



Richiesta per borsa di studio da attivare ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021

La sottoscritta STEFANIA GONFLONI qualifica RICERCATORE CONFERMATO BIO/18 afferente al Dipartimento di BIOLOGIA Interno -4319 email stefania.gonfloni@uniroma2.it

CHIEDE

L'attivazione di una borsa di studio di dottorato ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021. A tal fine comunica quanto segue:

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo: BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE

Area per la quale si presenta la richiesta (selezionare solo una delle due):

Innovazione

Green

Tipologia di cofinanziamento (pari ad euro 8000 una tantum):

Nome dell'Ente finanziatore pubblico o privato: _____

Persona di Riferimento: _____ Telefono _____

Email _____

Fondi di ricerca dipartimentali

Progetto di Ricerca (massimo 10.000 battute complessive spazi inclusi) che comprenda

Descrizione del Progetto:

Sviluppo di modelli cellulari 3D su chip per studiare gli effetti indotti dalle terapie antitumorali nel tessuto ovarico

L'obiettivo principale del progetto riguarda lo studio dell'effetto delle terapie antitumorali sulla fertilità femminile. Le ovaie contengono un numero finito di follicoli primordiali che viene stabilito durante la vita fetale, prima della nascita. I follicoli primordiali presenti nella regione corticale delle ovaie rappresentano la "riserva ovarica". Tale riserva tende a diminuire con la maturazione sessuale fino ad esaurirsi completamente nella menopausa. Studi recenti hanno evidenziato che le terapie antitumorali possono indurre una degenerazione precoce del tessuto riproduttivo femminile causando una prematura insufficienza ovarica (*Premature Ovarian Insufficiency*, POI). Il grado di degenerazione del tessuto ovarico - e quindi della POI - dipende dal tipo di farmaco e dalla dose somministrata, ed è strettamente correlato all'età della paziente. Proteggere la riserva ovarica durante la chemioterapia sta diventando essenziale e un'urgenza sempre più sentita al fine di migliorare la qualità di vita delle giovani pazienti oncologiche. Il progetto ha come scopo principale quello di poter identificare ipotetici agenti farmacologici, da poter utilizzare nella pratica clinica, in grado di prevenire la perdita della riserva ovarica se somministrati durante il trattamento antitumorale. L'identificazione e lo sviluppo di questi agenti definiti "*ferto-adiuvanti*", adatti a pazienti di tutte le età, non richiederebbe l'utilizzo di procedure chirurgiche invasive e consentirebbe di evitare la miriade di effetti endocrini collaterali legati alla POI nelle giovani pazienti.



Obiettivi formativi:

Il nostro progetto mira a sostituire l'utilizzo di animali con una nuova metodologia, che si basa sullo sviluppo di modelli cellulari 3D (organoidi) a partire da cellule umane somatiche del tessuto ovarico. Il nostro studio si focalizza su una popolazione cellulare del tessuto ovarico costituita da Cellule del Cumulo Ooforo (COCs). Le cellule del COCs sono a stretto contatto con l'ovocita in via di accrescimento e maturazione. Le COCs sono molto importanti per permettere all'ovocita di divenire "competente", ovvero capace di sostenere i vari stadi di sviluppo dal più precoce (fecondazione) al più tardivo (impianto dell'embrione nell'utero). La competenza dell'ovocita e l'impianto dell'embrione nell'utero dipendono da molteplici fattori quali la grandezza e vitalità del follicolo maturo, la stimolazione ormonale e, non ultima, la comunicazione e lo scambio di molecole tra l'ovocita e le cellule del cumulo. Studi recenti hanno confermato che le COCs presentano dei prolungamenti citoplasmatici a stretto contatto con l'ovocita dove avviene il passaggio di ioni, metaboliti e aminoacidi. Si noti che le COCs sono cellule che vengono normalmente prelevate assieme all'ovocita durante gli interventi di fecondazione assistita, ma considerate "materiale di scarto" e non ulteriormente utilizzate. Noi ci proponiamo invece di dare un nuovo utilizzo a questo tipo di cellule, nella direzione dello sviluppo di organoidi per una terapia e medicina personalizzata.

Attività previste:

Nel nostro studio le COCs, prelevate e donate dalle pazienti oncologiche o da donne con problemi di fertilità, verranno utilizzate per la costruzione di colture cellulari 3D tramite l'utilizzo di supporti "hydrogel" che permettono di realizzare una crescita tridimensionale (tipo organoide). A differenza delle normali colture cellulari, gli organoidi 3D sono in grado di mimare la struttura morfologica e la complessità del microambiente, permettendo di seguire le alterazioni biomolecolari indotte dalle terapie antitumorali. Ciò ci permette di avvicinarci il più possibile alla situazione fisiologica reale presente nella paziente oncologica. Lo sviluppo di organoidi 3D a partire dalle COCs ci consentirà quindi di caratterizzare la morfologia, la cinetica di crescita, l'espressione genica ed il loro *secretoma* e le alterazioni biomolecolari indotte dalle terapie antitumorali. Oltre ad una crescita tridimensionale su hydrogel, il nostro obiettivo a lungo termine è di integrare nel laboratorio una nuova piattaforma tecnologica all'avanguardia definita "Organ-on-Chip", che ha la prerogativa di essere un sistema microfisiologico nel quale le COCs sono coltivate all'interno di dispositivi microfluidici. Tali dispositivi replicano le interfacce tissutali tridimensionali, i microambienti meccanicamente attivi, gli stimoli elettrici, le condizioni chimiche e fisiologiche dell'organo. La tecnologia Organ-on-chip è impiegata per sviluppare modelli *in vitro* e per predire in modo ottimale e con un costo contenuto, l'efficacia, la tossicità, la farmacocinetica del farmaco nell'organismo umano durante la sperimentazione preclinica. Nel nostro caso risulterebbe particolarmente vantaggiosa per testare sia la citotossicità dei vari chemioterapici e delle terapie a bersaglio molecolare utilizzati nella pratica clinica, che la capacità di ripristino della vitalità cellulare ad opera di molecole ferto-adiuvanti.

Attinenza del progetto all'area indicata:

(Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente) Area Tematica: Industria intelligente e sostenibile, energia e ambiente; Traiettoria di sviluppo: medicina rigenerativa, predittiva e personalizzata.

Il progetto prevede lo sviluppo di metodologie alternative *animal-free* (*organoidi*) e promuove l'applicazione di metodi di sostituzione (*replacement*) rilevanti per l'uomo nella ricerca biomedica (*organ-on-chip*). Noi, grazie alla nostra esperienza pregressa nel crescere in 3D le COCs in modo riproducibile, uniremo le



forze con la *Start-up* innovativa olandese BIOND Solutions B.V., che si avvale di esperti nella creazione e commercializzazione di chip per la crescita di tessuti. La CEO e fondatrice di BIOND Solutions B.V., la Dr. Cinzia Silvestri, è una ex allieva della Facoltà di Ingegneria Elettronica di Tor Vergata. Alla Dr. Silvestri è stata conferita, dalla facoltà stessa, un certificato di benemerita per aver portato lustro al corso di studi grazie ai risultati innovativi della *Start-up*. Inoltre, questo progetto in collaborazione tra l'ateneo di Tor Vergata e la *Start-up* olandese potrà creare sinergie e risultati utili per future collaborazioni e applicazioni a fondi di ricerca europei.

Risultati attesi:

La premessa di questo progetto è basata sulla nostra osservazione che nei topi il co-trattamento con inibitori farmacologici delle tirosin-chinasi (quali, l'oncogene Bcr-abl) ha un effetto protettivo sulla riserva ovarica danneggiata dalla chemioterapia. Ciò implica che tali inibitori, già presenti nella pratica clinica, possano agire come farmaci ferto-protettivi contrastando gli effetti avversi della chemioterapia sulla fertilità. Nostri dati recenti indicano che anche un inibitore allosterico contro Bcr-Abl (attualmente in Fase III della sperimentazione clinica) può preservare la fertilità nei topi trattati con ciclofosfamide. La sfida ora è chiarire se questo effetto protettivo si osserva anche su cellule umane COCs e quali siano i meccanismi molecolari alla base dell'effetto protettivo (osservato *in vivo* nei topi) nelle COCs. Ci proponiamo di ottenere sia una descrizione delle vie di segnale attivate dalle terapie antitumorali in colture cellulari 3D di COCs che di caratterizzare i meccanismi molecolari attraverso i quali gli inibitori allosterici possono proteggere la fertilità durante la somministrazione di terapie antitumorali. Miriamo a identificare dosaggi specifici di inibitori di piccole molecole necessarie per ottimizzare la protezione delle COCs. Ci proponiamo di confrontare diverse classi di inibitori al fine di estendere il pannello di composti che possono essere utilizzati per proteggere la riserva ovarica durante le terapie antitumorali. Questa conoscenza potrà essere utilizzata per sviluppare farmaci ferto-adiuvanti efficaci ed in grado di proteggere la riserva ovarica quando co-somministrati in concomitanza di radiazioni o chemioterapia. Nel lungo termine lo sviluppo di *Organ-on-chip*, attraverso dispositivi basati sulla microfluidica, permetterà di studiare i meccanismi molecolari alla base della degenerazione del tessuto riproduttivo indotta dalle terapie antitumorali.

Rilevanza: la nostra sfida è di tracciare una "*road map*" delle vie di segnalazione cellulare indotte dalle terapie antitumorali nelle COCs. Questo approccio mirerà a identificare potenziali bersagli per l'intervento farmacologico. Ciò fornirà un quadro per razionalizzare la suscettibilità differenziale delle COCs a vari trattamenti anticancro, aprendo la strada a un trattamento personalizzato più razionale per preservare la fertilità nelle pazienti oncologiche.

Strategia sperimentale: Il nostro primo obiettivo è sviluppare colture cellulari 3D di COCs, prelevate e donate da pazienti in collaborazione con la SODc di Procreazione Medicalmente assistita della AUO Careggi (Firenze) diretta dalla Prof.ssa Maria Elisabetta Coccia.

Task 1: Sviluppo di colture cellulari 3D; **Task2:** Analisi di «perturbazioni di sistema» con inibitori mediante tecnologia X-MAP su colture cellulari 3D di COCs; **Task 3:** Analisi dell'espressione di mRNA e di miRNA in COCs indotta dai trattamenti antitumorali; **Task4:** analisi DIGE 2-D e spettrometria di massa del *secretoma* ottenuto da colture cellulari 3D di COCS; **Task 5:** Sviluppo di *Organ-on-chip* a partire da COCs utilizzando dispositivi di microfluidica recentemente sviluppati da BIOND Solutions B.V.

Azienda pubblica o privata coinvolta nazionale o straniera in cui si prevede di far svolgere il periodo obbligatorio da 6 a 12 mesi previsto dal Decreto Ministeriale:



BIOND Solutions B.V. situata a Delft, uno spin-off della Delft University of Technology. I fondatori dell'azienda hanno iniziato a lavorare sulla tecnologia Organ-on-Chip durante i loro studi di dottorato nell'ambito del progetto ECSEL JU Informed. L'esperienza unica dell'azienda consiste nella progettazione e produzione di dispositivi microfluidici basati sulla combinazione unica di silicio e polimero per applicazioni Organ-on-Chip. BIOND annovera tra i suoi clienti due dei più prestigiosi ospedali accademici europei: il Leiden University Medical Center e l'Erasmus Medical Center di Rotterdam.

Firma