

Academia Romana

Institutul de Biologie si Patologie Celulara „Nicolae Simionescu”

TEZA DE DOCTORAT

**STUDIUL PLASTICITATII CELULELOR STEM
FETALE CU POTENTIAL TERAPEUTIC**

Conducător de doctorat:

Acad. Maya Simionescu

Doctorand:

Andrei Constantinescu

Bucuresti, 2013

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

I. INTRODUCERE

II. STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII

Capitolul 1. Celulele stem si terapia celulara

1.1. Celulele stem

1.1.a. Tipuri de celule stem

1.1.b. Rolul celulelor stem

1.1.c. Importanta celulelor stem

1.2. Diferentierea celulelor stem

1.1.a. Celulele totipotente

1.1.b. Celulele pluripotente

1.1.c. Celulele multipotente hematopietice

1.1.d. Celulele multipotente mezenchimale

1.1.e. Celulele oligopotente

1.1.f. Celulele unipotente

1.1.g. Celulele cu pluripotenta indusa

Capitolul 2. Surse de celule stem

2.1. Celule stem embrionare

2.2. Celule stem fetale

2.3. Celule stem adulte

Capitolul 3. Utilizarea celulelor stem

3.1. Celulele stem in cercetarea fundamentala

3.2. Celulele stem in cercetarea farmacologica

3.3. Aplicatii terapeutice ale celulelor stem

III. CONTRIBUTIA ORIGINALA

Capitolul 1. Evaluarea potentialului de recelularizare vasculara al celulelor stem fetale izolate din gelatina Wharton

1.1. Introducere

1.2. Obiective

1.3. Metodologie si rezultate

1.3.1. Izolarea si caracterizarea celulelor stem din gelatina Wharton

1.3.1.a. Izolarea celulelor stem

1.3.1.b. Imunofenotiparea celulelor stem

- 1.3.2. Diferentierea si caracterizarea celulelor stem din gelatina Wharton
 - 1.3.2.a. Diferentierea catre linia endoteliala a celulelor mezenchimale
 - 1.3.2.b. Imunofenotiparea celulelor endoteliale progenitoare
- 1.3.3. Izolarea si prelucrarea arterelor din cordonul ombilical
 - 1.3.3.a. Izolarea arterelor
 - 1.3.3.b. Decelularizarea arterelor
- 1.3.4. Evaluarea potentialului de recelularizarea vasculara
 - 1.3.4.a. Obtinerea co-culturilor celule-tesut vascular
 - 1.3.4.b. Analiza histologica
 - 1.3.4.c. Analiza prin microscopie de fluorescenta
 - 1.3.4.d. Evaluare imunofenotipica
- 1.4. Discutii si concluzii

Capitolul 2. Caracterizarea si evaluarea potentialului terapeutic al celulelor din lichidul amniotic

- 2.1. Introducere
- 2.2. Obiective
- 2.3. Metodologie si rezultate
 - 2.3.1. Caracterizarea celulelor din lichidul amniotic
 - 2.3.1.a. Caracterizarea morfologica
 - 2.3.1.b. Analiza ultrastructurala
 - 2.3.1.c. Imunofenotiparea celulelor mezenchimale
 - 2.3.1.d. Profilul transcriptomic al celulelor mezenchimale
 - 2.3.2. Diferentierea celulelor stem din lichidul amniotic
 - 2.3.2.a. Diferentierea celulelor stem catre linia endoteliala
 - 2.3.2.b. Analiza ultrastructurala a celulelor endoteliale
 - 2.3.2.c. Imunofenotiparea celulelor endoteliale
 - 2.3.3. Sortarea celulelor CD117 pozitive din lichidul amniotic
 - 2.3.3.a. Sortarea prin citometrie de flux
 - 2.3.3.b. Analiza morfologica a celulelor CD117 pozitive sortate
 - 2.3.3.c. Analiza imunofenotipica a celulelor stem sortate
- 2.4. Discutii si concluzii

IV. CONCLUZII GENERALE

V. PERSPECTIVE

VI. REFERINTE BIBLIOGRAFICE

CUVINTE CHEIE

Celule stem fetale

Celule stem mezenchimale

Glatina Wharton

Lichid amniotic

Tesut fetal uman vascular

Diferentiere celulara

Celule endoteliale progenitoare

Recelularizare vasculara

Citometrie de flux

Sortare celulara

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Scopul acestei lucrari a fost atat evidentierea plasticitatii celulelor stem mezenchimale din surse fetale cat si evaluarea potentialului terapeutic al celulelor stem fetale si implicatiile acestora in medicina regenerativa. Astfel, am dorit sa investigam capacitatea de diferentiere a celulelor mezenchimale izolate din gelatina Wharton catre celule endoteliale progenitoare si sa evaluam potentialul de regenerare tisulara cardiovasculara al acestora. In acest scop ne-am propus sa stabilim un model *in vitro* bazat pe tesut vascular fetal uman pornind de la arterele din cordonul ombilical in vederea investigarii potentialului de recelularizare al celulelor endoteliale progenitoare deiferentiate din celule stem mezenchimale fetale.

Totodata, am dorit sa investigam plasticitatea celulelor stem mezenchimale din lichidul amniotic prin analiza aprofundata a capacitatii acestora de a se diferentia in celule endoteliale progenitoare in vederea evaluarii potentialului terapeutic. In acest scop am dorit sa investigam atat imunofenotipul cat si profilul transcriptomic al celulelor mezenchimale din lichidul amniotic dar si detaliile ultrastructurale ale celulelor endoteliale differentiate din celulele mezenchimale din lichidul amniotic.

Teza este structurata in doua parti. Prima parte, **Studiul actual al cunoasterii** este organizata in 3 capitole in care sunt descrise aspecte legate de celulele stem (Capitolul 1 din *Studiul actual al cunoasterii*), precum ierarhizarea celulelor stem si rolul lor (Capitolul 1.1 din *Studiul actual al cunoasterii*) cat si capacitatea acestora de a se diferentia (Capitolul 1.2 din *Studiul actual al cunoasterii*). Urmeaza o descriere a tipurilor de celule in functie de sursa din care sunt obtinute acestea cat si o trecere in revista metodelor de izolare (Capitolul 2 din *Studiul actual al cunoasterii*), iar in ultimul capitol este detaliata utilizare celulelor stem atat in cercetarea fundamentala si in cercetarea farmacologica cat si in medicina regenerativa (Capitolul 3 din *Studiul actual al cunoasterii*).

In cea de-a doua parte a lucrarii, **Contributia originala** studiile au fost structurate in doua capitole. In vederea evaluarii potentialului de recelularizare vasculara al celulelor stem fetale izolate din gelatina Wharton (Capitolul 1 din *Contributia originala*) am urmarit izolarea, caracterizarea si diferetiarea celulelor mezenchimale din gelatina Wharton catre o linie endoteliala si stabilirea unui model *in vitro* bazat pe tesut vascular fetal uman pornind de la arterele din cordonul ombilical. Astfel am dorit sa investigam potentialul de recelularizare al celulelor endoteliale progenitoare atat la nivel histologic cat si la nivel imunofenotipic.

Rezultatele obtinute demonstreaza capacitatea celulelor stem mezenchimale din gelatina Wharton de a se diferentia catre celule endoteliale progenitoare cu un real potential terapeutic in regenerarea vasculara. Aceste celule ar putea avea un impact major in medicina regenerativa datorita imunogenicitatii scazute si potentialului terapeutic.

In studiul privind evaluarea plasticitatii si potentialului terapeutic al celulelor din lichidul amniotic (Capitolul 2 din *Contributia originala*) am urmarit realizarea unei caracterizari complete a acestor celule, la nivel imunofenotipic, ultrastructural si molecular. In acest scop am utilizat citometria de flux pentru investigarea markerilor de suprafata, microscopia electronica si tehnica de real-time PCR (Capitolul 2.3.1 din *Contributia originala*). In acelasi timp, am dorit sa evaluam potentialul de diferentiere al celulelor din lichidul amniotic prin inducerea diferentierii catre celule endoteliale (Capitolul 2.3.2 din *Contributia originala*). Deasemenea, am urmarit stabilirea fenotipului celulelor stem CD117 pozitive din lichidul amniotic prin sortarea acestora si analiza imunofenotipica a culturilor de celule CD117 pozitive obtinute (Capitolul 2.3.3 din *Contributia originala*).

Rezultatele obtinute demonstreaza capacitatea celulelor din lichidul amniotic de a se diferentia in celule endoteliale mature prin prezenta markerilor de suprafata specifici acestor celule, dar si prin prezenta structurilor intracelulare specifice precum veziculele plasmalemale si corpusculii Weibel-Palade. Mai mult decat atat am observat diferentele imunofenotipice ale celulelor CD117 pozitive din populatia heterogena de celule din lichid in vederea stabilirii relatiilor dintre celulele CD117 pozitive si CD117 negative in cadrul populatiei heterogene.

In concluzie, in ceea ce priveste potentialul regenerativ al celulelor izolate din gelatina Wharton, rezultatele noastre au demonstrat ca arterele decelularizate din cordon ombilical uman pot fi utilizate ca matrici acelulare si reprezinta un bun model experimental *in vitro*. Am demonstrat ca EPC-urile diferentiate din MSC-uri din gelatina Wharton pot repopula tesutul vascular lezat/decelularizat evidentiat de expresia markerilor specifici fenotipului endotelial CD31+/CD34+/CD105+/CD133+ la nivelul arterelor recelularizate. Datele de histologie si citometrie de flux obtinute sugereaza ca EPC-urile diferentiate din MSC-uri de origine fetala au un intaltn potential terapeutic, prin capacitatea acestora de repopulare a vaselor de sange lezate/decelularizate.

In ceea ce priveste celulele izolate din lichidul amniotic, putem concluziona ca aceste prezinta un imunofenotip specific celulelor stem mezenchimale prin exprimarea markerilor CD29, CD90 si CD73. Imunofenotipul CD29+/CD90+/CD105+/CD133+/CD146+ al acestor celule, ne sugereaza prezenta unor markeri specifici si altor tipuri de celule, precum CD105

specific celulelor endoteliale si CD133 prezent pe suprafata celulelor stem hematopoietice si a celulelor endoteliale progenitoare. In ciuda capacitatii foarte ridicate de proliferare a celulelor din lichidul amniotic, imunofenotipul acestora se modifica dupa 10 zile in cultura, devenind CD29+/CD90-/CD105-/CD133-/CD146+. La nivel molecular AFC-urile prezinta atat markeri de celule stem mezenchimale, precum ACAN, BGLAP, COL2A1 si PPARG, cat si markeri transcriptomici specifici celulelor stem embrionare cum ar fi OCT4, REX1 sau SOX2. Interesant de notat este prezenta unor markeri specifici celulelor stem hematopoietice precum CD3D, CD4, CD8A sau MME si a unor markeri specifici celulelor stem neurale cum ar fi NCAM1, SIGMAR1 si S100B. Aceste rezultate ne conduc spre ipoteza prezentei unui numar limitat de markeri specifici tuturor liniilor celulare la nivelul celulelor stem. Acest fenomen ar putea fi corelat cu potentialul de diferentiere, ca raspuns la stimuli externi prin existenta unor molecule “primer” care conduc diferentierea in functie de stimulul aplicat.

Totodata, AFC-urile prezinta capacitatea de diferentierea catre linia endoteliala. Aceste se pot diferentia in celule cu imunofenotip specific celulelor endoteliale mature asa cum a fost demonstrat prin tehnica citometriei de flux, de prezenta markerilor endoteliali CD31, CD105 si CD144. Un element de noutate important il reprezinta analiza ultrastructurala a AFC-urilor diferentiate care a demonstrat prezenta structurilor intracelulare specifice celulelor endoteliale precum veziculele plasmalemale si corpusculii Weibel-Palade. Astfel, aceste celule nu au capacitatea doar de a fi ghidate catre o linie endoteliale, ci pot deveni chiar celule endoteliale mature cu structurile necesare unei posibile indepliniri a functiilor acestora, cum ar fi de exemplu veziculele plasmalemale care ar putea fi implicate in procesele de transcitoza.

Ca **perspective** de viitor dorim sa investigam capacitatea celulelor din lichidul amniotic de a repopula vase de sange lezate/decelularizate. In plus ne propunem sa utilizam celulele stem CD117 pozitive in co-cultura cu celule endoteliale progenitoare izolate din sangele din cordonul ombilical pentru a investiga efectul regenerativ al acestora fara utilizare factorilor de crestere si a diferentierii *in vitro*, pentru a sustine o posibila strategie terapeutica cu aplicabilitate clinica.