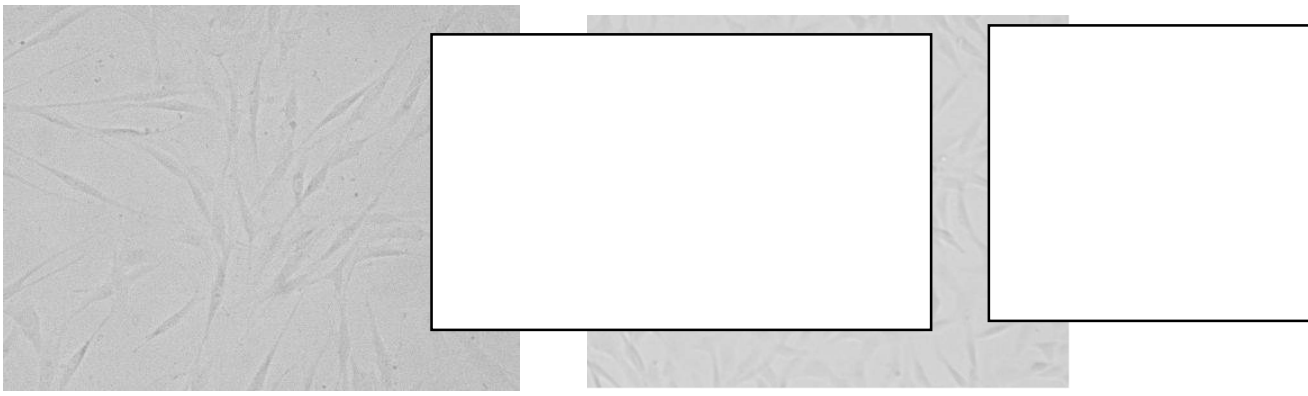
L'obiettivo del progetto, che ho presentato per il conseguimento della borsa offerta dalla LEAL, è quello di allestire un modello alternativo *in vitro* per valutare i rischi dell'esposizione ad inquinanti ambientali, farmaci e xenobiotici sullo sviluppo neurologico umano, usando cellule staminali adulte di origine umana, derivate da procedure di liposuzione e destinate altrimenti allo scarto, da indurre verso il differenziamento neuronale.

In accordo con studi recenti, che dimostrano la possibilità di espandere le cellule staminali adulte umane in presenza di lisato piastrinico (di origine umana, e anche esso materiale di scarto dei centri trasfusionali), abbiamo coltivato le cellule staminali adipose umane (hADSCs) in un terreno supplementato con un lisato piastrinico umano (prodotto in commercio, con un contenuto standardizzato e definito di fattori di crescita) quale sostituto del siero fetale bovino, comunemente utilizzato, per le colture *in vitro*.

Questo progetto rappresenta un importante approccio verso l'allestimento di nuovi metodi alternativi *in vitro* per la valutazione della neurotossicità.

Il lavoro è suddiviso in diverse fasi: la prima è stata quella di isolare le hADSCs da materiale di scarto chirurgico (liposuzione o lipofilling) del blocco operatorio dell'Unità Operativa di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva dell'IRCSS, Ospedale San Martino - Genova.

Dopo di che abbiamo cercato di stabilire la migliore concentrazione dei due costituenti il lisato piastrinico commerciale utilizzato, per avere una buona amplificazione delle hADSC, per almeno 2-3 subcolture. Una volta stabilite le condizioni di crescita migliori, abbiamo congelato in azoto liquido (-180°C) le cellule così amplificate per poter successivamente procedere al differenziamento neurogenico.



hADSCs coltivate per 24h (pannello A) e 5 giorni (pannello B) in presenza del medium di coltura supplementato con lisato piastrinico, sostituto del siero fetale bovino.

Le hADSCs, dopo amplificazione in presenza di lisato piastrinico, sono indotte al differenziamento secondo un protocollo già standardizzato in laboratorio, con opportune

variazioni, sulla base dei dati raccolti dalla letteratura scientifica più recente. I terreni di differenziamento non contengono siero e sono arricchiti con diversi specifici fattori di crescita, noti per la capacità di indurre le cellule a differenziarsi verso la linea neurogenica. Attualmente stiamo verificando quale dei 3 protocolli scelti, ognuno con un cocktail diverso di fattori di crescita, dia la possibilità di ottenere cellule neurogeniche in grado di esprimere la funzionalità neuronale migliore.

Questa fase è molto delicata perché le hADSCs sono molto sensibili ai vari fattori di crescita utilizzati. Infatti le cellule per differenziarsi devono adattarsi alle nuove condizioni di coltura, attivando e spegnendo geni bersaglio per riprogrammarsi verso il nuovo tipo cellulare maturo che vogliamo che esprimano. Tutto ciò richiede molto tempo, per essere certi di avere una cellula con quelle funzioni neuronali che riteniamo migliori per il nostro progetto.

I primi tentativi fatti finora non sono ancora soddisfacenti, quindi stiamo lavorando sul miglioramento del protocollo di pre-differenziamento per dare alle cellule la giusta "spinta", ossia la stimolazione verso l'attivazione dei geni opportuni per la sintesi di proteine che le porteranno al differenziamento verso la linea neurogenica, per poterle utilizzare nella valutazione *in vitro* della neurotossicità umana allestendo modelli e metodi animal-free.