutte le distrofie muscolari. Sono stati pubblicati numerosi studi in cui è stata



www.fondodmd.it info@fondodmd.it
Telefono: +39 333 6838999

ASSOCIAZIONE
la Nostra Famiglia

Via Don Luigi Monza, 1 22037 Ponte Lambro (CO)

dimostrata la possibilità di una risposta immunitaria verso il vettore virale utilizzato in terapia genica per veicolare ad esempio porzioni geniche che consentano di ripristinare il corretto schema di lettura del gene. Nella rivista internazionale **“Biomed Research International”** abbiamo cercato di correlare le attuali conoscenze scientifiche circa il coinvolgimento della risposta immunitaria nella distrofia muscolare. Da alcuni anni la letteratura scientifica ha più volte sottolineato come per patologie degenerative, come appunto la DMD, sia risultato vincente un approccio che preveda la combinazione di terapia genica e terapia cellulare. Inoltre, è stato messo in evidenza come la combinazione di terapia genica e terapia cellulare con utilizzo di cellule staminali adulte consenta, ad oggi, di avere discrete chances per la gestione e la terapia della DMD. Nel corso del 2014 abbiamo pubblicato due capitoli di libro: uno pubblicato su **“Horizon in Neuroscience Research”** in cui abbiamo descritto le potenzialità delle cellule staminali nel trattamento di patologie neuromuscolari e neurodegenerative; l'altro, invece, pubblicato su **“Stem Cell Biology and Regenerative Medicine”** in cui abbiamo presentato una overview delle possibili terapie cellulari in modelli animali preclinici di distrofia muscolare. L'attenzione è stata focalizzata sui pro- e i contro del traslare i risultati scientifici dalla fase preclinica all'applicazione clinica. Negli ultimi anni la ricerca ha evidenziato come l'insorgenza e la gravità di alcune patologie quali cancro, morbo di Alzheimer e malattie cardiovascolari siano fortemente influenzate da fattori ambientali come la dieta, il fumo e lo stile di vita. E' in quest'ottica di ricerca che la genomica nutrizionale sta cercando di capire come diversi cibi e composti naturali possano portare miglioramenti ad alcune malattie come Alzheimer, cancro e sclerosi multipla. In un regime dietetico sano, volto al recupero della forma fisica fare uso di alcuni cibi funzionali detti anche nutraceutici deve essere di primaria importanza. Pertanto, la ricerca ha volto l'attenzione allo studio di strategie alternative a quelle farmacologiche per il trattamento delle distrofie muscolari al fine di migliorare la qualità della vita dei pazienti. In tal senso nel 2015 abbiamo pubblicato sulla rivista internazionale **“BioMed Research International”** risultati inerenti agli effetti di una dieta a base di una miscela di polifenoli naturali (ProAbe) sull'architettura e la funzionalità muscolare di topi distrofici mdx. I muscoli dei topi trattati quotidianamente con il composto hanno mostrato una riduzione della fibrosi e della necrosi muscolare oltre ad una migliore vascolarizzazione. Il recupero delle caratteristiche morfologiche del muscolo distrofico porta ad un incremento della resistenza dei topi distrofici che hanno ricevuto il ProAbe. Questi dati confermano che una dieta a base di una miscela di polifenoli, importanti agenti antiossidanti, potrebbe rappresentare una strategia coadiuvante al trattamento della distrofia muscolare di Duchenne. Alla luce dei promettenti risultati raggiunti a livello preclinico nel modello animale, abbiamo presentato al Comitato Etico della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico lo studio dal titolo **“STUDIO MONOCENTRICO IN DOPPIO CIECO RANDOMIZZATO DELL'EFFETTO DI UNA MISCELA DI FLAVONOIDI ED ACIDI GRASSI NATURALI IN PAZIENTI AFFETTI DA DISTROFIA MUSCOLARE”**, che in data 15/7/2015 è stato approvato con parere favorevole 1768 (determina 787/2015). Lo studio mira a valutare la possibilità di integrare la dieta di pazienti affetti da diverse tipologie di distrofia (distrofia muscolare di Duchenne, distrofia Facio-Scapolo-Omerale, e Distrofia dei Cingoli) con la somministrazione di una miscela di composti naturali. L'obiettivo principale di questo studio vuole essere valutare l'effetto a livello muscolare di una miscela di flavonoidi naturali in pazienti distrofici. Si desidera, infatti, raggiungere il suddetto obiettivo primario attraverso analisi funzionali indagando la capacità di tale composto di agire sulla forza muscolare aumentando la resistenza all'esercizio e migliorare la qualità di vita dei pazienti distrofici: prolungare il tempo di cammino autonomo, ridurre l'affaticabilità, prolungare alcune autonomie come salire/scendere le scale. La valutazione di come e quanto la qualità della vita dei pazienti che hanno





www.fondodmd.it info@fondodmd.it
Telefono: +39 333 6838999

ASSOCIAZIONE
la Nostra Famiglia

Via Don Luigi Monza, 1 22037 Ponte Lambro (CO)

assunto l'integratore alimentare, oggetto dello studio, potrebbe essere migliorata verrà realizzata grazie all'analisi dei questionari valutativi della limitazione del movimento (ACTIVLIM/ABILHAND e scale EK) che i pazienti compileranno presso il proprio domicilio e consegneranno mensilmente al clinical monitor. Queste scale valutative delle attività della vita quotidiana, per come essa viene percepita dal paziente stesso, o dai suoi genitori nel caso specifico, di bambini DMD, permettono di poter realizzare un'analisi oggettiva ed omogenea. La performance muscolare dei pazienti distrofici inclusi in questo studio verrà valutata tramite il test del cammino per 6 minuti (6-minute walking test; 6MWT). Il 6MWT è stato recentemente scelto come strumento di valutazione della performance muscolare in trial clinici multicentrici internazionali in pazienti deambulanti affetti da diversi tipi di distrofia muscolare (DMD, FSHD, LGMD). La forza muscolare dei pazienti trattati verrà misurata anche utilizzando il dinamometro isometrico/isocinetico Biodex che permette una valutazione quantitativa della forza muscolare distrettuale ai 4 arti. Ulteriore obiettivo dello studio sarà valutare la capacità della miscela di polifenoli naturali di mobilitare alcune popolazioni di cellule staminali/progenitori dal comparto midollare al circolo ematico periferico. Questo obiettivo verrà perseguito realizzando un'analisi immunofenotipica dei campioni di sangue periferico dei pazienti trattati. Come descritto in letteratura, è noto che alcuni composti naturali sono in grado di mobilitare popolazioni cellulari (ad esempio cellule CD133+) dal comparto midollare al sangue periferico e tali popolazioni, con potenzialità mio-endoteliali, potrebbero successivamente raggiungere i distretti muscolari compromessi e partecipare alla rigenerazione tessutale. Lo scopo di questo studio vuole essere quello di testare un integratore alimentare costituito da una miscela di composti naturali con caratteristiche anti-infiammatorie ed anti-ossidanti che possa essere indicato quale coadiuvante la terapia cortisonica in uso nel trattamento di pazienti affetti da distrofia muscolare. La collaborazione con il professore Gorca Orive del Dipartimento di Farmacologia dell'Università dei Paesi Baschi di Vittoria ha permesso una pubblicazione sulla rivista **"Current Pharmaceutical Biotechnology"**, in cui sono state descritte alcune delle tecnologie emergenti negli ultimi anni in relazione allo sviluppo di nuovi biomateriali, all'ottimizzazione di alcune micro- e nanotecnologie per il delivery di farmaci e cellule o per l'applicazione di cellule staminali come prodotti terapeutici discutendone tutti i potenziali benefici. Nel corso dell'anno 2015 abbiamo focalizzato la ricerca sull'approfondimento della patofisiologia della distrofia muscolare di Duchenne, cercando di individuare i meccanismi di base, identificare prodotti farmacologici e cellulari da utilizzare in ambito terapeutico e trovare biomarkers che possano coadiuvare i medici nella diagnosi, nel fare una valutazione della progressione della malattia e nel poter, quindi, prevedere il futuro clinico dei pazienti. Sulla rivista scientifica internazionale **"Current Gene Therapy"** abbiamo pubblicato un lavoro in cui per la prima volta viene descritto il rilascio di AONs da parte di cellule staminali umane CD133+ ingegnerizzate con vettori lentivirali mediato da esosomi e come questo processo permetta il rescue di distrofina murina in vivo. Inoltre, si sottolinea come gli AONs potrebbero essere internalizzati dalle cellule ospite suggerendo un potenziale ruolo degli esosomi, in grado di agire come carriers di vescicole, nello sviluppo di una potenziale terapia per DMD. Nel 2016, abbiamo pubblicato sulla rivista "Development", uno studio che apre la strada allo sviluppo di nuove indagini sui meccanismi che regolano l'insorgenza della Distrofia Muscolare di Duchenne a livello fetale. Grazie a questo studio è stato possibile fare luce su dettagli, finora sconosciuti, di un ruolo non meramente strutturale della distrofina nello sviluppo della DMD sin dai primi stadi della formazione del muscolo. In particolare, si è dimostrato che la mancanza di distrofina porta ad un incremento di calcio nelle fibre muscolari ed un deficit maturativo del muscolo scheletrico di feti distrofici





www.fondodmd.it info@fondodmd.it
Telefono: +39 333 6838999

ASSOCIAZIONE
la Nostra Famiglia

Via Don Luigi Monza, 1 22037 Ponte Lambro (CO)

di 12 settimane di gestazione, aprendo nuove prospettive nella ricerca per la DMD. La collaborazione con la professoressa Irene Cetin del Dipartimento di Scienze Cliniche dell'Università degli Studi di Milano,

abbiamo pubblicato sulla rivista internazionale *"Stem Cells Translational Medicine"* un lavoro che ha dimostrato per la prima volta un potenziale ruolo delle cellule staminali mesenchimali isolate dalla placenta nel limitare la crescita intrauterina; queste evidenze aprono nuove prospettive per la cura delle IUGR. Abbiamo, inoltre, sottomesso alla rivista *"Nature"* il lavoro inerente al trapianto autologo in cani distrofici GRMD di cellule staminali muscolari CD133+ ingegnerizzate con il vettore lentivirale contenente gli AONs in grado di far saltare gli esoni 6-8 nel gene della distrofina. Scopo principale del lavoro era determinare la capacità delle cellule CD133+ ingegnerizzate e iniettate intra-arteria di migrare e fondere con il muscolo distrofico e dare origine all'espressione di una distrofina più corta ma funzionante. A tale scopo i cani, suddivisi in base alla gravità del fenotipo clinico, hanno ricevuto 3 iniezioni consecutive; l'espressione della distrofina è stata valutata mediante l'analisi di tre biopsie muscolari ed un follow-up clinico di 5 anni ci ha permesso di avere dati obiettivi in merito al miglioramento clinico. Dopo le prime due iniezioni tutti i cani trattati con le cellule ingegnerizzate hanno manifestato un miglioramento clinico. Dopo la terza iniezione, tre cani GRMD hanno sviluppato una reazione immunitaria T-mediata verso la forma saltata della distrofina, suggerendo una risposta immunitaria adattiva contro la distrofina.

Maggio 2016

