

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

**Studio della senescenza in cellule della frazione vascolo-stromale ottenute
da tessuto adiposo micro-frammentato**

Relatore

Prof.ssa Michela Bosetti

Candidata

Stefania Volpe

Correlatore

Dr.ssa Marica Imbimbo

A.A. 2025-2026

SESSIONE ESTIVA

*Ai miei nipoti Edoardo ed Emanuele, con
l'augurio che il vostro futuro sia sempre
guidato dalla curiosità, dalla passione e
dalla libertà di essere voi stessi*

Abbreviazioni

ADSC-E: cellule staminali derivate dal tessuto adiposo isolate mediante digestione enzimatica
ADSC-O: cellule staminali derivate dal tessuto adiposo isolate per migrazione spontanea (outgrowth)
AKT: chinasi proteica B
AMP: adenosina monofosfato
ATP: adenosina trifosfato
BCA: test all'acido bicinconinico
BNIP3: proteina 3 interagente con BCL2
BSA: albumina sierica bovina
BMI: indice di massa corporea
c-Myc: proto-oncogene cellulare Myc
CDK: chinasi ciclina-dipendente
CDK4/6: chinasi ciclina-dipendenti 4 e 6
CDC25: fosfatasi del ciclo cellulare 25
CHK1: chinasi del checkpoint 1
CHK2: chinasi del checkpoint 2
cGAS-STING: sintasi di cGAMP – stimolatore dei geni dell'interferone
COVID-19: malattia da coronavirus 2019
CoQ10: coenzima Q10
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindolo
DNA: acido desossiribonucleico
DMEM F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium F12
DDR: risposta al danno del DNA
ECL: chemiluminescenza potenziata
ESC: cellula staminale embrionale
FBS: siero fetale bovino
GAPDH: gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi
GSH: glutatione ridotto
GLB1: beta-galattosidasi 1
HBSS: soluzione salina bilanciata di Hanks
hADMSC: cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo umano
hADSCs: cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo umano
hESC: cellule staminali embrionali umane
HEPES: acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinetansolfonico
H₂O₂: acqua ossigenata
IL: interleuchina
iPSC: cellula staminale pluripotente indotta
KLF4: fattore 4 tipo Krüppel
LC3B: catena leggera 3B della proteina associata ai microtubuli
MAPK: chinasi attivata da mitogeni
MRC5: linea cellulare MRC-5
mRNA: RNA messaggero

mTOR: bersaglio meccanicistico della rapamicina
MW: piastra da coltura
NAD: nicotinammide adenina dinucleotide
NADH: nicotinammide adenina dinucleotide ridotto
NANOG: fattore di trascrizione NANOG
NLRP3: proteina 3 della famiglia NLR con dominio pirina
OCT4: fattore di trascrizione legante l'ottamero 4
P16INK4 / P21CIP1/WAF1: inibitori del ciclo cellulare
p53/p21: inibitori del ciclo cellulare
p: passaggio in coltura cellulare
PBS: soluzione salina tamponata con fosfati
PFA: paraformaldeide
PI3K: fosfatidilinositolo 3-chinasi
Rb: proteina del retinoblastoma
RIPA: tampone per radioimmunoprecipitazione
ROS: specie reattive dell'ossigeno
SA- β -gal: galattosidasi associata alla senescenza
SASP: fenotipo secretorio associato alla senescenza
SDS: dodecilsolfato di sodio
SEM: errore standard della media
SIRT1: sirtuina 1
SOX2: fattore di trascrizione SOX 2
SSEA3: antigene embrionale specifico di stadio 3
SSEA-4: antigene embrionale specifico di stadio 4
SVF: frazione vascolo-stromale
TBST: soluzione salina tamponata con Tris e Tween 20
TBS: soluzione salina tamponata con Tris
TLR9: recettore Toll-like 9
TGF- β : fattore di crescita trasformante beta
TRA-1-60: antigene tumorale correlato 1-60
TRA-1-81: antigene tumorale correlato 1-81
WB: western blot
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galattopiranoside

Indice

1 Introduzione	1
1.1 Cellule staminali: concetti generali	2
1.2 Cellule staminali da tessuto adiposo	5
1.3 Senescenza cellulare	9
2 Scopo del lavoro	22
3 Materiali e metodi	24
3.1 Preparazione del lipoaspirato e processo di microframmentazione tramite tecnologia Lipogems®	24
3.2 Processamento del campione al momento dell'arrivo in laboratorio	25
3.3 Isolamento di ADSC-E da MFAT	27
3.4 Isolamento di ADSC O da MFAT	28
3.5 Saggio di lisi delle ADSC O e delle ADSC E	29
3.6 Lisi del MFAT	30
3.7 Quantificazione delle proteine tramite metodo BCA	31
3.8 Analisi proteica tramite western blot	32
3.9 Inclusione in paraffina	34
3.10 Saggio della β -galattosidasi associata alla senescenza (SA- β -gal)	34
4 Risultati e discussioni	38
5 Conclusioni	53
6 Bibliografia	55
Ringraziamenti	62

1 INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni, lo studio delle cellule staminali ha suscitato un interesse crescente nella comunità scientifica, in virtù delle loro capacità di autorinnovamento differenziazione e produzione di fattori antinfiammatori e rigenerativi (1). La letteratura scientifica evidenzia una crescita esponenziale delle potenziali applicazioni in ambito biomedico e il settore di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi ne è un esempio; si tratta di un laboratorio che da anni studia la rigenerazione tissutale, che rappresenta un ambito di ricerca di grande rilevanza scientifica e clinica, orientato allo sviluppo di strategie in grado di riparare o sostituire tessuti danneggiati. Tra gli approcci più promettenti figura la terapia cellulare, basata sull'isolamento e sull'espansione *in vitro* di cellule primarie provenienti da tessuti adulti, successivamente reintrodotte nei siti lesionati al fine di ripristinare le proprietà funzionali e strutturali. Un'evoluzione significativa di questo approccio è rappresentata proprio dall'impiego delle cellule staminali, caratterizzate da un'elevata capacità proliferativa e dalla possibilità di differenziarsi *in vitro* prima del reimpianto.

In tale contesto, il tessuto adiposo si configura come una fonte particolarmente vantaggiosa per l'isolamento di cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSCs), grazie alla sua abbondanza, alla semplicità del prelievo mediante tecniche minimamente invasive e all'elevata resa in ADSCs (Adipose-Derived Stem Cells). Le cellule staminali mesenchimali trovano quindi oggi numerose applicazioni in ambito biomedico e rigenerativo, grazie alla loro capacità di differenziarsi in diversi tipi cellulari e di contribuire ai processi di riparazione tissutale (2).

Nello stesso tempo però sono da tenere in considerazione i limiti delle eventuali terapie che vedono l'utilizzo di cellule staminali, limiti che sono quindi oggetto di studi più approfonditi. Uno di questi è rappresentato dalla senescenza cellulare, fenomeno che tende a manifestarsi durante la fase di espansione cellulare *in vitro* necessaria alla finalità applicativa. La senescenza comporta una progressiva perdita della capacità proliferativa e funzionale delle cellule, compromettendone l'efficacia terapeutica (3).

In questo capitolo introduttivo dell'elaborato verranno approfonditi i principali aspetti biologici relativi alle cellule staminali e alla senescenza cellulare, fornendo le basi teoriche utili a interpretare l'impatto di tali fenomeni sull'efficacia delle ADSCs e, di

conseguenza, sui possibili successi o insuccessi delle loro applicazioni in medicina rigenerativa.

1.1 Cellule staminali: concetti generali

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate caratterizzate da un'elevata capacità di autorinnovamento, da un'ampia capacità proliferativa e dal potenziale di differenziarsi in molteplici linee cellulari. La loro capacità di autorinnovarsi, unita al vasto potenziale differenziativo, rende le cellule staminali indispensabili per lo sviluppo embrionale, il mantenimento dei tessuti e i processi rigenerativi. Le cellule staminali possono essere isolate da fonti embrionali, fetali e adulte. Tra le principali sorgenti figurano il midollo osseo, il tessuto adiposo, la polpa dentale, il sangue periferico con caratteristiche biologiche e potenzialità differenziative specifiche (4).

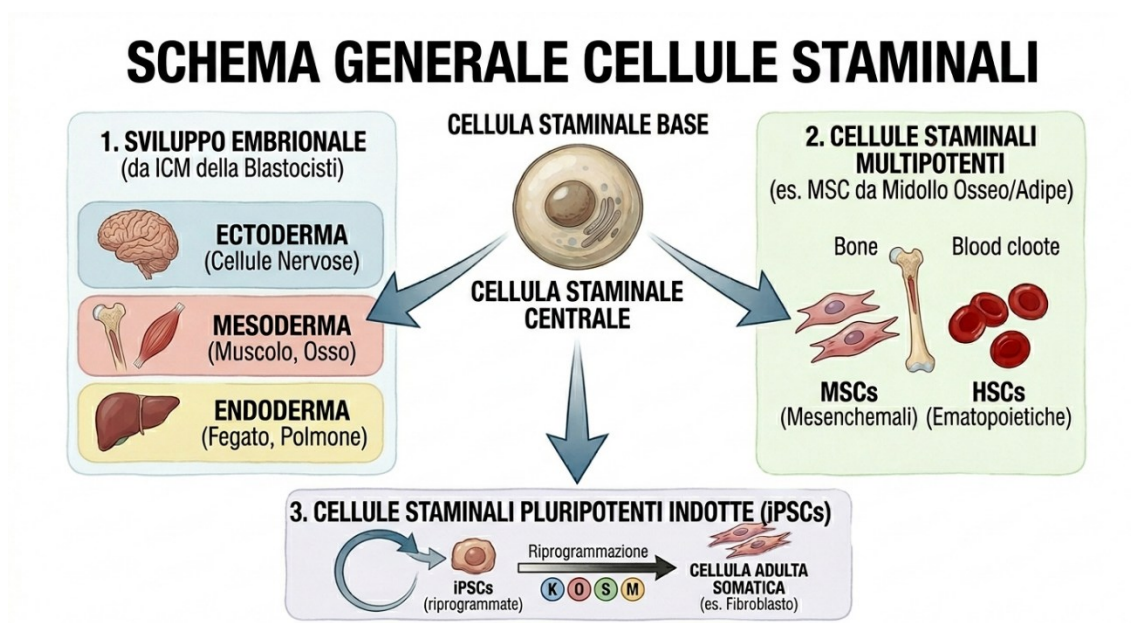


Figura 1: Schema generale sulle cellule staminali (Elaborazione grafica assistita da intelligenza artificiale Google Gemini, 2026).

Le **cellule staminali embrionali** (Embryonal Staminal Cells, **ESC**) (**Figura 1**) derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti, uno stadio precoce dello sviluppo embrionale, e vengono generalmente ottenute da embrioni sovranumerari prodotti nell'ambito di procedure di fecondazione *in vitro*. Esse sono cellule indifferenziate in

grado di mantenere una capacità proliferativa illimitata *in vitro*, mantenendo al contempo la capacità di differenziarsi in diversi tipi cellulari somatici specializzati (5).

Le ESC sono considerate pluripotenti, in quanto possono differenziarsi in cellule derivanti dai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma), dai quali originano la maggior parte dei tessuti dell'organismo adulto, pur non essendo in grado di formare i tessuti extraembrionali, come la placenta. A differenza delle ESC, le MSC sono multipotenti e presentano una capacità differenziativa più ristretta, limitata principalmente a derivati di origine mesodermica (6).

Il mantenimento dello stato di pluripotenza nelle cellule staminali embrionali è regolato da una complessa rete di fattori di trascrizione, tra cui OCT4, SOX2 e NANOG, che svolgono un ruolo fondamentale nel controllo dell'auto-rinnovamento e nella conservazione del fenotipo indifferenziato. Parallelamente, le hESC presentano l'espressione di specifici marcatori di superficie, quali SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81, comunemente impiegati per la loro identificazione e caratterizzazione in coltura (7).

Le cellule staminali embrionali umane (*human ESC*, *hESC*) sono utilizzate principalmente come modello sperimentale per lo studio dello sviluppo e del differenziamento cellulare, per la modellizzazione di patologie e per lo screening farmacologico, oltre che come potenziale fonte di cellule per applicazioni di medicina rigenerativa e ingegneria tissutale. Tuttavia, la loro derivazione presenta alcune limitazioni pratiche ed etiche, legate principalmente alla disponibilità ridotta di embrioni donati per scopi di ricerca. Di conseguenza, le possibilità di sperimentazione risultano spesso contenute (5).

Le **cellule staminali pluripotenti indotte** (Induced Pluripotent Stem Cells, **iPSC**) (**Figura1**) sono cellule somatiche adulte che, attraverso la riprogrammazione mediante specifici fattori molecolari, vengono riportate a uno stato di pluripotenza simile a quello delle cellule staminali embrionali, acquisendo così la capacità di differenziarsi in molteplici linee cellulari (8). Sono state sviluppate con l'obiettivo di superare i limiti etici associati all'uso delle cellule staminali embrionali e di attenuare le proprietà immunologiche legate al trapianto.

Sebbene le iPSC condividano con le cellule staminali embrionali la capacità di autorinnovamento, la pluripotenza e l'espressione di numerosi marcatori molecolari caratteristici, alcuni studi hanno evidenziato differenze a livello genetico ed epigenetico. In particolare, le iPSC possono conservare una parziale memoria epigenetica della cellula somatica di origine e presentare alterazioni genomiche associate al processo di riprogrammazione, che possono influenzarne il comportamento biologico e il potenziale differenziativo (9). Altri limiti nell'utilizzo clinico sono il rischio di formazione di teratomi, l'immunogenicità con possibile rigetto nei trapianti. Inoltre, è stata evidenziata la scarsa riproducibilità tra laboratori, l'instabilità cromosomica, la frequente immaturità delle cellule ottenute e la necessità di ampliare le linee cellulari disponibili per patologie differenti (10).

Le prime iPSC sono state generate tramite retrovirus, ma con un'attivazione incompleta dei geni della pluripotenza. Successivamente sono stati sviluppati metodi non virali basati su plasmidi contenenti i fattori di Yamanaka (11) (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc), con l'obiettivo di aumentarne la sicurezza per l'uso clinico. Tuttavia, questi approcci presentano ancora problemi di integrazione nel genoma e bassa efficienza di riprogrammazione.

Tra le **popolazioni staminali presenti nell'organismo adulto**, le cellule stromali mesenchimali (**MSC**) (**Figura 1**) si distinguono per la loro natura eterogenea e per la capacità di dar origine a differenti linee cellulari mesodermiche, svolgendo un ruolo chiave nei processi di rigenerazione di tessuti quali osso, cartilagine, connettivo denso e lasso, tessuto adiposo e muscolo.

Grazie a tali proprietà, negli ultimi anni le MSC sono state ampiamente investigate in ambito clinico, determinando una crescita esponenziale dei trial clinici che ne valutano l'impiego terapeutico in differenti patologie, sia di natura infiammatoria che degenerativa (12). Possono essere facilmente isolate a partire da piccoli campioni tissutali e successivamente espanse *in vitro*, dando origine a popolazioni stromali eterogenee, contenenti una quota variabile di cellule multipotenti di particolare rilievo per le applicazioni in ambito rigenerativo. Grazie alle proprietà immunomodulatori possono, inoltre, influenzare la risposta infiammatoria esercitando effetti sia immunosoppressivi, sia immunostimolatori, che consente alle MSC di favorire la

risoluzione dell'infiammazione o, in specifici contesti, il potenziamento della risposta immunitaria (13).

Tra le diverse fonti tessutali da cui è possibile isolare cellule stromali mesenchimali, il midollo osseo è da sempre considerato il riferimento principale. Negli ultimi anni, però, l'attenzione si è progressivamente spostata anche verso altre sorgenti cellulari, in particolare il tessuto adiposo, che risulta interessante per la sua elevata disponibilità e per la relativa facilità di prelievo (14).

1.2 Cellule staminali da tessuto adiposo

Le cellule staminali derivate dal tessuto adiposo (Adipose-Derived Stem Cells, ADSCs) sono un tipo di MSCs facilmente isolabili con minima invasività del prelievo, elevata disponibilità cellulare e spiccate proprietà rigenerative, antinfiammatorie e immunomodulanti (14). Inoltre, numerosi studi clinici hanno evidenziato il loro potenziale terapeutico in diversi ambiti medici, tra cui l'ortopedia, dove favoriscono la riparazione della cartilagine articolare; la chirurgia vascolare, nella quale promuovono l'angiogenesi e la rigenerazione dei tessuti ischemici; la diabetologia, dove supportano la guarigione delle ulcere croniche e la riparazione tissutale; la reumatologia, dove esercitano effetti immunomodulanti e antinfiammatori che possono contribuire a limitare il danno articolare e migliorare la sintomatologia clinica (15)

Il tessuto adiposo sottocutaneo rappresenta la fonte più rilevante di ADSCs, che possono essere prelevate da diverse sedi corporee come addome, fianchi, regione femorale e regione deltoidea.

Attualmente, il metodo più utilizzato per l'isolamento delle ADSCs si basa sulla digestione enzimatica del tessuto adiposo mediante collagenasi, che consente il rilascio delle cellule della frazione vascolare stromale (*stromal vascular fraction*, SVF). Successivamente, le cellule vengono coltivate in monostrato bidimensionale per ottenere una popolazione arricchita di ADSCs. Tuttavia, questa procedura presenta alcune limitazioni, tra cui possibile danno cellulare indotto dall'enzima, variabilità tra campioni e resa cellulare non sempre ottimale (16).

Un secondo metodo di isolamento delle ADSC è di tipo meccanico e prevede la microframmentazione del tessuto che, dopo essere lavato da detriti e impurità, viene messo in coltura per permettere la migrazione delle cellule dal suo interno “*outgrowth*”, e la loro adesione alla superficie della piastra di coltura, o al substrato 3D eventuale, permettendone così l'isolamento e la eventuale espansione (17).

Le proprietà terapeutiche delle ADSC, negli anni, sono state principalmente ricondotte alla loro attività paracrina. Esse, infatti, secernono numerose molecole bioattive che favoriscono la rigenerazione tissutale attraverso la promozione dell'angiogenesi, la riduzione dell'apoptosi e la modulazione del sistema immunitario.

In particolare, l'effetto immunomodulatorio rappresenta uno dei principali vantaggi delle ADSC in medicina rigenerativa. Esse modulano la risposta immunitaria, sia innata che adattativa, attraverso meccanismi paracrini e contatti cellula-cellula, influenzando l'attività di linfociti T, cellule dendritiche e macrofagi. Tale azione contribuisce alla riduzione dello stato infiammatorio e al mantenimento dell'omeostasi immunitaria. Inoltre, le ADSC favoriscono un microambiente anti-infiammatorio mediante la secrezione di citochine come IL-10 e TGF- β e promuovono l'espansione delle cellule T regolatorie, contribuendo alla soppressione delle risposte immunitarie eccessive (18).

Parallelamente, le ADSC esercitano un significativo effetto pro-angiogenico, stimolando la formazione di nuovi vasi sanguigni, proteggendo i tessuti danneggiati e contribuendo alla regolazione della risposta infiammatoria, con un impatto complessivo positivo sui processi di rigenerazione e riparazione tissutale (19).

Inoltre, le ADSC esercitano, con meccanismi paracrini, un importante effetto anti-apoptotico nei tessuti danneggiati, particolarmente utile in condizioni di stress ischemico e infiammatorio, favorendo il mantenimento dell'integrità tissutale e potenziando l'efficacia complessiva dei processi rigenerativi (19).

Un ulteriore vantaggio rilevante è rappresentato dalla secrezione di vescicole extracellulari, in particolare esosomi e microvescicole, che costituiscono un importante sistema di comunicazione intercellulare. Tali vescicole trasportano proteine, lipidi e acidi nucleici (mRNA e microRNA) in grado di modulare le cellule bersaglio, favorendo processi di proliferazione, migrazione cellulare, angiogenesi e immunomodulazione.

Questo meccanismo cell-free rappresenta un ulteriore potenziale dell'attività rigenerativa delle ADSC (20).

Tra le applicazioni principali delle ADSCs (**Figura 2**) vi sono: la chirurgia ricostruttiva ed estetica, in cui migliorano la sopravvivenza del grasso trapiantato, aumentando la vascolarizzazione e riducendo il riassorbimento (21); nella guarigione delle ferite accelerando la riparazione di lesioni acute e croniche grazie alla riduzione dell'infiammazione e alla promozione della rigenerazione cutanea (22); in ortopedia e medicina rigenerativa, vengono utilizzate per la rigenerazione di osso, cartilagine, tendini e muscolo scheletrico, spesso in combinazione con biomateriali e fattori di crescita, migliorando la qualità del tessuto riparato (23); in cardiologia, le ADSCs favoriscono la riparazione del miocardio dopo infarto attraverso la secrezione di fattori paracrini che promuovono l'angiogenesi, modulano la risposta infiammatoria e riducono il rimodellamento fibrotico del ventricolo, contribuendo al recupero funzionale del tessuto cardiaco ischemico (24); in neurologia supportano la rigenerazione dei nervi periferici attraverso effetti neurotrofici, angiogenici e immunomodulatori che favoriscono la crescita assonale e la riparazione del tessuto nervoso (25). Studi preclinici suggeriscono inoltre un potenziale impiego nel trattamento delle lesioni del midollo spinale (26). Infine, sono state studiate in condizioni infiammatorie sistemiche come la COVID-19, dove possono ridurre la risposta infiammatoria e migliorare la riparazione polmonare (27).

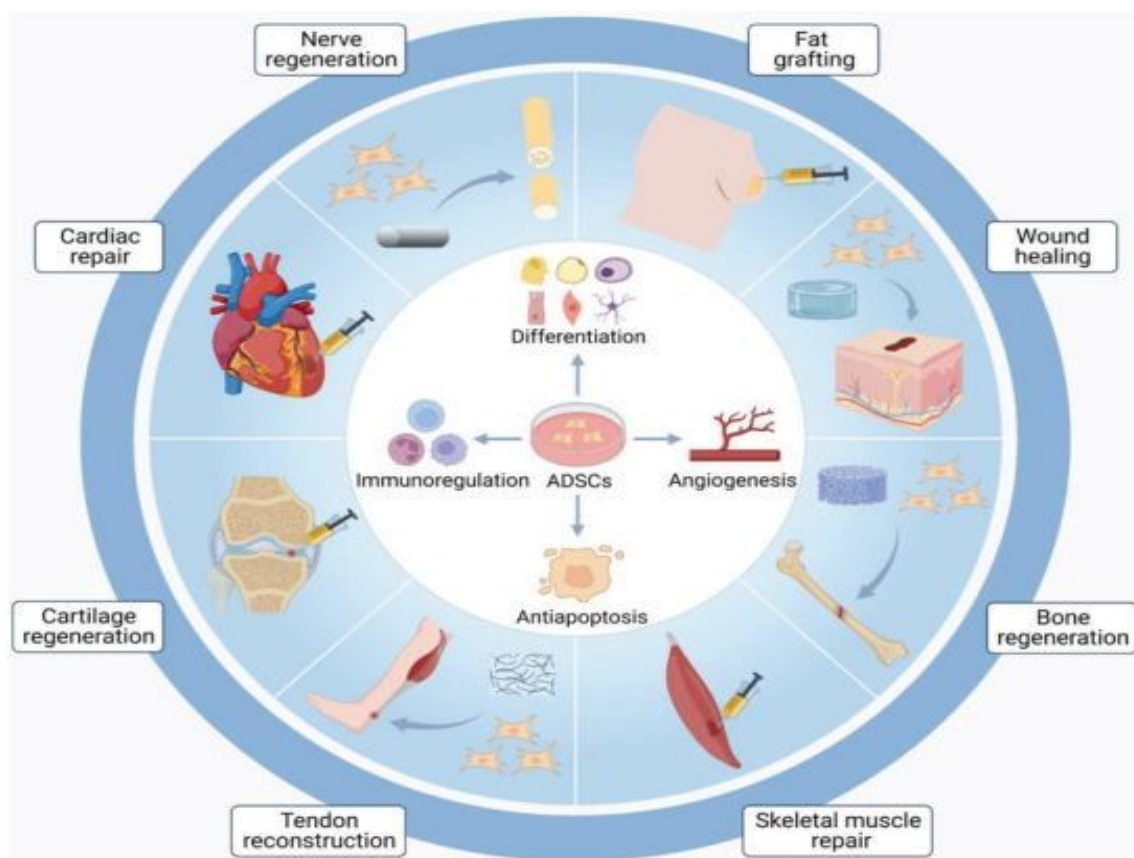


Figura 2: Rappresentazione schematica delle applicazioni delle ADSC (23).

Nonostante le MSC rappresentino una delle fonti cellulari più promettenti in medicina rigenerativa, il loro impiego presenta alcune limitazioni legate principalmente alle procedure di isolamento, alla marcata eterogeneità della popolazione cellulare e alla ridotta sopravvivenza e integrazione funzionale delle cellule dopo il trapianto (28).

Durante il processo di isolamento le cellule vengono separate dal loro microambiente fisiologico e dalla matrice extracellulare mediante l'impiego di enzimi proteolitici che consentono la digestione del tessuto adiposo e il rilascio delle ADSC. In particolare, la digestione enzimatica del tessuto adiposo tramite collagenasi e tripsina rappresenta il passaggio iniziale fondamentale per l'ottenimento delle cellule a partire dalla SVF. Tuttavia, la successiva espansione *in vitro*, necessaria per raggiungere un numero cellulare adeguato alle applicazioni cliniche, è associata a un progressivo accumulo di stress cellulare e di marcatori di senescenza, con conseguente riduzione del potenziale proliferativo e differenziativo delle ADSC (29).

Un ulteriore limite è l'eterogeneità delle ADSC, che includono sottopopolazioni con differenti capacità proliferative, differenziative e secretorie. Tali caratteristiche risultano influenzate da vari fattori, dal donatore, il sito anatomico di prelievo del tessuto adiposo e le condizioni di coltura *in vitro* (30).

Altro limite è la sopravvivenza cellulare dopo il trapianto, in quanto le ADSC possono andare incontro ad apoptosi già nei giorni successivi alla somministrazione, riducendo la durata e l'efficacia dell'effetto terapeutico. Da non trascurare è la variabilità biologica legata al donatore, come età e predisposizione genetica, che influenzano la capacità proliferativa, differenziativa e secretoria delle ADSC. In genere le cellule provenienti da soggetti più giovani mostrano prestazioni migliori rispetto a quelle di individui anziani (31).

Infine, tra i limiti della terapia, riveste particolare importanza la senescenza cellulare, che sarà oggetto di approfondimento nel capitolo successivo.

1.3 Senescenza cellulare

La senescenza cellulare è un processo biologico attraverso il quale le cellule perdono in modo permanente la capacità di proliferare, entrando in uno stato di arresto irreversibile del ciclo cellulare. Tale fenomeno può essere determinato dall'invecchiamento fisiologico oppure dall'azione di diversi fattori, tra cui danni al DNA, stress ossidativo, accorciamento dei telomeri e alterazioni della funzionalità mitocondriale. Nonostante l'arresto proliferativo, le cellule senescenti rimangono metabolicamente attive e acquisiscono caratteristiche peculiari, come modificazioni morfologiche e la secrezione di citochine pro-infiammatorie ed enzimi degradativi, insieme definiti fenotipo secretorio associato alla senescenza (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*, SASP), caratterizzato da un'aumentata produzione di citochine pro-infiammatorie, chemochine, fattori di crescita ed enzimi proteolitici coinvolti nella degradazione della matrice extracellulare.

La senescenza cellulare svolge un ruolo importante nei processi di invecchiamento e nello sviluppo di numerose patologie croniche, influenzando negativamente anche le capacità rigenerative delle cellule staminali (32).

La senescenza cellulare rappresenta un processo multifattoriale che può essere innescato da diversi stressori, sia endogeni che esogeni, i quali determinano l'attivazione di una rete integrata di vie di segnalazione intracellulari responsabili dell'instaurarsi di un arresto stabile del ciclo cellulare. A livello molecolare, tale stato è accompagnato da modificazioni significative dei pathway di segnalazione, del metabolismo e dell'organizzazione del citoscheletro, con conseguente perdita dell'omeostasi cellulare (33). In questo contesto si osserva una compromissione dei meccanismi di risposta al danno al DNA e agli stimoli di stress, che si traduce in una ridotta capacità di mantenimento della stabilità genomica e di riparazione del materiale genetico.

Un ulteriore aspetto rilevante è la diminuzione del potenziale proliferativo e di auto-rinnovamento, che interessa tutte le MSCs ma risulta più pronunciata nelle cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo umano (hADSCs), con ripercussioni sulle loro funzioni biologiche e applicazioni terapeutiche (29). Inoltre il fenotipo secretorio amplifica la risposta infiammatoria locale e contribuisce al rimodellamento e alla progressiva degradazione della matrice extracellulare, ma può anche propagare segnali paracrini pro senescenza favorendo l'induzione di senescenza in cellule adiacenti e contribuendo così al mantenimento e all'amplificazione del danno tissutale. Nel contesto della medicina rigenerativa, tali effetti possono compromettere il microambiente necessario al mantenimento della funzionalità delle cellule staminali e alla corretta riparazione dei tessuti (34).

La **senescenza cellulare può essere indotta da diversi fattori** quali l'accorciamento dei telomeri associato alla replicazione cellulare, lo stress ossidativo e l'attivazione aberrante di oncogeni. Questi stimoli determinano l'attivazione di meccanismi cellulari di risposta al danno, tra cui la risposta al danno del DNA (DDR) e le alterazioni della funzione mitocondriale, che contribuiscono all'instaurarsi del fenotipo senescente e dell'arresto permanente del ciclo cellulare. (**Figura 3**).

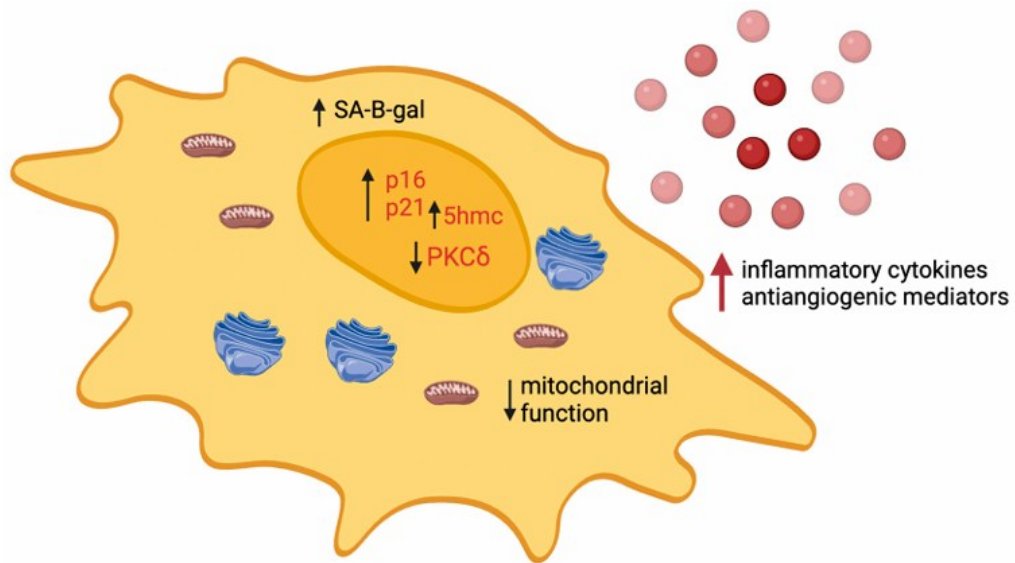


Figura 3: Schema delle principali alterazioni associate alla senescenza delle ADSC (32).

In presenza di lesioni genomiche, come rotture a singolo o doppio filamento, viene attivata la DNA *damage response* (DDR), mediata principalmente dalle chinasi ATM e ATR. Questo processo induce la fosforilazione di H2AX (γ H2AX) e l'attivazione delle cascate di segnalazione a valle, tra cui le chinasi CHK1 e CHK2, che regolano i principali *checkpoint* del ciclo cellulare attraverso l'asse p53/p21 e le fosfatasi CDC25. Il risultato finale è un arresto stabile della proliferazione cellulare. La persistenza del danno non risolto contribuisce al mantenimento del fenotipo senescente e rappresenta un meccanismo comune sia alla senescenza replicativa, associata all'accorciamento telomerico, sia alla senescenza indotta da stress replicativo o oncogenico (35).

I telomeri sono le regioni terminali dei cromosomi costituite da sequenze ripetute di DNA (TTAGGG nell'uomo) associate a proteine specifiche che ne garantiscono la stabilità e proteggono le estremità cromosomiche da degradazione e fusione. A causa dei limiti intrinseci della replicazione del DNA, i **telomeri si accorciano** progressivamente a ogni divisione cellulare. In questo contesto, la senescenza replicativa, descritta da Hayflick e Moorhead (36) come il limite finito di proliferazione dei fibroblasti in coltura (fenomeno di Hayflick), rappresenta uno stato di arresto irreversibile del ciclo cellulare. Uno dei principali determinanti di questo processo è proprio l'accorciamento telomerico, associato all'attivazione di una risposta al danno

al DNA (DDR) quando viene raggiunta una lunghezza critica. Nelle MSCs, tale soglia è stimata tra circa 5,8 e 10,5 kb, al di sotto della quale le estremità cromosomiche vengono riconosciute come lesioni genomiche, innescando il programma senescente. Durante l'invecchiamento, la lunghezza dei telomeri diminuisce inoltre in modo progressivo, con una riduzione media di circa 17 bp all'anno (36).

Il mantenimento della lunghezza telomerica è affidato principalmente alla telomerasi, una trascrittasi inversa che contrasta l'accorciamento aggiungendo sequenze ripetute alle estremità cromosomiche. In questo sistema è coinvolta anche SIRT1, una deacetilasi NAD⁺-dipendente associata alla risposta allo stress e alla regolazione dell'invecchiamento cellulare. Nelle MSCs, una ridotta attività di SIRT1 è stata correlata a una minore funzionalità telomerasica e a una più rapida acquisizione del fenotipo senescente, mentre la sua sovraespressione sembra in grado di attenuare parzialmente tali alterazioni, suggerendo un ruolo nel controllo della stabilità telomerica e della capacità proliferativa cellulare (37).

Le **disfunzioni mitocondriali** rappresentano un importante fattore della senescenza cellulare, contribuendo all'alterazione dell'omeostasi energetica e metabolica. Nelle cellule senescenti si osserva (**Figura 4**) un aumento della biogenesi mitocondriale associato a una riduzione della mitofagia, con conseguente accumulo di organelli disfunzionali e perdita del controllo qualitativo della rete mitocondriale. Parallelamente, si verifica una ridotta dinamica di fissione e fusione, con prevalenza di uno stato di iperfusione che compromette il corretto rinnovamento mitocondriale (38).

A livello funzionale, tali alterazioni determinano un'inefficienza della catena respiratoria e una riduzione della produzione di ATP, associata a uno squilibrio del rapporto AMP/ATP. Questo si accompagna a un aumento dei ROS, che collegano la disfunzione mitocondriale all'attivazione della senescenza, inducendo danni al DNA e sostenendo la risposta al danno al DNA (DDR) e l'arresto stabile del ciclo cellulare (38).

Ulteriori cambiamenti includono alterazioni del rapporto NAD⁺/NADH e del metabolismo lipidico. Inoltre, il rilascio di componenti mitocondriali, come il DNA mitocondriale (mtDNA), può attivare vie dell'immunità innata (TLR9, NLRP3, cGAS-STING), contribuendo al fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP) (39).

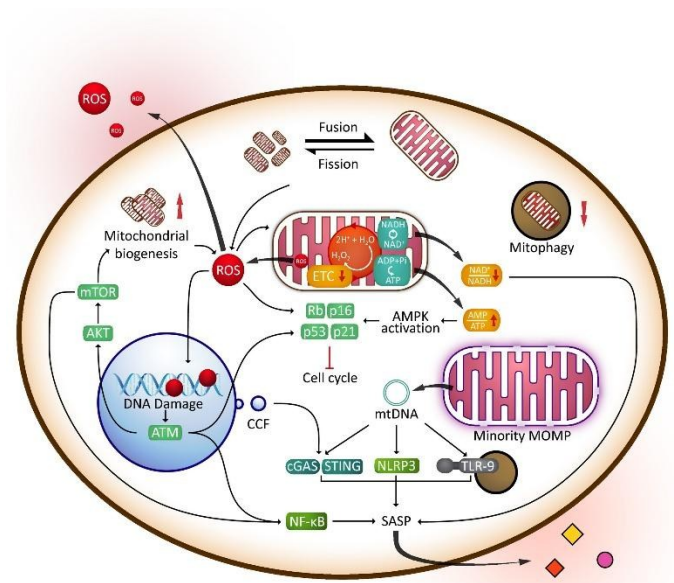


Figura 4: Schema della disfunzione mitocondriale nella senescenza delle MSC (38).

Le alterazioni strutturali e funzionali della senescenza includono cambiamenti morfologici, nucleari, metabolici e dei sistemi di degradazione, che nel loro insieme contribuiscono alla stabilizzazione del fenotipo senescente.

A livello della membrana cellulare si osservano cambiamenti nella composizione dei lipidi e nella fluidità, con effetti sulla comunicazione intercellulare e sul riconoscimento da parte del sistema immunitario. Anche il citoscheletro subisce alterazioni importanti con cambiamenti nell'organizzazione di actina e microtubuli. Si osservano quindi una perdita della morfologia cellulare, aumento di dimensioni e ridotta capacità di movimento (40).

Un ruolo centrale è svolto dai mitocondri, che nelle cellule senescenti aumentano di numero ma funzionano in modo meno efficiente, con riduzione del potenziale di membrana e maggiore produzione di specie reattive dell'ossigeno. Inoltre, cambia anche il loro modo di organizzarsi, con una maggiore fusione tra mitocondri e una riduzione della loro eliminazione, favorendo l'accumulo di organelli danneggiati e alterazioni del metabolismo (41).

Anche il sistema dei lisosomi e l'autofagia risultano compromessi, con una minore capacità di degradare e riciclare componenti cellulari danneggiati. A livello del nucleo si osservano aumento delle dimensioni, perdita di organizzazione della lamina nucleare, riduzione di Lamin B1 e cambiamenti nella struttura della cromatina, che influenzano l'attività dei geni. Infine, anche il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi mostrano alterazioni che contribuiscono a un accumulo di proteine difettose e a un traffico cellulare meno efficiente (42).

Nel complesso, queste modificazioni non rappresentano solo una conseguenza della senescenza, ma contribuiscono attivamente al suo mantenimento e alla sua amplificazione nel tessuto. In particolare, attraverso la secrezione di fattori associati a SASP, le cellule senescenti possono influenzare le cellule circostanti, inducendo in esse processi di stress e favorendo l'acquisizione del fenotipo senescente anche in cellule inizialmente non senescenti. Questo meccanismo di propagazione paracrina contribuisce alla diffusione della senescenza e all'alterazione progressiva del microambiente tissutale (40).

L'aumento dei ROS nelle cellule senescenti non rappresenta soltanto una conseguenza del danno ossidativo, ma anche un importante meccanismo di segnalazione intracellulare (36). In particolare, l'eccesso di specie reattive dell'ossigeno può attivare vie di risposta allo stress come p38/MAPK, che contribuisce all'induzione e al mantenimento dell'arresto del ciclo cellulare e del SASP (43). Parallelamente, ROS e segnali di stress metabolico possono modulare la via PI3K/AKT/mTOR, coinvolta nei processi di sopravvivenza cellulare e nella regolazione del metabolismo, contribuendo così alla stabilizzazione del fenotipo senescente (44).

Marker molecolari e funzionali della senescenza

I marcatori della senescenza cellulare comprendono un insieme di indicatori morfologici, biochimici e molecolari utilizzati per riconoscere e caratterizzare le cellule senescenti nei diversi contesti biologici. Mancano marker specifici ed "univoci", per cui la valutazione dello stato senescente non è semplice ed è quindi necessario condurre saggi complementari in grado di fornire un quadro ampio dello stato cellulare, mediante l'utilizzo combinato di saggi morfologici, biochimici e molecolari.

Tra i principali parametri rappresentativi dello stato senescente vi è l'aumentata attività della β -galattosidasi associata alla senescenza (SA- β -gal), considerata uno dei marker più utilizzati per l'identificazione delle cellule senescenti sia *in vitro* che nei tessuti. Si tratta di un'attività enzimatica lisosomiale riconducibile alla β -galattosidasi codificata dal gene GLB1, fisiologicamente espressa in tutte le cellule e localizzata nei lisosomi, dove partecipa ai processi di degradazione dei glicoconjugati e del turnover macromolecolare (45).

Nelle cellule senescenti, tuttavia, l'attività SA- β -gal risulta marcatamente aumentata e diventa rilevabile a pH subottimale (circa pH 6.0), condizione in cui le cellule proliferanti presentano generalmente un'attività trascurabile. Questo fenomeno non è legato a una specifica sovraespressione dell'enzima, ma piuttosto a cambiamenti strutturali e funzionali tipici della senescenza, in particolare all'espansione del compartimento lisosomiale e all'aumento della massa lisosomiale complessiva. Tali alterazioni riflettono il rimodellamento metabolico e organellare che caratterizza lo stato senescente (45).

È importante sottolineare che la SA- β -gal non è un marcatore esclusivo delle cellule senescenti. Come evidenziato in letteratura (46), la sua positività può essere osservata anche in cellule non senescenti in condizioni di elevata densità cellulare, stress metabolico o attivazione lisosomiale, rappresentando quindi un indicatore utile ma non sufficientemente specifico se utilizzato isolatamente. Per questo motivo, la valutazione della senescenza richiede sempre un approccio combinatorio basato su più marcatori.

Dal punto di vista sperimentale, la rilevazione dell'attività SA- β -gal viene effettuata principalmente tramite saggi istochimici su cellule fissate, utilizzando il substrato cromogenico X-gal, che viene idrolizzato dall'enzima con conseguente formazione di un precipitato insolubile blu visibile al microscopio ottico. Questo metodo consente una valutazione qualitativa e semi-quantitativa della popolazione cellulare senescente. In alternativa, sono disponibili substrati fluorogenici che permettono analisi più sensibili e quantitative, anche mediante microscopia a fluorescenza o citometria a flusso, migliorando la possibilità di confrontare diversi campioni in modo più oggettivo (47).

A livello molecolare, la senescenza è caratterizzata da un arresto irreversibile del ciclo cellulare, mediato dall'attivazione di inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CDK).

Queste molecole interferiscono con la progressione del ciclo cellulare attraverso il blocco delle CDK, impedendo la transizione dalla fase G1 alla fase S e promuovendo così l'arresto proliferativo (48). In questo contesto, l'espressione di p16^{INK4a}, p21^{CIP1/WAF1} e p53 risulta fortemente aumentata nelle cellule senescenti, incluse le MSC, sia *in vitro* che *in vivo*, ed è strettamente associata all'instaurarsi e al mantenimento del fenotipo senescente.

In particolare, p16^{INK4a} agisce inibendo le CDK4/6, contribuendo al mantenimento dell'attività del complesso retinoblastoma (Rb) in forma attiva e quindi al blocco stabile della progressione del ciclo cellulare. p21, invece, è un effettore diretto della via di p53 e viene indotto in risposta a diversi tipi di stress cellulare, svolgendo un ruolo centrale nell'arresto del ciclo. p53 rappresenta un regolatore chiave della risposta allo stress genotossico e funziona come nodo upstream di numerosi pathway coinvolti nella senescenza, coordinando l'arresto proliferativo e altre risposte cellulari associate (49). Queste vie di segnalazione, in particolare gli assi p53/p21 e p16/Rb, non solo stabilizzano il blocco del ciclo cellulare, ma sono anche strettamente correlate a profonde modificazioni dell'organizzazione nucleare. Tra queste, si osserva frequentemente la riduzione di Lamin B1, componente strutturale della lamina nucleare, la cui perdita è associata a disorganizzazione della cromatina e rappresenta un ulteriore marcatore caratteristico delle cellule senescenti (50).

Accanto a questi indicatori diretti, esistono alterazioni molecolari e strutturali tipiche della senescenza, come modifiche della cromatina, cambiamenti epigenetici e danni persistenti al DNA, che supportano ulteriormente l'identificazione delle cellule senescenti (51).

Le alterazioni morfologiche, biochimiche e molecolari descritte rappresentano i principali strumenti utilizzati per identificare e monitorare la **senescenza cellulare** anche nelle **cellule staminali mesenchimali** derivate dal tessuto adiposo (hADSCs).

Attualmente le ADSC sono applicate in clinica per il trattamento di diverse patologie, tra cui ricordiamo: atrofia facciale, attualmente valutata in uno studio di fase II (52), osteoartrosi del ginocchio, in fase di studio I/II finalizzato alla valutazione della sicurezza e dell'efficacia dell'iniezione di ADSC espanse (53), fistole perianali (54), trattamento delle pazienti con cicatrici e aderenze uterine conseguenti a taglio cesareo

o a infiammazione cronica della mucosa uterina e delle tube di Falloppio (55). Il trapianto autologo e allogenico (nel caso dell'osteoartrosi del ginocchio) di ADSC attualmente autorizzato per il trattamento delle patologie sopra descritte, prevede una prima fase di prelievo ed isolamento da un donatore sano ed una successiva amplificazione cellulare *in vivo* necessaria all'ottenimento di una concentrazione cellulare sufficiente alla finalità terapeutica.

Le modificazioni cellulari riscontrate nel fenotipo senescente, infatti, si associano a una progressiva perdita del potenziale di autorinnovamento e a un indebolimento delle funzioni rigenerative, con possibili effetti negativi sull'efficacia terapeutica complessiva. Le cellule senescenti, inoltre, sviluppano un fenotipo secretorio (**Figura 4**) caratterizzato da un incremento del rilascio di mediatori pro-infiammatori e di enzimi coinvolti nella degradazione della matrice extracellulare, con possibili ripercussioni sull'omeostasi tissutale sia a livello locale che sistemico. Queste alterazioni possono costituire un limite importante per l'utilizzo clinico delle hADSCs in medicina rigenerativa (56). Sebbene tale criticità sia ampiamente documentata sia in modelli animali che in studi su cellule di derivazione umana, la letteratura (57,58) presenta dati talvolta discordanti riguardo all'effettivo peso dell'età biologica del donatore nel determinare la compromissione della capacità rigenerativa delle cellule.

Tali risultati suggeriscono che la senescenza non sia un fattore intrinseco legato all'*aging*, quanto piuttosto un fenomeno fortemente condizionato dalle procedure di espansione *in vitro*. A questo proposito, studi condotti su modelli murini (57) evidenziano come la senescenza non sia correlata primariamente all'età del donatore, bensì all'entità dello stress enzimatico e meccanico accumulato durante i passaggi di tripsinizzazione.

Nell'articolo di Ye et al. (59) è stato dimostrato che le OADSC (cellule staminali derivate dal tessuto adiposo orbitario) isolate da donatori anziani presentano un potenziale rigenerativo ridotto rispetto a quelle di donatori giovani, come evidenziato dalla diminuzione della capacità proliferativa. Tuttavia, lo studio non analizza se tali differenze siano state valutate esclusivamente sulle cellule primarie oppure dopo un periodo di espansione in coltura mediante ripetuti passaggi con tripsinizzazione. Pertanto, non è possibile escludere che una parte delle alterazioni osservate possa

essere stata influenzata anche dalla senescenza replicativa indotta dall'espansione *in vitro*.

Un ulteriore elemento a supporto di questa interpretazione è fornito da Choudhery et al. (58) che mostrano come le cellule mesenchimali adipose di donatori anziani presentino una ridotta capacità proliferativa e differenziativa rispetto a quelle di soggetti giovani, con aumento dei marker di senescenza. Gli autori attribuiscono tali differenze principalmente all'età del donatore. Tuttavia, le cellule sono state espanse *in vitro* mediante passaggi seriali con utilizzo di tripsinizzazione, per cui non è possibile escludere che parte dei fenomeni osservati sia influenzata anche dalla senescenza replicativa indotta dalle condizioni di coltura.

In aggiunta all'età, anche l'obesità influisce negativamente sulla qualità e proliferazione delle cellule staminali adipose. In condizioni di obesità, il tessuto adiposo è caratterizzato da infiammazione cronica e aumento dello stress ossidativo, fattori che possono compromettere la funzionalità delle ADSC. È stato infatti osservato che le cellule derivate da soggetti obesi presentano una ridotta capacità rigenerativa e una minore efficacia nei processi di riparazione tissutale, evidenziando una compromissione del loro potenziale terapeutico (60).

Anche il diabete mellito rappresenta un fattore in grado di compromettere la funzionalità delle cellule staminali adipose. In condizioni diabetiche, l'ambiente sistemico caratterizzato da iperglicemia cronica e stress ossidativo può alterare le proprietà biologiche delle cellule staminali, riducendone la capacità rigenerativa e l'efficacia terapeutica (61).

Strategie per contrastare la senescenza

Tra le strategie proposte per contrastare la senescenza delle ADSC, particolare interesse è stato rivolto alla modulazione della funzione mitocondriale e dei meccanismi di mitofagia, processi che sono stati ampiamente studiati anche in altre tipologie cellulari e popolazioni di cellule staminali, dove svolgono un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi cellulare e nella prevenzione dell'invecchiamento. Un recente studio ha dimostrato che il trattamento con melatonina e coenzima Q10 (CoQ10) (62) è in grado di ridurre il fenotipo senescente nelle *human adipose-derived*

mesenchymal stem cells (hADMSC) sottoposte a stress ossidativo indotto da H₂O₂ e D-galattosio. Il trattamento ha determinato una diminuzione dei principali marker di senescenza, tra cui l'attività della SA-β-galattosidase, associata a un miglioramento della proliferazione e della vitalità cellulare. È stata inoltre osservata una significativa riduzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e un recupero della funzionalità mitocondriale. In particolare, melatonina e CoQ10 hanno promosso l'attivazione della mitofagia, aumentando l'espressione di proteine coinvolte nel controllo di qualità mitocondriale, come Parkin, BNIP3 e LC3B. Tali risultati suggeriscono che il ripristino dell'omeostasi mitocondriale rappresenti una strategia promettente per limitare la senescenza delle ADSC e preservarne il potenziale rigenerativo (63).

Un approccio consolidato per la prevenzione della senescenza delle ADSC durante l'espansione *in vitro* è rappresentato dalla modulazione del bilancio redox intracellulare. È ampiamente documentato che l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) costituisce un determinante centrale nell'induzione del fenotipo senescente e nella progressiva perdita delle proprietà staminali delle ADSCs sottoposte a colture prolungate. In tale contesto, l'impiego di agenti antiossidanti quali melatonina e glutathione ridotto (GSH) ha evidenziato un'efficace capacità nel ridurre i livelli intracellulari di ROS, limitando il danno ossidativo e l'attivazione dei pathway molecolari associati alla senescenza cellulare. La riduzione dello stress ossidativo è risultata correlata a una diminuzione dei principali marker senescenti, unitamente a un miglioramento delle proprietà proliferative e migratorie delle ADSC (64).

Parallelamente, le cellule trattate hanno mantenuto le principali caratteristiche funzionali tipiche delle cellule staminali mesenchimali, inclusa la capacità di differenziazione multilineare verso linee adipogeniche, osteogeniche e condrogeniche, indicando il mantenimento del loro potenziale differenziativo durante l'espansione *in vitro*. Tali evidenze supportano il ruolo cruciale della regolazione dello stress ossidativo quale strategia efficace per prevenire la senescenza delle ADSC e preservarne il potenziale rigenerativo in ambito di medicina rigenerativa (65).

Le strategie senolitiche rappresentano un approccio innovativo per il controllo della senescenza cellulare, basato sull'eliminazione selettiva delle cellule senescenti

mediante l'impiego di composti in grado di indurre apoptosi in tali cellule senza compromettere significativamente le cellule sane (66).

Questo tipo di intervento mira a ridurre il carico senescente tissutale e il relativo fenotipo secretorio pro-infiammatorio (SASP), con potenziali benefici sul microambiente cellulare e sulla funzionalità dei tessuti, incluse le ADSC, il cui potenziale rigenerativo può essere compromesso dall'accumulo di cellule senescenti (67).

Uno studio clinico preliminare ha valutato l'effetto della combinazione di dasatinib e quercetina (68), dove dasatinib è un inibitore tirosin-chinasico utilizzato anche in ambito oncologico, mentre la quercetina è un flavonoide naturale con proprietà antiossidanti e anti-infiammatorie, in soggetti con diabete e malattia renale cronica, condizioni caratterizzate da elevato carico di senescenza nel tessuto adiposo. Il trattamento ha determinato una riduzione delle cellule senescenti, evidenziata dalla diminuzione dei marker p16^{INK4A}, p21^{CIP1} e dell'attività della SA-β-galattosidase (67).

Parallelamente è stata osservata una riduzione del fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP), con abbassamento di mediatori infiammatori quali IL-6 e IL-1α, suggerendo un miglioramento del microambiente tissutale. Tali effetti sono attribuiti all'induzione di apoptosi selettiva delle cellule senescenti mediante inibizione delle vie di sopravvivenza cellulari. Queste evidenze risultano rilevanti anche per le ADSC, poiché la riduzione del carico senescente nel tessuto adiposo può contribuire al mantenimento della loro funzionalità e del loro potenziale rigenerativo (69).

2 SCOPO DEL LAVORO

Nonostante i risultati promettenti delle terapie basate su cellule staminali, i tassi di fallimento clinico rimangono significativi e la senescenza cellulare, che si manifesta durante la fase di espansione *in vitro* necessaria per la produzione di cellule su larga scala è uno dei principali fattori che contribuiscono a questo problema.

Le MSCs senescenti mostrano una ridotta capacità proliferativa, profili secretori e potenziale di differenziamento alterati, compromettendo in ultima analisi la loro efficacia terapeutica e le prestazioni rigenerative.

Questa tesi sperimentale si propone di studiare *in vitro* il processo di senescenza cellulare di cellule staminali derivate dal tessuto adiposo (ADSC) ottenute mediante due tecniche, al fine di capire se è possibile ottimizzare la preparazione e migliorare l'efficacia complessiva delle terapie rigenerative, ipotizzando che la preservazione della nicchia stromale nativa possa ridurre questo fenomeno.

L'obiettivo finale è stato quindi valutare e confrontare i fenomeni di senescenza cellulare nelle ADSCs ottenute mediante digestione enzimatica (ADSC-E), il classico metodo utilizzato per ottenere cellule staminali, e nelle ADSCs ottenute tramite *outgrowth* (ADSC-O), al fine di evidenziare eventuali differenze biologiche e funzionali che potrebbero spiegare la migliore efficacia clinica dell'impianto di tessuto adiposo microframmentato (MFAT).

È stato utilizzato come campione biologico MFAT, ottenuto mediante tecnologia Lipogems e fornito, previo consenso informato dei pazienti, da Image Regenerative Clinic Milano.

Le valutazioni di senescenza sono state effettuate mediante western blot e colorazione cellulare della β -galattosidasi sulle ADSC E ad un tempo iniziale e a una fase tardiva di passaggi in tripsina, mentre su ADSC O, due diversi tempi di *outgrowth* dal tessuto in coltura, cercando di mimare *in vitro* la situazione clinica. Al fine di valutare l'eventuale senescenza del tessuto in coltura durante le analisi di *outgrowth*, gli stessi test di senescenza sono stati effettuati sul tessuto MFAT.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione del lipoaspirato e processo di microframmentazione tramite tecnologia Lipogems®

Il tessuto adiposo sottocutaneo è stato prelevato mediante procedura di liposuzione, eseguita in condizioni di sterilità presso Image Regenerative Clinic, situata a Milano. I campioni sono stati ottenuti da soggetti sani con età compresa tra i 20 e i 70 anni, con BMI (peso/altezza²) compreso nel range di normalità (18,5–24,9). Prima dell'esecuzione della procedura, tutti i pazienti ricevono adeguate informazioni sulle finalità e sulle modalità dell'intervento e sottoscrivono il consenso informato per l'impiego del materiale biologico di scarto a scopo di ricerca, in conformità con le disposizioni etiche e normative applicabili.

Una volta raccolto, il lipoaspirato di ciascun paziente viene immediatamente sottoposto a microframmentazione in ambiente chiuso, mediante l'utilizzo del dispositivo Lipogems® (**Figura 5**), un sistema di processazione del tessuto adiposo che consente di ottenere un prodotto microframmentato ad elevato potenziale rigenerativo. Tale potenziale deriva dalla conservazione della nicchia stromale vascolare e dell'architettura del tessuto adiposo, preservandone le proprietà biologiche e rigenerative (**70**).

Mediante questa tecnologia, illustrata in **Figura 5**, il tessuto adiposo viene processato in un sistema completamente chiuso attraverso lievi forze meccaniche, senza l'impiego di collagenasi o altri enzimi. Il lipoaspirato viene inizialmente sottoposto a una prima riduzione dei cluster adiposi e a un accurato lavaggio con soluzione fisiologica. Grazie all'azione delle sfere in acciaio e al flusso gravitazionale della soluzione salina, vengono rimossi sangue, olio libero e residui cellulari, componenti che potrebbero esercitare un effetto pro-infiammatorio e compromettere la qualità biologica del campione. Successivamente, il tessuto viene ulteriormente microframmentato mediante un secondo sistema di filtrazione, ottenendo cluster adiposi di dimensioni più ridotte e omogenee. Questo processo consente di preservare l'integrità del microambiente perivascolare e delle cellule stromali/staminali residenti, favorendone la vitalità e il potenziale rigenerativo (**71**).

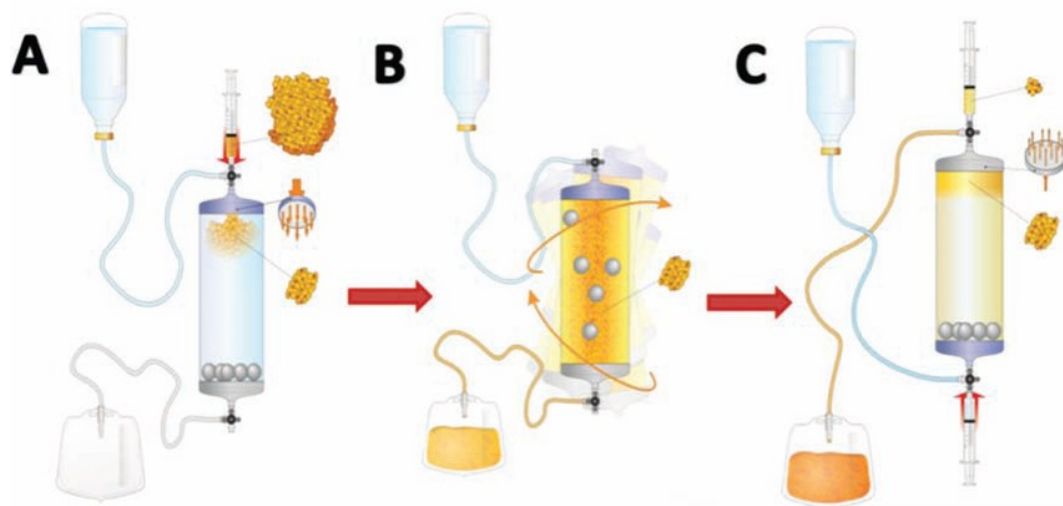


Figura 5: rappresentazione schematica sistema Lipogems® (71).

3.2 Processamento del campione al momento dell'arrivo in laboratorio

Il campione di MFAT, ricevuto dalla clinica, in siringa sterile, lo stesso giorno del prelievo, con trasporto a temperatura compresa tra i 5-18°C, viene trasferito in una falcon da 15 mL e sottoposto a centrifugazione a 400 rcf per 5 minuti, come è mostrato in (Figura 6).

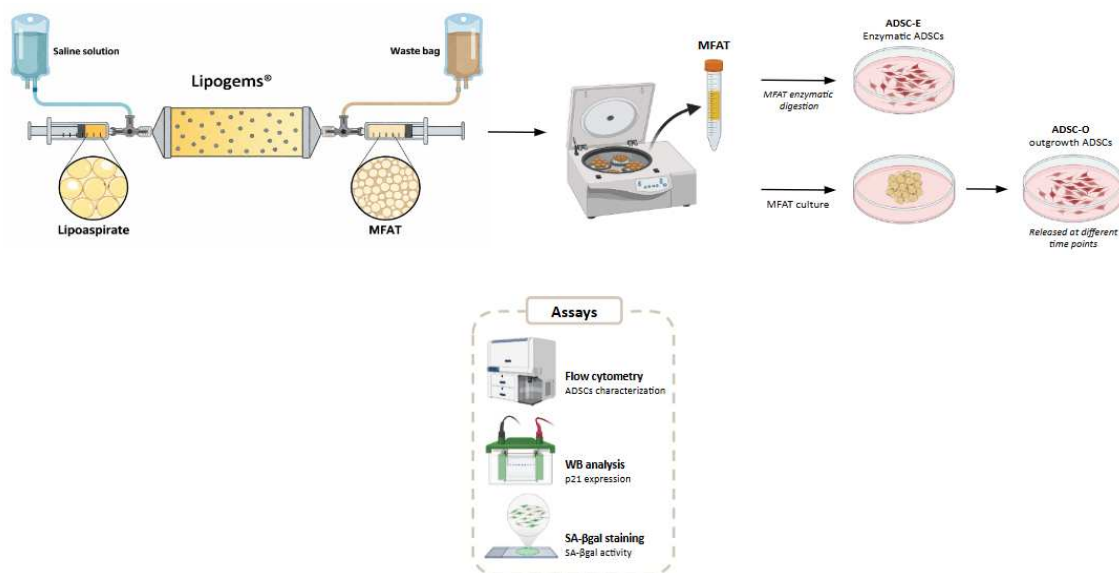


Figura 6: Schema riassuntivo del protocollo sperimentale adottato

Al termine del processo, il tessuto microframmentato si raccoglie nella parte superiore, al di sotto di un sottile strato di olio, mentre la soluzione salina residua si deposita sul fondo della falcon (**Figura 7**), con globuli rossi eventualmente presenti dopo il trattamento con Lipogems®.

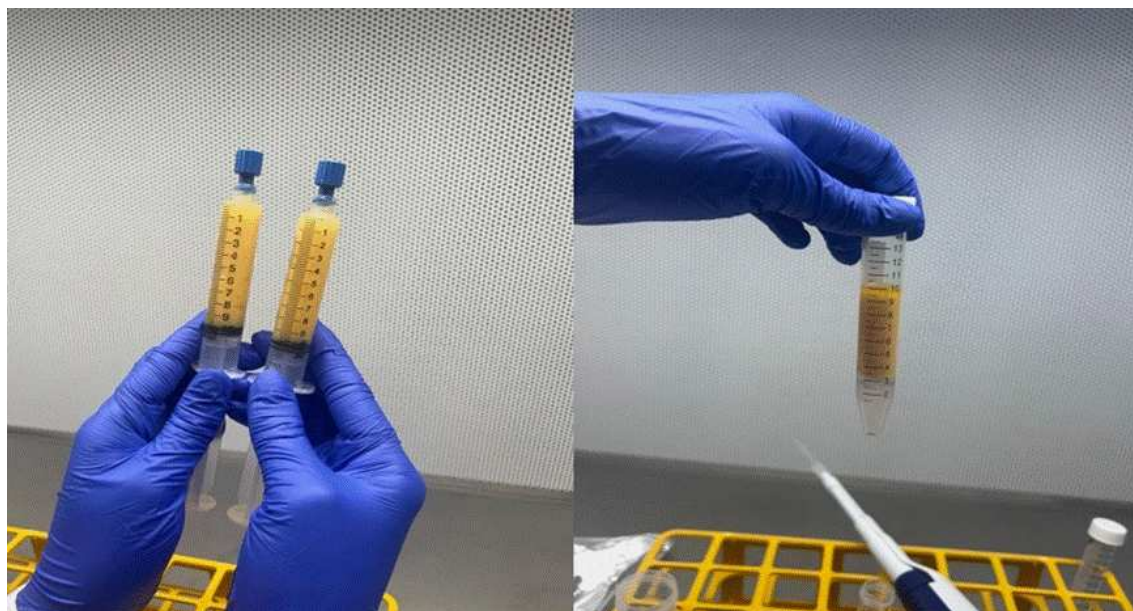


Figura 7: campione pre (a sinistra) e dopo (a destra) primo trattamento di centrifugazione

Il volume di MFAT ottenuto è stato suddiviso per diversi trattamenti sperimentali:

- una parte viene sottoposta a digestione enzimatica per isolare le cellule staminali della frazione vascolo-stromale, procedura descritta nel capitolo 3.3
- 2 ml MFAT vengono posti in coltura con 6 ml di DMEM/F12 (MFAT 1:3 terreno di coltura arricchito con penicillina/streptomycin all'1%; EuroClone, Italia), 20% FBS (EuroClone S.p.A.) precedentemente inattivato con trattamento termico (30 minuti a 56°C) e rappresenta il t=0 delle ADSC ottenute per isolamento *outgrowth*, procedura descritta nel capitolo 3.4;
- 200 µl MFAT posti in MW (multi well) con 300 µl di DMEM/F12 (MFAT 1:3 media con aggiunta di penicillina/streptomycin all'1%) arricchito con 20% FBS inattivato (30 minuti a 56°C), per successivo saggio β -galattosidasi delle ADSCs O ai tempi t=10, e t=30, procedura descritta nel capitolo 3.10;

- una porzione di MFAT a $t=0$ è stata fissata in formalina per successive analisi istologiche, secondo protocollo descritto di seguito (capitolo 3.9);
- 1,5 ml di MFAT a $t=0$ sono stati lisati per l'esecuzione del western blot (capitolo 3.8).

3.3 Isolamento di ADSC-E da MFAT

Le ADSCs isolate a partire da MFAT mediante digestione enzimatica (ADSC E) hanno previsto i seguenti trattamenti tutti in sterilità utilizzando soluzioni sterili, plastica usa/getta sotto cappa a flusso laminare.

Per l'isolamento, il campione di MFAT è stato miscelato in rapporto 1:1 con un cocktail enzimatico costituito da HBSS supplementato con collagenasi di tipo IA (0,75 mg/mL), albumina sierica bovina (BSA) all'1,5% e antibiotici/antimicotici all'1% (P/S). Salvo diversa indicazione, i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Italia S.r.l. (Milano, Italia). La soluzione HBSS è stata preparata in PBS 1X aggiungendo NaHCO_3 (0,35 g/L), D-glucosio (1 g/L; Scharlab, Barcellona, Spagna) ed HEPES (3,57 g/L).

La digestione enzimatica è stata effettuata a 37°C per 40 minuti in bagno termostato, mantenendo il campione in agitazione mediante miscelazione ogni 15 minuti. Al termine dell'incubazione, il materiale digerito è stato filtrato attraverso una garza sterile posta su una Falcon da 50 mL; il filtro è stato successivamente lavato con 10 mL di DMEM/F12 contenente il 10% di FBS.

Il filtrato ottenuto è stato centrifugato a $600 \times g$ per 10 minuti. Dopo eliminazione del surnatante, il pellet cellulare è stato lavato due volte con 5 mL di PBS 1X, seguito da ulteriore centrifugazione a $600 \times g$ per 10 minuti.

Infine, il pellet è stato risospeso in terreno DMEM/F12 supplementato con il 50% di FBS e seminato in piastra per coltura cellulare. In particolare, le cellule ottenute da 5 mL di MFAT digerito sono state seminate in una Mw a 6 pozzetti in un volume finale di 3 mL di terreno di coltura.

Dopo digestione enzimatica del MFAT, le cellule ADSC-E sono state mantenute in coltura in terreno DMEM/F12 supplementato con il 50% di FBS per 10 giorni senza

passaggi in tripsina. Al terzo giorno, il mezzo di coltura è stato sostituito con una soluzione fresca della stessa composizione.

Al termine dei 10 giorni di coltura, le cellule sono state sottoposte a passaggio cellulare mediante tripsinizzazione per consentirne il mantenimento e l'espansione nel tempo. I passaggi cellulari sono stati successivamente eseguiti con cadenza settimanale, dal passaggio 1 (p1) al passaggio 7 (p7). Ad ogni passaggio sono state raccolte e conservate aliquote cellulari e campioni di terreno condizionato per successive analisi sperimentali.

Dopo il conteggio cellulare e la risemina, una parte delle cellule è stata destinata al mantenimento della coltura (Dish A), mentre una seconda aliquota cellulare (Dish B) è stata utilizzata per l'estrazione proteica (capitolo 3.5) e i successivi saggi sperimentali.

3.4 Isolamento di ADSC O da MFAT

Il processo di isolamento non enzimatico delle cellule ADSC si basa sulla capacità delle cellule stromali presenti nel MFAT di migrare spontaneamente in coltura, fenomeno noto come *outgrowth*. Questo approccio consente di evitare l'impiego di enzimi, mantenendo il tessuto il più possibile vicino alla sua condizione fisiologica e preservandone l'architettura e il microambiente cellulare. Le cellule ottenute con questa metodologia vengono definite ADSC-O (*outgrowth adipose-derived stem cells*) e vengono raccolte in differenti time-point della coltura, a 10 e 30 giorni dall'inizio dell'incubazione senza aver mai subito tripsinizzazione. Tali popolazioni cellulari sono rispettivamente indicate come t=10 e t=30.

Il MFAT viene coltivato in terreno DMEM/F12 (con aggiunta di penicillina/streptomycin all'1%) arricchito con 50% di FBS, in condizioni standard di incubazione (37°C, 5% CO₂), evitando qualsiasi trattamento di tipo enzimatico o meccanico volto alla digestione del tessuto. In questo sistema di coltura, le cellule stromali residenti nel tessuto adiposo migrano gradualmente dal frammento tissutale verso il fondo della piastra, dove aderiscono alla superficie plastica e, successivamente, iniziano un processo di espansione e proliferazione cellulare. Durante il periodo in cui il MFAT rimane in coltura nella piastra, il terreno viene sostituito due volte, a distanza di 3 giorni

l'uno dall'altro, al fine di mantenere adeguate condizioni nutritive e favorire la vitalità del tessuto e la migrazione cellulare.

Al raggiungimento dei 10 giorni di coltura, il MFAT viene trasferito in una nuova piastra di coltura, mantenendo inalterate le condizioni sperimentali precedentemente descritte (DMEM/F12 arricchito con FBS, 37°C e 5% CO₂). Questo passaggio viene effettuato al fine di proseguire il processo di *outgrowth* cellulare e garantire la continuità della coltura del tessuto nelle stesse condizioni ambientali. Una volta trasferito il MFAT in una nuova piastra, le cellule ADSC rilasciate vengono sottoposte a tre lavaggi con PBS 1X (5 mL per lavaggio), al fine di rimuovere eventuali residui di tessuto e cellule non aderenti. Successivamente, viene aggiunto terreno di coltura fresco (DMEM/F12 supplementato con FBS), e le cellule vengono mantenute in incubatore a 37°C e 5% CO₂.

Il terreno viene quindi sostituito regolarmente due volte a settimana, a distanza di circa 3 giorni, per garantire condizioni ottimali di crescita. La coltura viene mantenuta fino al raggiungimento della confluenza cellulare.

Dopo il conteggio cellulare e la risemina, una parte delle cellule è stata destinata al mantenimento della coltura (Dish A), mentre una seconda aliquota cellulare (Dish B) è stata utilizzata per l'estrazione proteica e le successive analisi biochimiche.

3.5 Saggio di lisi delle ADSC O e delle ADSC E

Le ADSC, a confluenza, sono state lisate per l'estrazione delle proteine cellulari destinate ad analisi in western blot. Il procedimento ha permesso di ottenere lisati cellulari contenenti il pool proteico intracellulare, utilizzati per la valutazione dei livelli delle proteine di interesse nelle diverse condizioni sperimentali.

In una prima fase, le cellule sono state accuratamente lavate tre volte con PBS 1X (5 mL per piastra), con l'obiettivo di rimuovere completamente eventuali residui di terreno di coltura e siero che avrebbero potuto interferire con l'estrazione proteica. Successivamente, è stato aggiunto il tampone di lisi RIPA, impiegato in un volume di 500 µL per piastre da 10 cm e 250 µL per piastre da 6 cm. Il tampone RIPA utilizzato presenta la seguente composizione: NaCl 0,15 M, Triton X-100 1%, sodio deossicolato

0,5%, SDS 0,1% e Tris-HCl 0,05 M a pH 8; tutti i reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Italia S.r.l. (Milano, Italia). Il volume finale è stato portato a completamento con acqua distillata.

Il tampone è stato opportunamente arricchito, al momento dell'utilizzo, con inibitori di proteasi (10 µL/mL di cocktail inibitore delle proteasi e 100 µL/mL di Na₃VO₄) per preservare l'integrità delle proteine e prevenire fenomeni di degradazione durante il processo di lisi. Le cellule sono state quindi incubate 30 minuti con il tampone a 4°C, mantenendo le piastre in posizione orizzontale su ghiaccio e agitando manualmente ogni 5 minuti per favorire una completa solubilizzazione delle componenti cellulari. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state meccanicamente distaccate mediante *scraping*, operando sempre su ghiaccio per limitare la degradazione proteica. Il lisato ottenuto è stato trasferito in provette Eppendorf da 1,5 mL precedentemente raffreddate e successivamente centrifugato a 12.000 rpm per 10 minuti a 4°C. Questo passaggio ha permesso la separazione dei detriti cellulari insolubili, mentre il surnatante contenente le proteine solubili è stato accuratamente recuperato e conservato a -80°C per le analisi successive.

3.6 Lisi del MFAT

La preparazione dei lisati di MFAT è stata effettuata mediante utilizzo di un tampone di lisi a caldo (*hot lysis buffer*) privo di inibitori, precedentemente portato ad ebollizione. Il tampone di lisi a caldo utilizzato è composto da SDS 2,5% e Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 (Sigma-Aldrich Italia S.r.l., Milano, Italia), portato a volume con acqua distillata.

La lisi del tessuto adiposo si rende necessaria a causa della sua elevata componente lipidica e della struttura tridimensionale compatta, che rendono difficile la solubilizzazione diretta delle proteine e richiedono pertanto un trattamento denaturante più aggressivo del RIPA per ottenere un lisato idoneo alle successive analisi proteiche.

Il tessuto è stato processato in rapporto 1:1 con il buffer, utilizzando una quantità di MFAT espressa in mg e un volume equivalente di tampone. Il campione è stato successivamente omogeneizzato in tubo Eppendorf da 1,5 mL mediante utilizzo di un Potter, al fine di favorire la completa disgregazione del tessuto e la liberazione delle

proteine intracellulari. Successivamente, il campione è stato incubato per 5 minuti a 100°C in termoblocco per favorire la denaturazione proteica e la completa lisi dei componenti cellulari. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 12.000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il surnatante è stato quindi recuperato con attenzione, evitando il prelievo dello strato lipidico superficiale e del pellet depositato sul fondo.

Per garantire una maggiore purezza del campione, la centrifugazione è stata ripetuta una seconda volta al fine di rimuovere eventuali residui lipidici che avrebbero potuto ostacolare la corsa elettroforetica. I lisati proteici ottenuti sono stati infine conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

3.7 Quantificazione delle proteine tramite metodo BCA

La quantificazione delle proteine è stata eseguita mediante saggio colorimetrico BCA (*bicinchoninic acid assay*) utilizzando una piastra a 96 pozzetti. In ciascun pozzetto sono stati dispensati 25 µL di campione, ai quali sono stati aggiunti 200 µL di Working Solution. Quest'ultima è stata preparata al momento dell'uso mediante miscelazione del reagente A e del reagente B in rapporto 50:1 (50 parti di reagente A e 1 parte di reagente B). I campioni sono stati incubati per 30 minuti a 37°C e successivamente lasciati raffreddare a temperatura ambiente prima della lettura spettrofotometrica a 562 nm (Victor plate reader).

Parallelamente è stata allestita una curva di calibrazione utilizzando albumina sierica bovina (BSA) (Sigma LifeScience, Canada) come standard, con concentrazioni comprese nell'intervallo 25–2000 µg/mL. Le soluzioni standard sono state preparate mediante diluizioni seriali, utilizzando lo stesso diluente dei campioni sperimentali per garantire condizioni comparabili.

Sono quindi state utilizzate 2 curve: una in RIPA per la quantificazione delle proteine cellulari ed una in hot buffer per la quantificazione delle proteine tissutali.

La concentrazione proteica dei campioni è stata infine determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione, previa sottrazione del valore del bianco, costituito da un solo tampone.

3.8 Analisi proteica tramite western blot

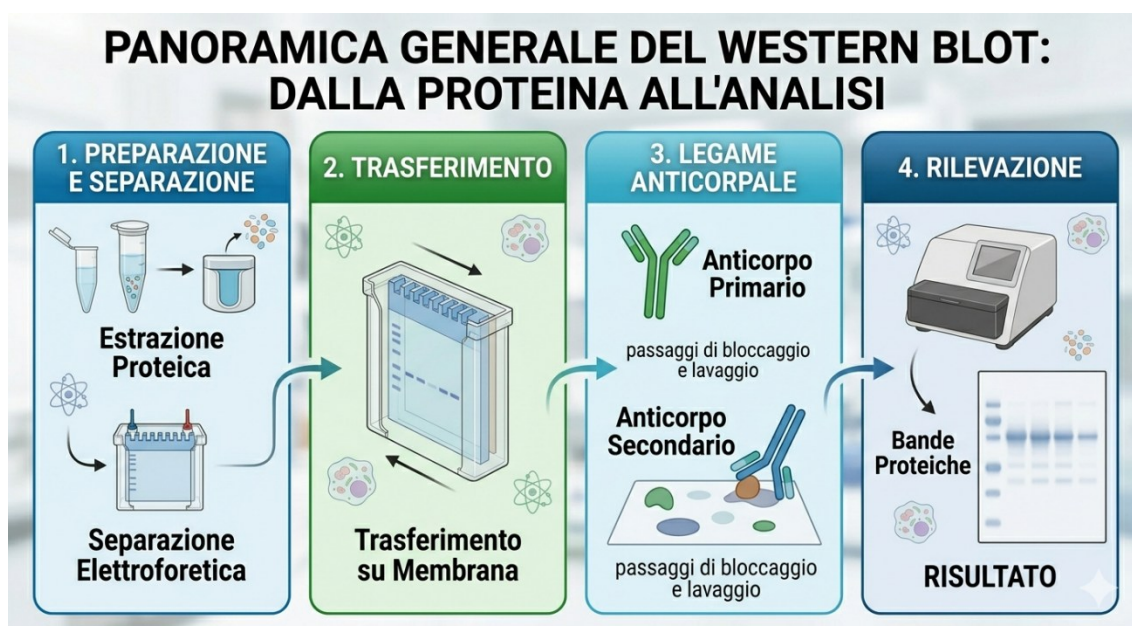


Figura 8: schema generale tecnica western Blot (Figura generata con Gemini AI (Google))

L'analisi proteica è stata effettuata mediante western blot (**Figura 8**), tecnica utilizzata per la separazione e l'identificazione di specifiche proteine in base al loro peso molecolare, permettendo la valutazione comparativa dei livelli proteici tra le diverse condizioni sperimentali.

I campioni proteici sono stati preparati miscelando il lisato cellulare con Sample Buffer 4X Laemmli (Bio-Rad), a cui è stato aggiunto 2-mercaptoetanolio in rapporto 1:10 al momento dell'uso, al fine di garantire la completa denaturazione delle proteine e la riduzione dei ponti disolfuro.

Prima del caricamento, le proteine sono state ulteriormente denaturate mediante incubazione a 70°C per 10 minuti.

La separazione proteica è stata eseguita mediante elettroforesi SDS-PAGE su gel pre-cast Mini-PROTEAN (Bio-Rad), utilizzando Running Buffer 1X, ottenuto per diluizione del corrispondente stock 10X in acqua distillata. I campioni e il marker proteico sono stati caricati nei pozzetti e la corsa elettroforetica è stata condotta applicando inizialmente 10' 90V e successivamente 40' 120 V fino al completamento della migrazione.

Successivamente, le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa mediante sistema di trasferimento in verticale e wet (Mini Trans-Blot, Bio-Rad). Il Transfer Buffer 1X è stato preparato miscelando 100 mL di buffer 10X (circa 500 ml, stoccato a 4°C, composto da 14,5 g di glicina, 29 g Trizma Base (Sigma-Aldrich Italia S.r.l., Milano, Italia) e 18,5 g SDS in 500 ml di acqua distillata) con 200 mL di metanolo (Sigma-Aldrich Italia S.r.l., Milano, Italia) e 700 mL di acqua distillata. Il trasferimento è stato effettuato a 100 V per 90', mantenendo il sistema in condizioni di raffreddamento per preservare l'integrità proteica.

Al termine del trasferimento, le membrane sono state recuperate ed è stata eseguita la fase di *blocking* per un ora a temperatura ambiente in soluzione di latte al 5% in TBST 1X. Il TBST 1X è stato preparato a partire da TBS 10X diluito in acqua distillata e addizionato con Tween-20 (Sigma-Aldrich Italia S.r.l., Milano, Italia) fino alla concentrazione finale dello 0,1%, con pH regolato a 7,4–7,6. Dopo il *blocking*, la membrana è stata recuperata e sezionata orizzontalmente in base ai range di peso molecolare degli anticorpi di interesse, e successivamente è stata rifinita lateralmente in base alla posizione sia dei marker di peso molecolare che alle delle corsie dei campioni di MFAT e ADSC, effettuando inoltre un taglio obliquo su ogni estremità di ogni singola porzione di membrana, per facilitarne il riconoscimento e il corretto orientamento nelle fasi successive sperimentali. Le membrane sono state successivamente incubate con anticorpi primari diretti contro GAPDH e p21 (Cell Signaling Technology, USA), diluiti in BSA al 5% in TBST 1X, overnight a 4°C sotto agitazione.

Il giorno seguente sono stati effettuati tre lavaggi con TBST 1X e le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con HRP (Cell Signaling Technology, USA), diluito 1:1000 in TBST contenente il 5% di proteine del latte. Dopo ulteriori lavaggi, la rilevazione del segnale è stata effettuata mediante chemiluminescenza utilizzando substrato ECL (Bio-Rad), miscelato in rapporto 1:1, con incubazione di 5 minuti. Le membrane sono state infine analizzate mediante sistema di acquisizione digitale ChemiDoc (Biorad).

3.9 Inclusione in paraffina

Il MFAT è stato sottoposto a processamento istologico al fine di preservarne la struttura tissutale e renderlo idoneo a successive analisi morfologiche e/o immunoistochimiche mediante inclusione in paraffina. I campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10% (Sigma-Aldrich Italia S.r.l., Milano, Italia) con lo scopo di stabilizzare le strutture tissutali e prevenire processi di degradazione. Successivamente, il tessuto è stato sottoposto a disidratazione attraverso passaggi progressivi in etanolo (Carlo Erba, Milano, Italia) a concentrazione crescente (70%, 80%, 95% e 100%) di 45 minuti l'uno, seguiti da chiarificazione in xilene, necessaria per la sostituzione dell'alcol con un solvente compatibile con la paraffina. I campioni sono stati quindi infiltrati in paraffina mediante incubazioni progressive in miscele paraffina/xilene 1:1 per 2h e successivamente *overnight* in paraffina pura. Il tessuto è stato quindi incluso in stampi contenenti paraffina liquida e orientato secondo il piano di taglio desiderato, lasciando solidificare il blocco. Le sezioni sono state ottenute mediante microtomo (Leica Microsystems, Germany) con spessore di circa 7 μ m, distese in bagno termostato e montate su vetrini. I preparati sono stati infine essiccati in stufa a 37°C *overnight* per favorire l'adesione del tessuto.

3.10 Saggio della β -galattosidasi associata alla senescenza (SA- β -gal)

Il saggio β -gal è stato eseguito sulle cellule ADSC ai tempi sperimentali $t = 0$, $t = 10$ e $t = 20$ giorni, mentre sul campione MFAT ai tempi $t = 0$ e $t = 30$ giorni.

L'attività della β -galattosidasi è stata valutata mediante colorazione istochimica con X-Gal. Le cellule sono state lavate due volte con PBS 1x e successivamente fissate con una soluzione contenente il 2 % di formaldeide (Sigma-Aldrich Italia S.r.l., Milano, Italia) e lo 0,2% di glutaraldeide (Merck KgaA, Germania) per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo la fissazione i campioni sono stati lavati due volte con PBS 1x e mantenuti in PBS A 4°C fino all'esecuzione della colorazione. Prima dell'incubazione con la soluzione colorante, i campioni sono stati accuratamente risciacquati con acqua distillata per rimuovere eventuali residui salini.

Per l'MFAT, i campioni sono stati prima deparaffinati, mediante due passaggi in xilene, seguiti da una reidratazione in serie decrescente di etanolo (100% EtOH 2x, 96% EtOH, 76% EtOH, 5 minuti per ogni passaggio). Le sezioni sono state quindi idratate in acqua distillata per 3 minuti e lavate tre volte con PBS 1x per un minuto.

Sia per l'MFAT che per le ADSC per effettuare la colorazione i campioni vengono trattati con una *Staining solution* e incubati overnight a 37°C, in assenza di anidride carbonica e luce. La *staining solution* è una soluzione di colorazione contenente (Tabella 1):

Ordine	Soluzione	Concentrazione finale
1	K ₄ [Fe(CN) ₆] 3H ₂ O (II) 100mM in acqua distillata	5mM
2	K ₃ [Fe(CN) ₆] (III) 100mM in acqua distillata	5mM
3	NaCl 5M in acqua distillata	150mM
4	MgCl ₂ 1M in acqua distillata	2Mm
5	Acido Citrico/ Na fosfato buffer* pH 6 (0,2M) in acqua distillata	40mM
6	X-Gal 2% (50mg/ml) in DMF	1mg/ml
7	H ₂ O	

Tabella 1: composizione della soluzione colorante SA-Gal*. Acido citrico/ Na fosfato buffer: miscelare 36,85 ml di acido citrico 100mM con 63,15 ml di soluzione di fosfato di sodio dibasico 200mM, verificando il raggiungimento del pH finale di 6,0

Per il saggio su ADSC utilizzando la **sonda a fluorescenza**, le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 3×10^3 cellule per pozzetto. Dopo 24 ore, il terreno di coltura è stato sostituito e alcuni pozzetti sono stati trattati con H₂O₂ alla concentrazione finale di 100 µM per 2 ore, al fine di indurre senescenza cellulare e fungere da controllo positivo del saggio, mentre le cellule MRC5 sono state utilizzate

come controllo negativo. Al termine del trattamento, le cellule sono state lavate due volte con PBS 1X e mantenute in terreno completo fino al giorno dell'analisi.

Le cellule sono state successivamente fissate con paraformaldeide (PFA) al 4% (Sigma-Aldrich Italia S.r.l., Milano, Italia) per 5–10 minuti a temperatura ambiente, protette dalla luce. Dopo lavaggio con PBS contenente BSA 1%, è stata aggiunta la soluzione di lavoro contenente la sonda CellEvent™ Green (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA) diluita 1:1000 nel relativo buffer di senescenza. Questa sonda contiene due gruppi galattosidici, rendendolo specifico per la β -galattosidasi. I campioni sono stati incubati overnight a 37°C in assenza di CO₂ e al riparo dalla luce.

Per quanto riguarda l'MFAT, il saggio β -gal è stato eseguito su sezioni tissutali ottenute da campioni inclusi in paraffina mediante microtomo. Anche in questo caso, dopo fissazione e incubazione con la soluzione di lavoro contenente la sonda CellEvent™ Green, i campioni sono stati mantenuti overnight a 37°C in assenza di CO₂ e protetti dalla luce.

Il giorno seguente, per entrambi i campioni, la soluzione è stata rimossa ed è stato effettuato un doppio lavaggio con PBS 1X. Successivamente, è stata eseguita la colorazione con DAPI (500 nM) per 3 minuti a temperatura ambiente, seguita da ulteriori lavaggi con PBS 1X. Le immagini sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza utilizzando i filtri Alexa Fluor 488/FITC e UV. Per ciascun campione sono stati acquisiti tre campi casuali a ingrandimento 10×, valutando il numero di cellule β -gal positive rispetto al numero totale di cellule.

4 RISULTATI E DISCUSSIONI

In questo capitolo sono riportati e discussi i risultati relativi alla valutazione della senescenza cellulare in ADSC-E, ADSC-O e MFAT. In particolare, verranno di seguito illustrati i risultati ottenuti mediante tecnica western Blot e colorazione β -galattosidasi per valutare rispettivamente i livelli del marker di senescenza p21 e SA- β -gal, entrambi overespressi in cellule senescenti. I campioni processati sono associati ad un codice identificativo del paziente, caratterizzato da una lettera iniziale, M per i maschi e F per le femmine, seguita da un numero che rappresenta l'anno di nascita.

Analisi della senescenza nelle ADSC-E

Nella tabella relativa alle ADSC-E (**Figura 8B**), la dicitura da p1 a p7 indica i diversi passaggi di tripsinizzazione a cui le cellule sono state sottoposte durante il periodo di coltura. I risultati ottenuti dal western blot (WB) sono stati quantificati mediante il software Bio-Rad, analizzando i valori di intensità delle bande per GAPDH e p21. Successivamente, i valori di p21 sono stati normalizzati rispetto a GAPDH per correggere eventuali differenze di caricamento. Infine, è stato calcolato l'incremento di senescenza.

Nella **Figura 8A** è riportata un'immagine rappresentativa di WB di lisati cellulari ADSC-E a diversi passaggi. L'immagine mostra come ad una GAPDH costante sia invece associato un incremento progressivo dei livelli di p21 all'aumentare del numero di passaggi in tripsina con evidenze nette di incremento in p3 e p4 ed ulteriore incremento in p5 e p7.

La tabella (**Figura 8B**) mostra invece i valori di p21 normalizzati al GAPDH dei vari pazienti (n=6) ai tempi sperimentali di lisi, riportati in tabella (**Figura 8C**) come incremento p1-p2, p1-p3 e p1-p7.

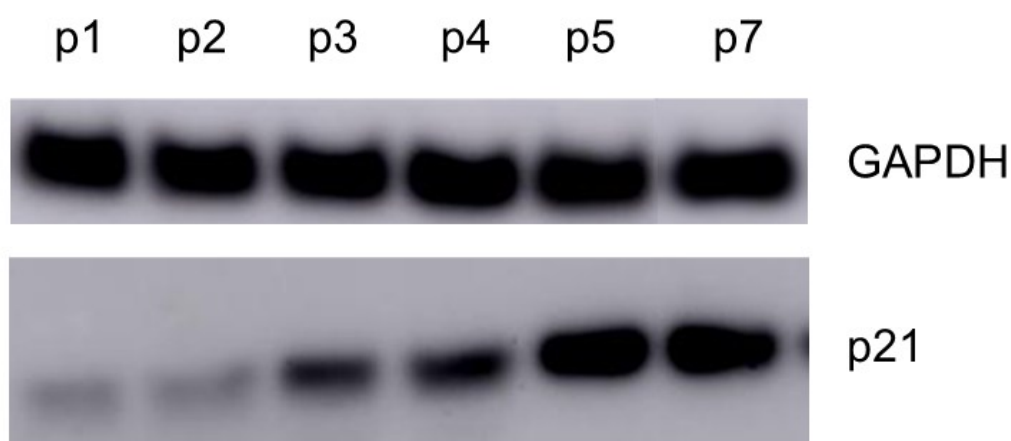


Figura 8A: immagine rappresentativa di western blot

Pazienti	p1	p2	p3	p4	p5	p7
M94	9,90					20,90
F66	1,00					3,60
M64 (a)	0,99	1,00			2,20	
M64 (b)	0,22	0,31	1,10	1,09	1,29	
	0,13	0,18			1,27	
F60	0,66	0,52	1,33	1,38	1,48	
	0,27	0,29	1,16	1,18		
M51	0,52	0,56	1,15	1,18		
	0,61	0,66	1,36	1,27	2,07	

Figura 8B: valori di p21 normalizzati al GAPDH dei vari pazienti

Dai dati ottenuti non si osserva un incremento di senescenza nei primi passaggi in tripsina ma diversamente da quanto normalmente considerato, “fino al settimo passaggio il fenotipo non cambia”, la senescenza cellulare inizia ad aumentare dal terzo passaggio in tripsina. A p3 infatti osserviamo un incremento del $2,15 \pm 0,42$, che aumenta fino a raggiungere un incremento molto marcato a p7 pari a $3,17 \pm 0,99$. Tra p3-p7, infine, abbiamo registrato un incremento di $2,48 \pm 0,99$.

I risultati ottenuti quindi confermano la nostra ipotesi secondo cui le ADSC estratte mediante digestione enzimatica mostrano segni di senescenza già al terzo passaggio in tripsina, con ulteriore incremento nei passaggi superiori a p5.

	p1-p2	p1-p3	p1-p7
M94			1,11
F66			2,60
M64 (a)	0,01		1,22
M64 (b)	0,41	4,00	3,95
	0,38		8,77
F60	-0,21	1,02	1,09
	0,07	3,30	3,37
M51	0,08	1,21	1,27
	0,08	1,23	1,08

Media: 0,12 2,50 3,17
SEM: 0,08 0,42 0,99

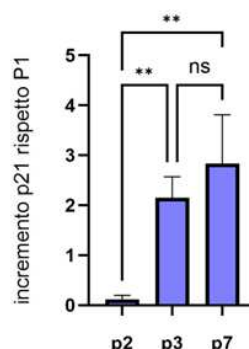


Figura 8C: tabella degli incrementi di p21 a diversi passaggi cellulari (p2, p3, p7) rispetto p1. **Figura 8D:** incremento medio p1-p2, p1-p3, p1-p7. I dati sono mostrati come media $\pm$ SEM. La rilevanza 'analisi statistica è calcolata con One-way ANOVA seguita da Tukey's post-hoc test.

La **Figura 8D** mostra l'incremento medio dei livelli di p21, calcolato sull'insieme dei pazienti ai diversi passaggi in tripsina (p2, p3 e p7), rispetto al primo passaggio in tripsina (p1). I dati, che purtroppo per problemi vari di lisi e/o basso contenuto proteico non abbiamo in tutti i tempi sperimentali per tutti i pazienti, evidenziano come nei primi passaggi l'aumento della senescenza sia contenuto, con un incremento medio a p2 pari a $0,12 \pm 0,08$. Tuttavia, l'incremento di p21 risulta statisticamente significativo ($**p < 0,01$) sia a p3 che a p7. Questo risultato suggerisce una progressiva perdita delle caratteristiche biologiche necessarie per l'espansione cellulare, rendendo le cellule non idonee all'utilizzo clinico e al successivo reimpianto.

Analisi della senescenza nell'MFAT

Per quanto riguarda l'MFAT, nelle tabelle sono riportate le diciture $t=0$ e $t=30$, che indicano i tempi di analisi del tessuto, pre e post coltura. In particolare, $t=0$ corrisponde al tempo iniziale, ovvero il momento in cui il tessuto adiposo è stato posto direttamente in dish senza subire trattamenti di tripsinizzazione, mentre $t=30$ corrisponde al tessuto dopo 30 giorni di coltura in dish.

Nel contesto delle strategie cliniche procedurali in campo rigenerativo, si osserva un progressivo spostamento dall'utilizzo di cellule staminali isolate mediante digestione enzimatica del tessuto adiposo, verso l'impiego diretto di MFAT. Tale approccio si basa sull'ipotesi che la riduzione meccanica del tessuto in piccoli cluster consenta di preservare in larga parte l'architettura tridimensionale originaria, includendo microvasi, componenti della matrice extracellulare e la nicchia stromale (72).

Da ricerche precedenti effettuate presso il laboratorio in cui ho svolto il lavoro di tesi ed altri gruppi di ricerca, è stato osservato che, nonostante la riduzione dimensionale, i cluster di MFAT mantengono elementi strutturali caratteristici del tessuto adiposo integro (73). Questa conservazione strutturale contemporaneamente alla riduzione in microframmenti potrebbe aumentare la superficie disponibile e favorire il rilascio spontaneo di cellule dal tessuto durante la coltura. La persistenza della nicchia stromale e delle strutture microvascolari potrebbe inoltre contribuire al mantenimento di un microambiente parzialmente funzionale, in grado di sostenere nel tempo tale rilascio cellulare.

Precedenti osservazioni del nostro laboratorio (70), avevano già dimostrato che cellule derivate da tessuto adiposo sono in grado di migrare efficacemente da colture tridimensionali in matrice di collagene. Nel presente studio, tuttavia, si è scelto di non utilizzare tale matrice 3D, al fine di evitare complicazioni tecniche nelle fasi successive di estrazione proteica, che risultavano significativamente influenzate dalla presenza del materiale di supporto.

In **Figura 9A** sono riportate le bande relative a GAPDH e p21, ottenute mediante analisi con ChemiDoc relative ai lisati tissutali diversi soggetti studiati ($n=5$). Sono stati analizzati i lisati derivati dal tessuto micronizzato al tempo 0 ($t=0$), corrispondente alla

condizione basale, e dopo 30 giorni di coltura (t=30), periodo necessario per consentire il rilascio e la fuoriuscita delle cellule dal tessuto (ADSC-O).

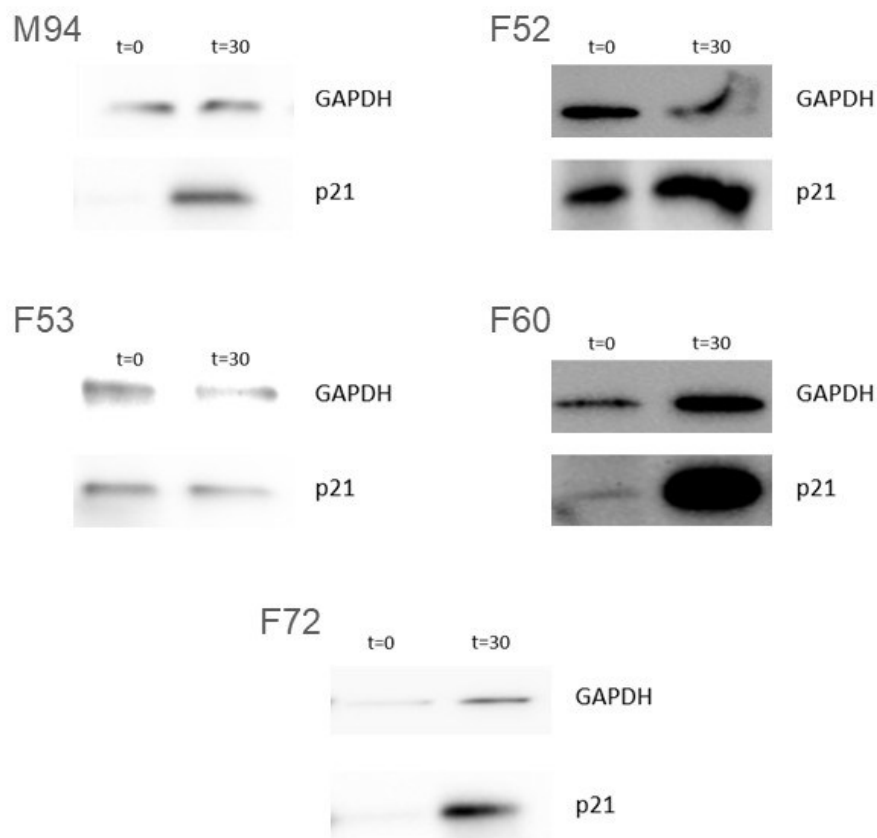


Figura 9A: bande western blot ottenute da 5 pazienti analizzati

In questa tabella (**Figura 9B**) sono riportate le densitometrie delle bande rilevate, normalizzate su GAPDH sia a tempo 0 che a tempo 30 giorni.

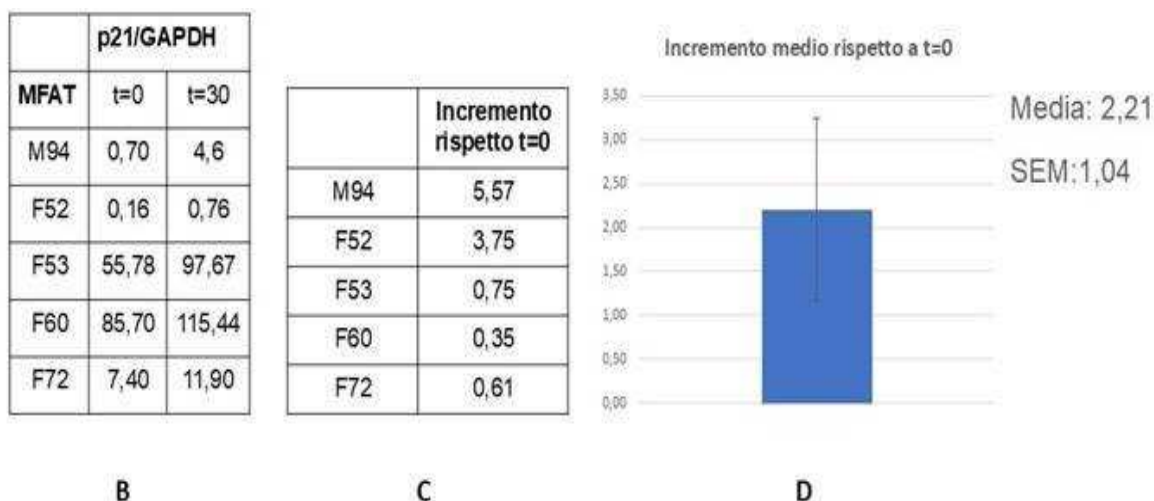


Figura 9B: densitometrie bande rilevate su GAPDH al tempo t=0 e t=30;

Figura 9C: incremento MFAT t=30 giorni;

Figura 9D: grafico dell'incremento di senescenza

Nella **Figura 9C** viene riportato l'incremento di p21: si vede un'elevata variabilità all'interno dei vari campioni, con picchi massimi di 5,57 volte di incremento rispetto al t=0 e campioni con 0,35 volte di incremento sempre rispetto a t=0. La media che abbiamo dei 5 campioni di incremento viene riportata nel grafico in **Figura 9D**. Si nota un marcato incremento di p21, associato a senescenza cellulare, nelle cellule del tessuto adiposo dopo 30 giorni di coltura rispetto al tempo iniziale.

Tale incremento di senescenza dopo 30 giorni di coltura, potrebbe essere attribuito alle condizioni di coltura prolungata *in vitro*, che possono indurre stress cellulare e alterazioni metaboliche per cui, sebbene i risultati mostrino un aumento della senescenza cellulare nel corso del tempo, non è possibile concludere che tale fenomeno rappresenti fedelmente lo stato fisiologico dell'MFAT quando iniettato *in vivo*. È infatti verosimile che il microambiente artificiale della coltura influenzi in maniera sostanziale il profilo senescente osservato.

Le condizioni di coltura adottate potrebbero infatti favorire l'insorgenza di processi di senescenza indipendentemente dalle caratteristiche intrinseche del tessuto. In particolare, il mantenimento dell'MFAT in una coltura statica bidimensionale, priva di un supporto tridimensionale in grado di preservarne l'organizzazione strutturale, potrebbe rappresentare un importante fattore di stress cellulare. A ciò si aggiungono possibili limitazioni nell'apporto di ossigeno e nutrienti. Essendo un tessuto ricco di componente lipidica, l'MFAT tende infatti a galleggiare nel mezzo di coltura, risultando

spesso non completamente immerso. Questa condizione può ostacolare gli scambi metabolici e ridurre l'efficacia della diffusione di ossigeno e nutrienti verso le regioni più profonde del tessuto, favorendo l'instaurarsi di condizioni di sofferenza cellulare che possono culminare nell'attivazione di programmi di senescenza.

L'analisi della senescenza del tessuto adiposo microframmentato mantenuto in coltura è stata considerata un passaggio fondamentale dello studio. L'obiettivo era infatti quello di sviluppare un modello *in vitro* che riproducesse, per quanto possibile, il comportamento del tessuto dopo il suo impianto e durante il processo di rilascio cellulare. Si ipotizzava che tale approccio consentisse di valutare lo stato senescente del tessuto e correlarlo a quello delle cellule che da esso migrano. Tuttavia, i risultati ottenuti suggeriscono che le condizioni di coltura esercitino un impatto significativo sui fenomeni osservati, rendendo difficile stabilire se la senescenza rilevata sia una caratteristica propria dell'MFAT oppure una conseguenza dell'ambiente sperimentale. Pertanto, il modello utilizzato non appare idoneo a fornire una valutazione attendibile della senescenza fisiologica del tessuto adiposo microframmentato quando iniettato *in vivo*, poiché le condizioni *in vitro* sembrano alterarne in modo sostanziale il comportamento biologico.

Nonostante ciò, è importante sottolineare che il tessuto MFAT ha continuato a rilasciare cellule anche dopo 30 giorni di coltura. Questo dato suggerisce che la capacità del tessuto di mantenere attività biologica residua nel tempo non venga completamente meno, supportando l'ipotesi che la sua organizzazione tridimensionale contribuisca alla persistenza di tale funzione.

Come si può vedere dai risultati del capitolo successivo, l'*outgrowth* cellulare dal tessuto appena descritto non solo si dimostra essere continuo nel tempo ma evidenzia anche una ridotta senescenza cellulare se confrontato alle cellule ottenute in seguito a digestione enzimatica.

Analisi della senescenza nelle ADSC-O

Nelle tabelle relative alle ADSC O sono riportati i valori $t=10$ e $t=30$, che indicano i diversi tempi di analisi. In particolare, il tempo $t=10$ si riferisce a 10 giorni dall'arrivo del campione durante il quale il tessuto MFAT è mantenuto in coltura rilasciando cellule ADSC-O, mentre $t=30$ rappresenta le cellule rilasciate dall'MFAT dopo 30 giorni di coltura.

Nella **Figura 10A** vengono riportate le bande di GAPDH e p21, a tempo 10 e 30 acquisite mediante Chemidoc. I tempi effettivi di lisi in realtà sono incrementati dal periodo necessario affinché le cellule ADSC-O raggiungano la confluenza, tempo che varia dai 10 ai 25 giorni.

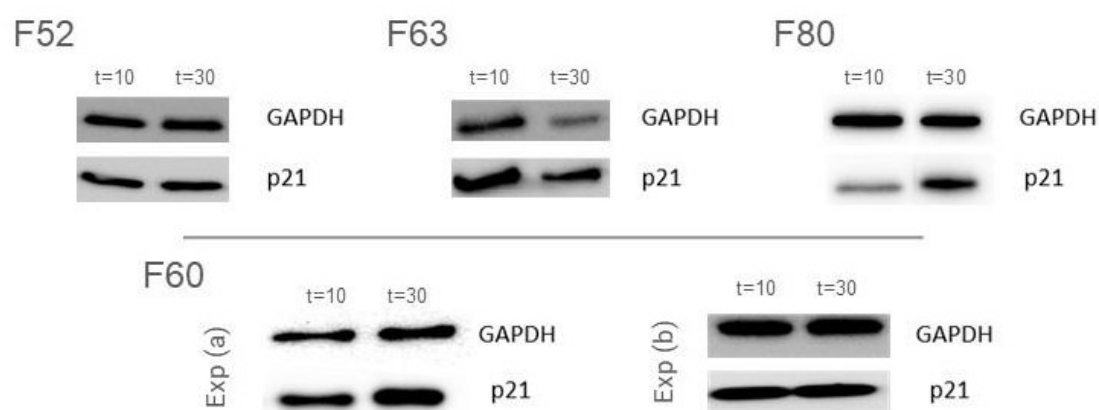


Figura 10A: bande western blot ottenute da 4 pazienti analizzati

Nella tabella rappresentata in **Figura 10B**, vengono riportati i valori delle bande normalizzate su GAPDH, quantificate utilizzando il software Bio-Rad, sia a tempo 10 che a tempo 30 giorni.

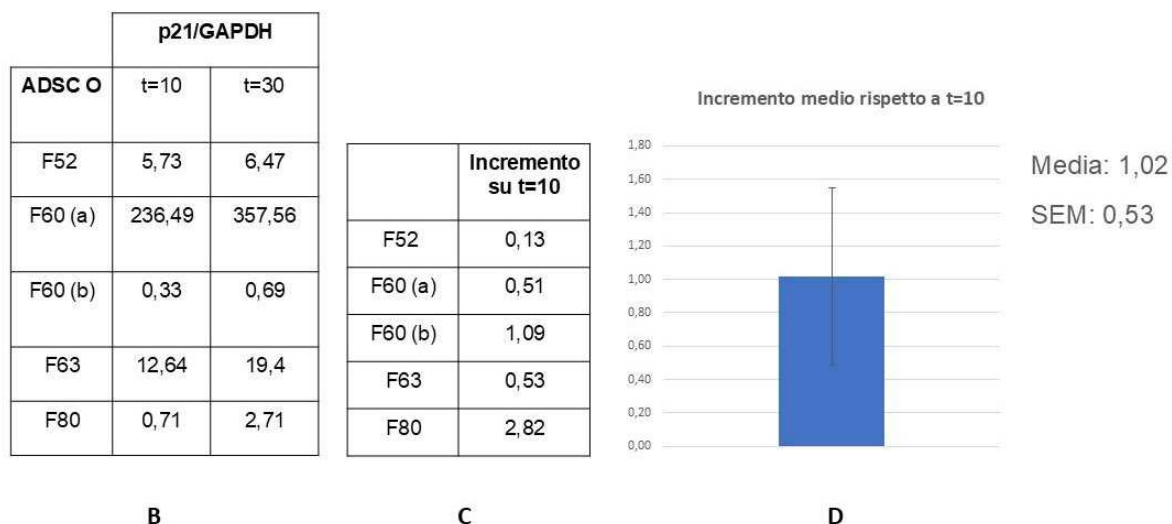


Figura 10B: densitometrie bande rilevate su GAPDH al tempo t=10 e t=30;

Figura 10C: tabella riportante i valori di incremento del t=30 su t=10;

Figura 10D: grafico rappresentate incremento del t=30 su t=10

Nella **Figura 10C** sono riportati gli incrementi di p21 nei singoli campioni rispetto al t=10. I valori mostrano un'elevata variabilità, con incrementi compresi tra 0,13 e 2,82. In particolare, quattro campioni presentano incrementi compresi tra 0,13 e 1,09, mentre il campione F80 mostra un incremento nettamente superiore (2,82), contribuendo in modo rilevante al valore medio complessivo. Tale dispersione è evidenziata anche dal valore di SEM (0,53) riportato in **Figura 10D**

L'analisi dei campioni ha evidenziato, come riportato nel grafico **Figura 10D**, vi sia solo un lieve incremento di p21 associato alla senescenza cellulare nelle cellule isolate dopo 30 giorni di coltura rispetto al tempo iniziale.

Tale incremento della senescenza osservato dopo 30 giorni potrebbe essere attribuito al fatto che le cellule non vengono lisate esattamente dopo 10 o 30 giorni di coltura. Infatti, per ottenere un numero di cellule sufficiente all'esecuzione del western blot, è spesso necessario prolungare ulteriormente il periodo di coltura, dopo la rimozione del grasso microframmentato al tempo preciso indicato, fino al raggiungimento della confluenza. Di conseguenza, il maggiore livello di senescenza rilevato potrebbe riflettere non solo il tempo sperimentale considerato, ma anche l'esposizione prolungata delle cellule alle condizioni di coltura *in vitro*, seppur in assenza di passaggi in tripsina che, possono favorire l'attivazione di processi senescenti.

Sebbene i risultati evidenzino un lieve incremento dei marcatori di senescenza nel tempo, non è possibile stabilire se tale fenomeno si verifichi anche nelle cellule che vengono rilasciate dall'MFAT dopo il suo impianto *in vivo*. Le ADSC analizzate in questo studio, infatti, sono state mantenute per periodi prolungati in condizioni di coltura che non riproducono fedelmente il microambiente fisiologico del tessuto ospite. *In vivo*, le cellule sarebbero esposte a un contesto caratterizzato da interazioni con la matrice extracellulare, segnali provenienti dalle cellule circostanti e un costante apporto di ossigeno e nutrienti, fattori che possono influenzarne significativamente il comportamento biologico. Pertanto, la senescenza rilevata nelle ADSC-O coltivate potrebbe rappresentare, almeno in parte, una conseguenza dell'ambiente sperimentale e non necessariamente una caratteristica intrinseca delle cellule rilasciate dall'MFAT dopo il trapianto.

Dai dati raccolti emerge quindi chiaramente che le cellule isolate mediante digestione enzimatica mostrano un grado di senescenza superiore rispetto alle cellule ottenute tramite metodo di *outgrowth*. Tale evidenza indica che la procedura di isolamento potrebbe rappresentare un fattore in grado di influenzare lo stato fisiologico cellulare, promuovendo processi associati all'invecchiamento cellulare. Le cellule derivate da *outgrowth*, sembrano preservare meglio le proprie caratteristiche proliferative e funzionali, mostrando livelli ridotti di senescenza.

Proseguendo il lavoro svolto, sarebbe interessante introdurre metodiche sperimentali più sensibili al fine di ridurre il numero di cellule necessarie per condurre gli esperimenti riducendo così, i tempi di coltura necessari per raggiungere la quantità di cellule necessarie per tecniche di indagine non sufficientemente sensibili. Infatti, le ADSC-O non sempre raggiungono la confluenza entro il $t=10$, rendendo necessario un prolungamento della coltura ($t=10 + x$), dove x varia tra 11 e 25 giorni a seconda del paziente. Questo, infatti, eviterebbe di prolungare eccessivamente il mantenimento delle colture, limitando possibili alterazioni del fenotipo cellulare e migliorando al contempo l'efficienza e la riproducibilità degli esperimenti. L'adozione di tecniche di rilevazione più sensibili potrebbe quindi consentire l'utilizzo di quantità inferiori di materiale biologico, consentendo analisi complementari, ad esempio l'attività della β -galattosidasi o la proliferazione cellulare, per lo studio di un evento complesso come la senescenza cellulare.

Parallelamente, sarebbe utile integrare i dati derivanti dalle analisi proteiche con metodiche di imaging in fluorescenza, in modo da ottenere una caratterizzazione più completa dei processi biologici studiati. L'associazione tra dati quantitativi e osservazioni morfologiche consentirebbe infatti di correlare le variazioni molecolari con il comportamento cellulare e con la distribuzione spaziale dei marker di interesse. In questo contesto, la colorazione nucleare mediante DAPI, associata a sonde per la marcatura di SA- β -gal, proteina lisosomiale la cui iperattivazione è comunemente associata a senescenza cellulare, ha già mostrato risultati promettenti, permettendo una chiara visualizzazione delle cellule e una migliore valutazione della loro organizzazione all'interno del sistema sperimentale.

Per quanto riguarda l'MFAT, un possibile sviluppo futuro potrebbe consistere nel perfezionamento del modello di studio *in vitro* attraverso la realizzazione di una matrice tridimensionale capace di riprodurre in maniera più fedele il microambiente fisiologico del tessuto adiposo. L'impiego di biomateriali facilmente degradabili o caratterizzati da una maggiore permeabilità favorirebbe la diffusione e la penetrazione degli staining, degli anticorpi e delle sonde fluorescenti utilizzate nelle analisi microscopiche. Questo consentirebbe di sfruttare al meglio le metodiche di fluorescenza già implementate, migliorando la qualità delle immagini e permettendo una valutazione più accurata della vitalità cellulare. Nel complesso, tali miglioramenti potrebbero contribuire alla realizzazione di un modello sperimentale più robusto, riproducibile e rappresentativo delle condizioni fisiologiche *in vivo*.

Analisi dell'attività β -galattosidasi mediante colorazione colorimetrica e fluorimetrica

Al fine di approfondire ulteriormente lo studio del fenotipo di senescenza cellulare osservato, è stata anche valutata l'attività β -galattosidasi associata alla senescenza (SA- β -gal) mediante colorazione istologica in MFAT e cellulare in ADSC. Di seguito vengono riportate immagini rappresentative ottenute dall'analisi dei diversi gruppi sperimentali. Poiché il protocollo risulta ancora in fase di ottimizzazione, i risultati sono presentati esclusivamente a scopo illustrativo e descrittivo.

Nella **Figura 11A** sono messe a confronto le immagini acquisite mediante due diverse tecniche di staining finalizzate alla rilevazione dell'attività β -galattosidasi nell'MFAT. Nella prima riga (**Figura 11A, a**) il tessuto incluso in paraffina, dopo il taglio è sottoposto a saggio colorimetrico x-gal, finora impiegato nel laboratorio in cui ho svolto la tesi. Nella seconda riga (**Figura 11A, b**) invece è riportata l'immagine del tessuto MFAT soggetto a colorazione mediante CellEvent™ Senescence Detection kit (Invitrogen), tecnica fluorimetrica di recente introduzione nel laboratorio ed ancora in fase di ottimizzazione. Tutte le immagini sono state acquisite all'ingrandimento 10x.

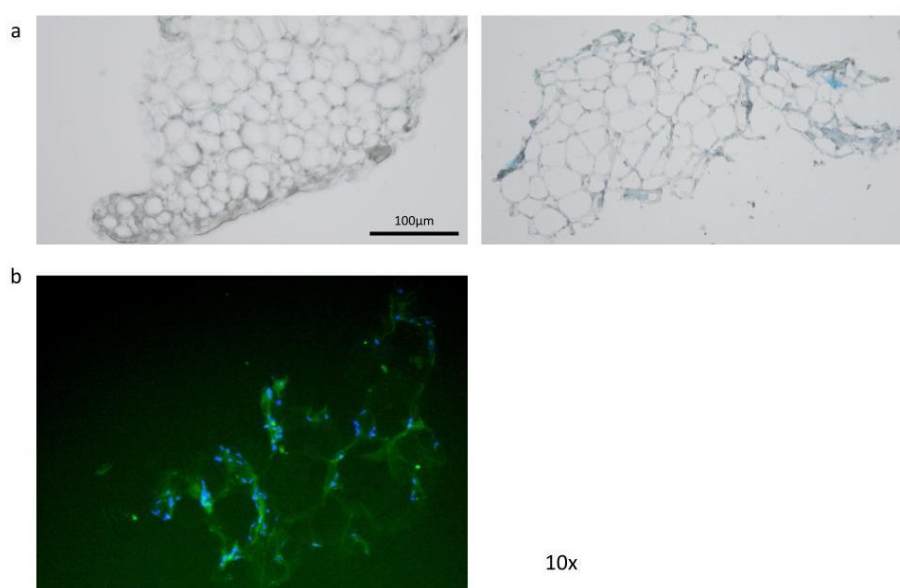


Figura 11A: acquisizioni saggio β -galattosidasi sul MFAT

Nelle due acquisizioni superiori è mostrato l'MFAT al tempo 0 (sinistra) e dopo 30 giorni di coltura (destra). L'acquisizione inferiore mostra invece l'MFAT marcato con la sonda CellEvent Green, per quest'ultima immagine è stato possibile acquisire il campione esclusivamente al tempo 0, poiché la quantità di tessuto disponibile non era sufficiente per l'inclusione in paraffina del campione raccolto dopo 30 giorni di coltura.

Nel campione al tempo 0 il tessuto adiposo presenta una struttura compatta, con adipociti distribuiti in maniera omogenea e caratterizzati da morfologia regolare. Nel campione mantenuto in coltura per 30 giorni gli adipociti risultano ancora riconoscibili,

ma il tessuto appare meno organizzato e più rarefatto. Rispetto al tempo 0 si osserva un aumento degli spazi tra gli adipociti e una minore compattezza generale del campione, con una parziale alterazione dell'architettura tissutale. L'osservazione mediante microscopia a fluorescenza evidenzia la presenza di un segnale verde distribuito in aree circoscritte del campione, associato a nuclei marcati in blu. Tale segnale risulta ben definito e localizzabile a livello cellulare, mentre la microscopia ottica con colorazione istochimica X-Gal consente una migliore visualizzazione dell'architettura complessiva del tessuto adiposo e della distribuzione del segnale nel contesto morfologico, sebbene con una minore risoluzione nella definizione delle singole cellule positive.

Nella **Figura 11B** sono riportate acquisizioni rappresentative delle ADSC ottenute mediante microscopia ottica e microscopia a fluorescenza.

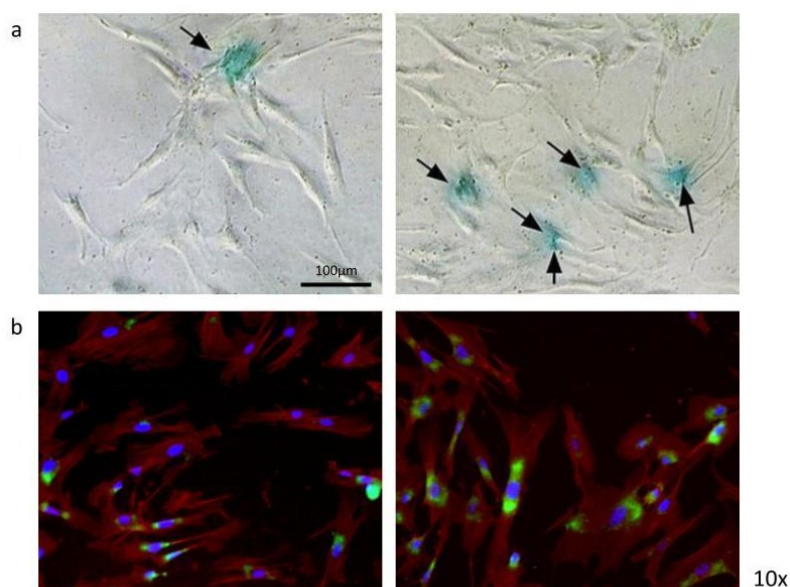


Figura 11B: acquisizioni saggio β -galattosidasi su cellule ADSC

Nelle immagini riportate in alto, sono mostrate le acquisizioni delle ADSC-O ai tempi $t=0$ e $t=30$, ottenute mediante saggio colorimetrico. Al tempo $t=0$ si osserva, come indicato dalla freccia, la presenza di una singola cellula con precipitato verde perinucleare. Al tempo $t=30$ si evidenzia invece un incremento della quantità di precipitato verde, indicativo di un aumento della senescenza cellulare.

Nelle immagini riportate in basso sono mostrate le ADSC analizzate mediante microscopia a fluorescenza, con citoscheletro (actina) marcato in rosso, nuclei in blu e segnale verde, indicativo di senescenza cellulare. Come si osserva, dal tempo $t = 0$ al tempo $t = 30$ si evidenzia un incremento della percentuale di cellule positive al segnale verde, suggerendo un aumento della senescenza nel tempo, risultato che è sovrapponibile al dato precedentemente descritto in campo chiaro.

Nel nostro laboratorio si sta scegliendo di sostituire il saggio colorimetrico SA- β -gal con il corrispondente saggio in fluorescenza; questa decisione è stata motivata dalla maggiore sensibilità e dalla migliore accuratezza quantitativa del metodo fluorescente rispetto alla colorazione cromogenica, la quale consente prevalentemente una valutazione qualitativa o semi-quantitativa basata sulla presenza di un precipitato insolubile. Inoltre, il saggio in fluorescenza richiede tempi sperimentali più corti rispetto al western blot, che prevede un maggior numero di cellule, fasi di estrazione proteica, separazione elettroforetica e trasferimento su membrana, con conseguente allungamento dei tempi complessivi di analisi. Al contrario, il metodo fluorescente permette di ottenere una lettura diretta del segnale in tempi ridotti a partire da campioni cellulari meno processati, rendendo più rapido l'intero flusso sperimentale.

Nonostante i vantaggi in termini di sensibilità e di quantificazione più attendibile più attendibile nel caso delle colture cellulari, nella colorazione del tessuto adiposo la tecnica fluorimetrica presenta comunque alcune limitazioni che devono essere considerate. Nel caso del MFAT, infatti, l'analisi risulta più complessa per via dell'elevata eterogeneità del campione, che è costituito da una matrice tridimensionale di tessuto adiposo con diverse componenti cellulari e stromali. Questa caratteristica può influenzare sia la marcatura sia l'identificazione delle cellule senescenti. Inoltre, la presenza di detriti lipidici e materiale extracellulare può interferire in parte con la lettura del segnale, aumentando la variabilità dei risultati.

Un altro aspetto da considerare riguarda proprio la gestione del campione di MFAT, che può richiedere procedure di processamento istologico come la fissazione e l'inclusione in paraffina. Questi passaggi, se da un lato aiutano a preservare la struttura del tessuto, dall'altro possono in alcuni casi influenzare la rilevazione dell'attività enzimatica della β -galattosidasi e la qualità del segnale fluorescente, con possibili ripercussioni sulla sensibilità complessiva del saggio.

5 CONCLUSIONI

Il presente studio ha confrontato l'effetto dell'isolamento enzimatico e non enzimatico delle ADSC sull'insorgenza della senescenza cellulare durante l'espansione *in vitro*. I risultati hanno mostrato che le ADSC ottenute mediante isolamento enzimatico presentano segni di senescenza già dal terzo passaggio cellulare, evidenziati dall'aumento della positività alla SA- β -galattosidasi e dei livelli di p21. Al contrario, le ADSC isolate con metodica non enzimatica hanno mostrato una minore predisposizione alla senescenza, suggerendo una migliore conservazione delle loro proprietà biologiche.

Nel complesso, i dati ottenuti indicano che il metodo di isolamento influisce significativamente sulla qualità delle ADSC e che l'approccio non enzimatico potrebbe rappresentare una strategia più vantaggiosa per applicazioni di medicina rigenerativa.

I risultati ottenuti rivestono interesse clinico poiché il MFAT rappresenta una promettente strategia di medicina rigenerativa, consentendo il trasferimento diretto di cellule staminali senza necessità di espansione *in vitro*. Tuttavia, i fenomeni di senescenza osservati suggeriscono cautela nella valutazione del suo potenziale terapeutico, poiché non è ancora chiaro se tali alterazioni possano influenzarne l'efficacia *in vivo*. Ulteriori studi saranno quindi necessari per chiarirne le applicazioni cliniche.

Inoltre, sarebbe necessario migliorare l'utilizzo della sonda fluo per il saggio della β -galattosidasi, al fine di ottenere risultati più sensibili e con maggior velocità.

Questa esperienza di tesi ha contribuito alla mia crescita personale e professionale, permettendomi di acquisire maggiore autonomia in laboratorio, consolidare le conoscenze teoriche e sviluppare competenze nell'analisi dei risultati, nell'organizzazione del lavoro e nell'attenzione ai dettagli. Le competenze acquisite rappresentano una solida base per il mio futuro professionale.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Potential [Internet]. [citato 14 giugno 2026]. Disponibile su: <https://journals.physiology.org/doi/epdf/10.1152/physiol.00021.2019>
doi:10.1152/physiol.00021.2019
2. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarte DAD, Huang JI, Mizuno H, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells□D.
3. Wahlmueller M, Narzt MS, Missfeldt K, Arminger V, Krasensky A, Lämmermann I, et al. Establishment of In Vitro Models by Stress-Induced Premature Senescence for Characterizing the Stromal Vascular Niche in Human Adipose Tissue. *Life*. 20 settembre 2022;12(10):1459. doi:10.3390/life12101459
4. Tian Z, Yu T, Liu J, Wang T, Higuchi A. Introduction to stem cells. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2023;199:3–32. doi:10.1016/bs.pmbts.2023.02.012 PubMed PMID: 37678976.
5. Peura TT, Bosman A, Stojanov T. Derivation of human embryonic stem cell lines. *Theriogenology*. 1 gennaio 2007;IETS 2007 Pre-Conference Symposia67(1):32–42. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.031
6. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 6 novembre 1998;282(5391):1145–7. doi:10.1126/science.282.5391.1145
7. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules*. 25 maggio 2012;17(6):6196–236. doi:10.3390/molecules17066196
8. Aboul-Soud MAM, Alzahrani AJ, Mahmoud A. Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)—Roles in Regenerative Therapies, Disease Modelling and Drug Screening. *Cells*. 5 settembre 2021;10(9):2319. doi:10.3390/cells10092319
9. Bilic J, Belmonte JCI. Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells: Close Enough or Yet Too Far Apart? *STEM CELLS*. gennaio 2012;30(1):33–41. doi:10.1002/stem.700
10. Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell*. giugno 2012;10(6):678–84. doi:10.1016/j.stem.2012.05.005
11. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*. 7 novembre 2008;322(5903):949–53. doi:10.1126/science.1164270
12. Galderisi U, Peluso G, Di Bernardo G. Clinical Trials Based on Mesenchymal Stromal Cells are Exponentially Increasing: Where are We in Recent Years? *Stem Cell Rev Rep*. gennaio 2022;18(1):23–36. doi:10.1007/s12015-021-10231-w
13. Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal Stem Cells: A Friend or Foe in Immune-Mediated Diseases.

14. Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*. aprile 2016;99:62–8. doi:10.1016/j.ymeth.2015.09.016
15. Su H, Chau H, Li Q, Xiao F, Sun Y, Chen J, et al. Bridging the gap: clinical translation of adipose-derived stem cells - a scoping review of clinical trials. *Stem Cell Res Ther*. 7 giugno 2025;16(1):288. doi:10.1186/s13287-025-04405-3
16. Si Z, Wang X, Sun C, Kang Y, Xu J, Wang X, et al. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed Pharmacother*. giugno 2019;114:108765. doi:10.1016/j.biopha.2019.108765
17. Jing W, Xiao J, Xiong Z, Yang X, Huang Y, Zhou M, et al. Explant Culture: An Efficient Method to Isolate Adipose-Derived Stromal Cells for Tissue Engineering. *Artif Organs*. 2011;35(2):105–12. doi:10.1111/j.1525-1594.2010.01054.x
18. Ceccarelli S, Pontecorvi P, Anastasiadou E, Napoli C, Marchese C. Immunomodulatory Effect of Adipose-Derived Stem Cells: The Cutting Edge of Clinical Application. *Front Cell Dev Biol*. 17 aprile 2020;8:236. doi:10.3389/fcell.2020.00236
19. Zhao L, Johnson T, Liu D. Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases. *Stem Cell Res Ther*. dicembre 2017;8(1):125. doi:10.1186/s13287-017-0578-2
20. Hong P, Yang H, Wu Y, Li K, Tang Z. The functions and clinical application potential of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells: a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther*. dicembre 2019;10(1):242. doi:10.1186/s13287-019-1358-y
21. Xining Z, Sai L. The Evolving Function of Vasculature and Pro-angiogenic Therapy in Fat Grafting. *Cell Transplant*. gennaio 2024;33:09636897241264976. doi:10.1177/09636897241264976
22. Schneider I, Calcagni M, Buschmann J. Adipose-derived stem cells applied in skin diseases, wound healing and skin defects: a review. *Cytherapy*. febbraio 2023;25(2):105–19. doi:10.1016/j.jcyt.2022.08.005
23. Qin Y, Ge G, Yang P, Wang L, Qiao Y, Pan G, et al. An Update on Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine: Where Challenge Meets Opportunity. *Adv Sci*. luglio 2023;10(20):2207334. doi:10.1002/advs.202207334
24. Yan W, Xia Y, Zhao H, Xu X, Ma X, Tao L. Stem cell-based therapy in cardiac repair after myocardial infarction: Promise, challenges, and future directions. *J Mol Cell Cardiol*. 1 marzo 2024;188:1–14. doi:10.1016/j.yjmcc.2023.12.009 PubMed PMID: 38246086.
25. Widgerow AD, Salibian AA, Lalezari S, Evans GRD. Neuromodulatory nerve regeneration: Adipose tissue-derived stem cells and neurotrophic mediation in peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Res*. dicembre 2013;91(12):1517–24. doi:10.1002/jnr.23284
26. Fizzah Arif, Mohammad Fazlur Rahman, Ceemal Fareed Khan. Adipose derived stem cells for the peripheral nerve regeneration: review of techniques and clinical

implications. *J Pak Med Assoc.* 25 gennaio 2023;73(2):S148–54. doi:10.47391/JPMA.AKUS-24

27. Qin Y, Ge G, Yang P, Wang L, Qiao Y, Pan G, et al. An Update on Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine: Where Challenge Meets Opportunity. *Adv Sci.* 10 maggio 2023;10(20):2207334. doi:10.1002/adv.202207334 PubMed PMID: 37162248; PubMed Central PMCID: PMC10369252.

28. Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell.* giugno 2018;22(6):824–33. doi:10.1016/j.stem.2018.05.004

29. Mullen M, Nelson AL, Goff A, Billings J, Kloser H, Huard C, et al. Fisetin Attenuates Cellular Senescence Accumulation During Culture Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 14 luglio 2023;41(7):698–710. doi:10.1093/stmcls/sxad036

30. Ong WK, Chakraborty S, Sugii S. Adipose Tissue: Understanding the Heterogeneity of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Biomolecules.* 22 giugno 2021;11(7):918. doi:10.3390/biom11070918

31. Mazini L, Rochette L, Admou B, Amal S, Malka G. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 14 febbraio 2020;21(4):1306. doi:10.3390/ijms21041306

32. Foti R, Storti G, Palmesano M, Scioli MG, Fiorelli E, Terriaca S, et al. Senescence in Adipose-Derived Stem Cells: Biological Mechanisms and Therapeutic Challenges. *Int J Mol Sci.* 1 agosto 2024;25(15):8390. doi:10.3390/ijms25158390

33. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell.* giugno 2013;153(6):1194–217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039

34. Roger L, Tomas F, Gire V. Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *Int J Mol Sci.* 6 dicembre 2021;22(23):13173. doi:10.3390/ijms222313173

35. d'Adda Di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer.* luglio 2008;8(7):512–22. doi:10.1038/nrc2440

36. Li Y, Wu Q, Wang Y, Li L, Bu H, Bao J. Senescence of mesenchymal stem cells (Review). *Int J Mol Med.* 1 aprile 2017;39(4):775–82. doi:10.3892/ijmm.2017.2912

37. Yamashita S, Ogawa K, Ikei T, Udono M, Fujiki T, Katakura Y. SIRT1 prevents replicative senescence of normal human umbilical cord fibroblast through potentiating the transcription of human telomerase reverse transcriptase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* gennaio 2012;417(1):630–4. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.021

38. Chapman J, Fielder E, Passos JF. Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Lett.* 2019;593(13):1566–79. doi:10.1002/1873-3468.13498

39. West AP, Shadel GS. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nat Rev Immunol.* giugno 2017;17(6):363–75. doi:10.1038/nri.2017.21

40. Bitencourt TC, Vargas JE, Silva AO, Fraga LR, Filippi-Chiela E. Subcellular structure, heterogeneity, and plasticity of senescent cells. *Aging Cell*. aprile 2024;23(4):e14154. doi:10.1111/ace1.14154
41. Miwa S, Kashyap S, Chini E, Von Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *J Clin Invest*. 1 luglio 2022;132(13):e158447. doi:10.1172/JCI158447
42. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 1 giugno 2018;28(6):436–53. doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001 PubMed PMID: 29477613.
43. Hebishy M, Shintouo CM, Dufait I, Debacq-Chainiaux F, Bautmans I, Njemini R. Heat shock proteins and cellular senescence in humans: A systematic review. *Arch Gerontol Geriatr*. ottobre 2023;113:105057. doi:10.1016/j.archger.2023.105057
44. Averill-Bates D. Reactive oxygen species and cell signaling. Review. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. febbraio 2024;1871(2):119573. doi:10.1016/j.bbamcr.2023.119573
45. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*. 2006;5(2):187–95. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x
46. Wang AS, Dreesen O. Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Front Genet*. 23 agosto 2018;9:247. doi:10.3389/fgene.2018.00247
47. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 1 dicembre 2009;4(12):1798–806. doi:10.1038/nprot.2009.191
48. Huang Y, Corbley MJ, Tang Z, Yang L, Peng Y, Zhang ZY, et al. Down-regulation of p21WAF1 promotes apoptosis in senescent human fibroblasts: Involvement of retinoblastoma protein phosphorylation and delay of cellular aging. *J Cell Physiol*. dicembre 2004;201(3):483–91. doi:10.1002/jcp.20125
49. Shibata KR, Aoyama T, Shima Y, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, et al. Expression of the p16INK4A Gene Is Associated Closely with Senescence of Human Mesenchymal Stem Cells and Is Potentially Silenced by DNA Methylation During In Vitro Expansion. *Stem Cells*. 1 settembre 2007;25(9):2371–82. doi:10.1634/stemcells.2007-0225
50. Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*. luglio 2017;21:21–8. doi:10.1016/j.ebiom.2017.04.013
51. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. ottobre 2019;179(4):813–27. doi:10.1016/j.cell.2019.10.005
52. Antria. A Phase II Double-blind, Randomized, Study to Assess the Efficacy of Facial Fat Grafts Supplemented With Autologous, Adipose Derived Stromal Vascular Fraction (SVF) [Clinical trial registration] [Internet]. *clinicaltrials.gov*; febbraio 2019

[citato 14 giugno 2026]. Clinical trial registration no.: NCT02526576. Disponibile su: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02526576>

53. UnicoCell Biomed CO. LTD. A Phase I/II Study to Evaluate the Safety and Efficacy of the Allogeneic Injection of Expanded Adipose-derived Stem Cells to Patients With Knee Osteoarthritis [Clinical trial registration] [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/study/NCT02784964); luglio 2021 [citato 14 giugno 2026]. Clinical trial registration no.: NCT02784964. Disponibile su: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02784964>

54. University of Aarhus. Identification of Molecular Differences of Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Between Non- Responders and Responders in Treatment of Transssphincteric Perianal Fistulas Using Autologous Fat Graft Injection [Clinical trial registration] [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/study/NCT04834609); aprile 2021 [citato 14 giugno 2026]. Clinical trial registration no.: NCT04834609. Disponibile su: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04834609>

55. Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus. Fertility Restoration Using Autologous Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells [Clinical trial registration] [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/study/NCT04432467); dicembre 2021 [citato 14 giugno 2026]. Clinical trial registration no.: NCT04432467. Disponibile su: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04432467>

56. Wang J, Zhang M, Wang H. Emerging Landscape of Mesenchymal Stem Cell Senescence Mechanisms and Implications on Therapeutic Strategies. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 9 agosto 2024;7(8):2306–25. doi:10.1021/acspsci.4c00284

57. Li K, Shi G, Lei X, Huang Y, Li X, Bai L, et al. Age-related alteration in characteristics, function, and transcription features of ADSCs. *Stem Cell Res Ther*. dicembre 2021;12(1):473. doi:10.1186/s13287-021-02509-0

58. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*. dicembre 2014;12(1):8. doi:10.1186/1479-5876-12-8

59. Ye X, Liao C, Liu G, Xu Y, Tan J, Song Z. Age-Related Changes in the Regenerative Potential of Adipose-Derived Stem Cells Isolated from the Prominent Fat Pads in Human Lower Eyelids. Kerkis I, curatore. *PLOS ONE*. 17 novembre 2016;11(11):e0166590. doi:10.1371/journal.pone.0166590

60. Klomjit N, Conley SM, Zhu XY, Sadiq IM, Libai Y, Krier JD, et al. Effects of obesity on reparative function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on ischemic murine kidneys. *Int J Obes*. giugno 2022;46(6):1222–33. doi:10.1038/s41366-022-01103-5

61. Shin L, Peterson DA. Impaired Therapeutic Capacity of Autologous Stem Cells in a Model of Type 2 Diabetes. *Stem Cells Transl Med*. 1 febbraio 2012;1(2):125–35. doi:10.5966/sctm.2012-0031

62. Vikraman A, Ravi L, Kandasamy N, Dhanasekaran A. Melatonin and Coenzyme Q10 mitigate Senescence in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by Restoring Mitophagy and Mitochondrial Proteostasis. Farooqi HMU, curatore. *PLOS One*. 29 aprile 2026;21(4):e0347781. doi:10.1371/journal.pone.0347781

63. Vikraman A, Ravi L, Kandasamy N, Dhanasekaran A. Melatonin and Coenzyme Q10 mitigate Senescence in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by Restoring Mitophagy and Mitochondrial Proteostasis. Farooqi HMO, curatore. PLOS One. 29 aprile 2026;21(4):e0347781. doi:10.1371/journal.pone.0347781
64. Liao N, Shi Y, Zhang C, Zheng Y, Wang Y, Zhao B, et al. Antioxidants inhibit cell senescence and preserve stemness of adipose tissue-derived stem cells by reducing ROS generation during long-term in vitro expansion. Stem Cell Res Ther. dicembre 2019;10(1):306. doi:10.1186/s13287-019-1404-9
65. Yang X, Zhang S, Lu J, Chen X, Zheng T, He R, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes in skeletal diseases. Front Mol Biosci. 6 giugno 2024;11:1268019. doi:10.3389/fmolb.2024.1268019
66. Saliev T, Singh PB. Targeting Senescence: A Review of Senolytics and Senomorphics in Anti-Aging Interventions. Biomolecules. 13 giugno 2025;15(6):860. doi:10.3390/biom15060860
67. Hickson LJ, Langhi Prata LGP, Bobart SA, Evans TK, Giorgadze N, Hashmi SK, et al. Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. EBioMedicine. settembre 2019;47:446–56. doi:10.1016/j.ebiom.2019.08.069
68. Hickson LJ, Langhi Prata LGP, Bobart SA, Evans TK, Giorgadze N, Hashmi SK, et al. Corrigendum to ‘Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease’ EBioMedicine 47 (2019) 446–456. EBioMedicine. febbraio 2020;52:102595. doi:10.1016/j.ebiom.2019.12.004
69. Alum E, Izah S, Uti D, Ugwu O, Betiang P, Basajja M, et al. Targeting Cellular Senescence for Healthy Aging: Advances in Senolytics and Senomorphics. Drug Des Devel Ther. settembre 2025;Volume 19:8489–522. doi:10.2147/DDDT.S543211
70. Castiglioni B, Leigheb M, Bosetti M. Adipose derived stem cells versus micro-fragmented adipose tissue in cartilage tissue regeneration and repair. Gazzetta Medica Ital Arch Sci Mediche. febbraio 2024;182(12). doi:10.23736/S0393-3660.23.05381-0
71. Bianchi F, Maioli M, Leonardi E, Olivi E, Pasquinelli G, Valente S, et al. A New Nonenzymatic Method and Device to Obtain a Fat Tissue Derivative Highly Enriched in Pericyte-Like Elements by Mild Mechanical Forces From Human Lipoaspirates. Cell Transplant. 1 novembre 2013;22. doi:10.3727/096368912X657855
72. Vezzani B, Shaw I, Lesme H, Yong L, Khan N, Tremolada C, et al. Higher Pericyte Content and Secretory Activity of Microfragmented Human Adipose Tissue Compared to Enzymatically Derived Stromal Vascular Fraction. Stem Cells Transl Med. 1 dicembre 2018;7(12):876–86. doi:10.1002/sctm.18-0051
73. Al Sammarraie SHA, Alessio N, Aprile D, Castiglioni B, Squillaro T, Bosetti M, et al. Molecular and Cellular Analysis of Lipogems-Processed Lipoaspirates for Evaluating the Efficacy of Treatments in Regenerative Medicine. Stem Cell Rev Rep. luglio 2026;22(5):2405–18. doi:10.1007/s12015-026-11094-9

RINGRAZIAMENTI

Giunti alla conclusione di questo elaborato di tesi, desidero ringraziare le persone che hanno condiviso con me questo percorso, offrendomi consigli, sostegno e aiuto costante.

Desidero innanzitutto ringraziare la Professoressa Michela Bosetti per avermi dato la possibilità di svolgere la tesi presso il suo laboratorio e per la costante disponibilità nel fornirmi consigli e nel condividere il suo sapere.

Ringrazio la Dottoressa Marica Imbimbo per avermi sostenuta durante questo percorso, per avermi trasmesso la sua passione e per essere stata, oltre che un'insegnante, anche un punto di riferimento umano e professionale.

Ringrazio Samuele, con il quale ho iniziato il percorso di tesi, per aver creduto in me più di quanto io stessa abbia fatto e per avermi sempre spronata a non mollare.

Desidero esprimere la mia più sincera gratitudine alla mia famiglia, che con il suo affetto, il sostegno costante e la fiducia riposta in me mi ha accompagnato durante tutto il mio percorso di studi. Il loro incoraggiamento è stato fondamentale per raggiungere questo traguardo.

Un sentito ringraziamento va anche ai miei amici, che con la loro vicinanza, il supporto e i momenti di condivisione hanno reso questo percorso più sereno e stimolante. La loro presenza è stata un prezioso punto di riferimento nei momenti di difficoltà e di soddisfazione.

A tutti loro va il mio più profondo grazie per aver contribuito, ciascuno a modo proprio, alla realizzazione di questo importante obiettivo.