

# **PROGETTO BRIGHT NIGHT 2022-2023**

**Titolo:**

**“ALLA SCOPERTA  
DEGLI ESOSOMI”**

**INCONTRO CON IL RICERCATORE  
LORENZO CECCARELLI**

**CLASSE 5BSA LICEO DELLE SCIENZE APPLICATE CHINI-MICHELANGELO (SEDE FORTE DEI MARMI – LU).**

**LAVORO DEGLI STUDENTI: *BALDI SOFIA, CERAGIOLI FRANCESCO, CIAMBELLI JONATHAN, CROTT SIDNEY, DEL GIUDICE MARTINA, FABBRICIANI DANTE, GUIDI ANDREA, MAZZEI IRENE, MINIERI LORENZO, PEDRINZANI DANIEL, QUINTAVALLE STEFANO, RUGGIERO FLAVIO, SACHELLI LEONARDO, VITI TOMMASO.***

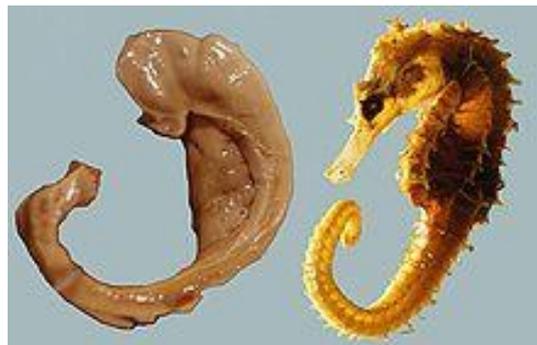
**INSEGNANTE DELLA CLASSE: *SIMONETTA GALLENI.***

Attraverso il progetto BRIGHT NIGHT abbiamo avuto modo di ospitare nel laboratorio del nostro liceo il ricercatore Lorenzo Ceccarelli, che è laureato in Biotecnologie Molecolari ed ha appena finito il percorso di dottorato in Biochimica e Biologia Molecolare. Egli attualmente lavora presso il Dipartimento di Farmacia dell'Università di Pisa, in quanto ha vinto un concorso come biotecnologo di ricerca.

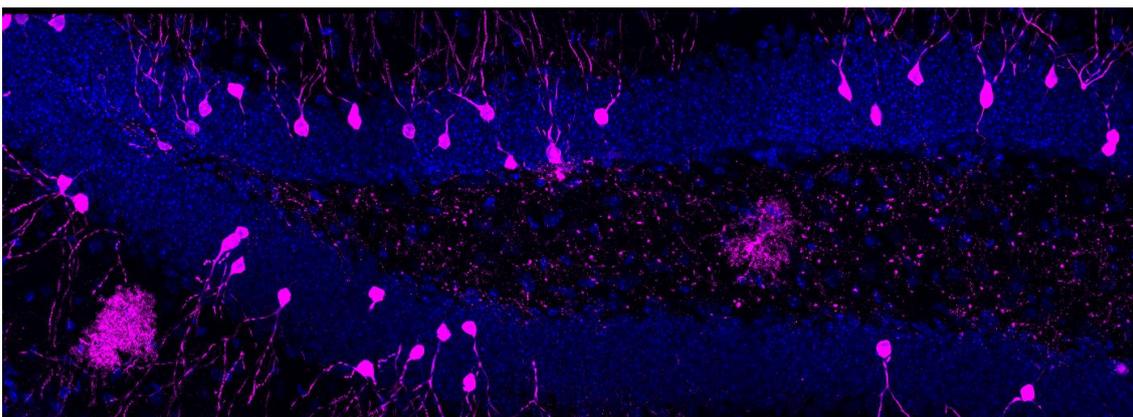
Il ricercatore ci ha spiegato che nel laboratorio nel quale svolge la sua attività (riguardante l'indagine sulle malattie neurodegenerative ed i tumori associati al sistema nervoso), è necessario preparare colture cellulari e lavorare in condizioni di sterilità completa, realizzabile grazie all'utilizzo di apposite cappe.

La ricerca si basa prevalentemente sulle cellule della microglia, che appartengono al sistema nervoso centrale e fanno parte del sistema immunitario. Esse riescono a regolare il processo di infiammazione e quello dell'uscita dall'infiammazione, che è una condizione fondamentale per il benessere generale delle cellule neuronali. Un'infiammazione cronica, infatti, potrebbe portare ad una serie di danni, che sono correlati alle malattie neurodegenerative.

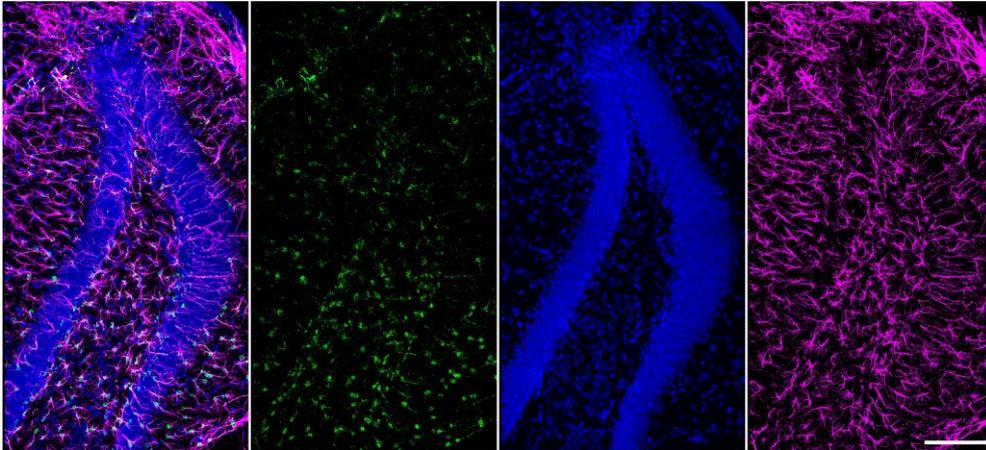
Ci è stata mostrata un'immagine di una porzione dell'ippocampo (così chiamato per la somiglianza con un cavalluccio marino), che rappresenta una zona di neurogenesi ed ha un importante ruolo nella formazione e nel consolidamento dei ricordi.



Nell'immagine seguente si vedono i neuroni che si stanno sviluppando a partire dalle cellule staminali. Per mettere in evidenza selettivamente questo tipo di neuroni, sono state utilizzate tecniche di immunofluorescenza, che prevedono l'uso di anticorpi primari specifici per molecole espresse solo da questo specifico tipo di cellule. A ciò segue l'immissione di altri anticorpi secondari, che portano un sistema di rilevamento (che si colora in rosa, se eccitato da un particolare tipo di luce). Questi ultimi anticorpi si vanno a legare ai precedenti. In tal modo, si mettono in risalto soltanto i neuroni che si stanno sviluppando, essendo gli unici ad esprimere le proteine specifiche riconosciute dagli anticorpi primari.



Con altri tipi di colorazione (che mettono in evidenza con il colore blu tutti i nuclei, con quello verde i nuclei precursori ed con quello rosa gli astrociti) ci è stato mostrato che nella stessa zona dell'ippocampo sono presenti moltissimi astrociti, cellule con molte diramazioni che supportano i neuroni.

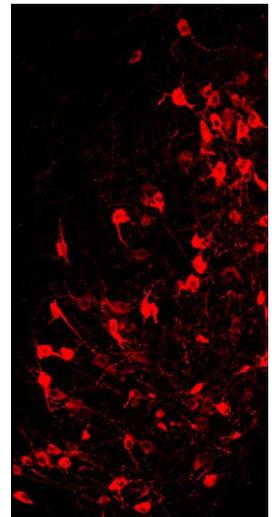


È stato anche sottolineato che non tutti i tipi di tessuto possiedono lo stesso tipo di cellule.

In particolare, nel prosencefalo basale sono presenti grandi neuroni colinergici (nella figura accanto), dotati di lunghi assoni che arrivano fino all'ippocampo. Questa zona, a differenza dell'ippocampo, non evidenzia la presenza di astrociti.

Pertanto, ogni distretto del cervello possiede cellule specifiche sulla base delle funzioni che deve svolgere.

### Neuroni Colinergici



La microglia, invece, si trova ovunque nel cervello. Si tratta di cellule che possono spostarsi a grandi distanze, per raggiungere determinati punti nei quali si è verificato un danno, in modo da ripristinare uno stato di benessere. Sono cellule del sistema immunitario che operano una vigilanza completa, non solo per contrastare le infezioni causate dai virus o dai batteri, ma anche per riparare le alterazioni dovute a traumi, oppure alla rottura di assoni. Possono intervenire, persino, nelle fasi precoci dell'insorgenza di un tumore, per debellarlo. Le cellule della microglia, raggiunto il punto di intervento, possono agire in tre modi:

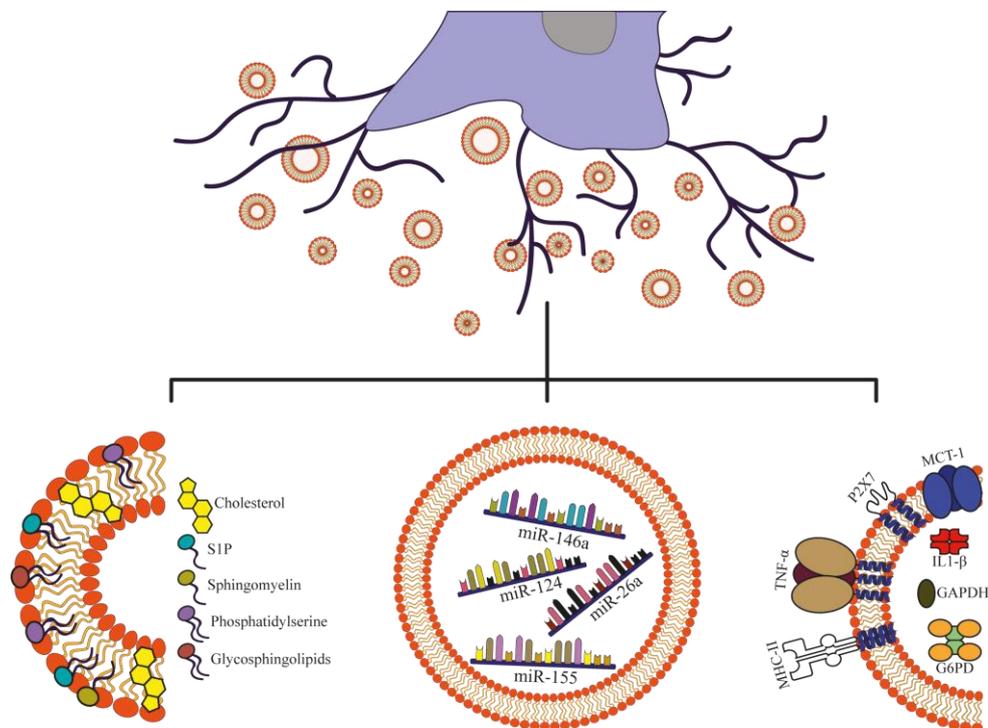
- 1) Propagare l'infiammazione;
- 2) Combattere l'infiammazione;
- 3) Mantenere uno stato di omeostasi, che è alla base del benessere generale delle cellule neuronali.

La microglia riesce a propagare i corretti messaggi mediante vescicole che vengono fatte fuoriuscire dalla cellula e che contengono particolari segnali, i quali vengono trasferiti alle cellule circostanti.

## GLI ESOSOMI

Tra i vari tipi di vescicole extracellulari esistenti, il ricercatore Ceccarelli si occupa specificamente dello studio degli esosomi. Si tratta di minuscole vescicole (diametro di 30-250 nm) prodotte da tutti i tipi cellulari e (mediante segnali localizzati sia sulla loro superficie, sia nel loro lume), causano una risposta nelle cellule riceventi, le quali inglobano questi esosomi. Si ottengono risposte diverse in base al contenuto degli esosomi. Le vescicole, infatti, hanno diversa composizione a seconda dallo stato in cui si trovano le cellule che le producono. Le vescicole che vengono prodotte da cellule della microglia infiammata, contengono sostanze che propagano l'infiammazione. Quelle prodotte da cellule della microglia non infiammata, possiedono sostanze che contrastano l'infiammazione. Il ricercatore ci ha spiegato che dall'analisi del contenuto degli esosomi si può capire se la cellula che li ha prodotti è infiammata o no.

Gli esosomi sono talmente piccoli (in media 100-150 nm) che per visualizzarli sono necessari microscopi elettronici (che utilizzano fasci di elettroni, al posto della luce). Date le minuscole dimensioni, all'interno delle vescicole possono entrare solo poche e piccole molecole (circa 20-30 molecole).



Queste piccole vescicole sono formate da una membrana fosfolipidica, che può essere arricchita da alcuni tipi di lipidi, rispetto a quella di una normale membrana. Nel ristretto lume interno possono essere presenti dei micro-RNA (lunghezza 20-30 nucleotidi) che sono in grado di modificare l'espressione genica, quando si trasferiscono all'interno delle cellule riceventi. Gli esosomi possiedono alcune proteine sia nel lume, sia sulla propria superficie. Le proteine presenti in superficie sono particolarmente interessanti, in quanto permettono l'interazione solo con particolari tipi di cellule, che presentano, a loro volta, specifiche proteine (interazione ligando-recettore), in modo tale che quel tipo di esosoma venga inglobato esclusivamente all'interno di tali cellule.

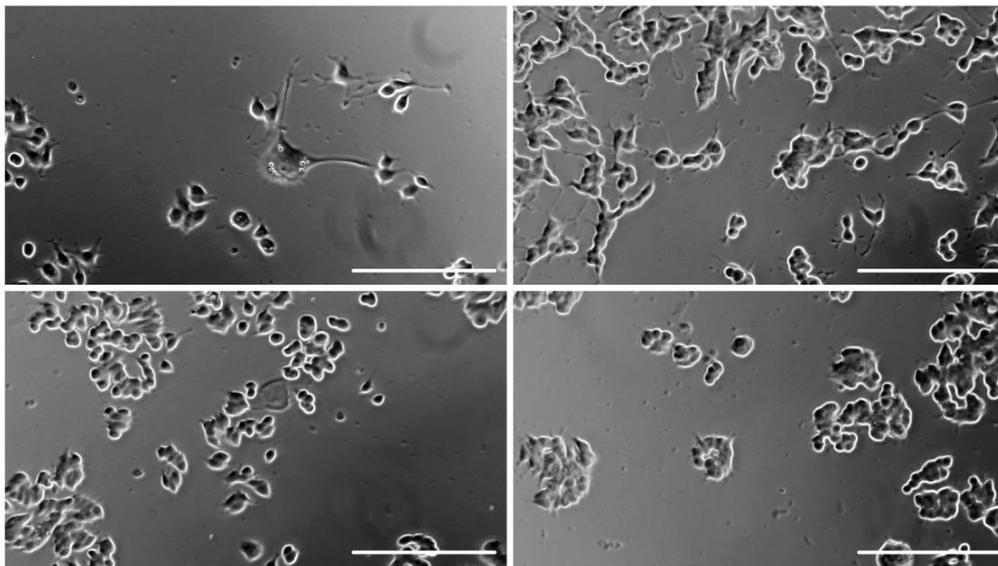
La ricerca di Lorenzo Ceccarelli riguarda lo spostamento dell'equilibrio tra una microglia infiammata e una microglia omeostatica. Lo scopo non è quello di eliminare totalmente l'infiammazione, perché essa permette l'attivazione di tutta una serie di segnali utili per risolvere

un problema momentaneo. Però, quando l'infiammazione diventa cronica non può risolversi; si instaura, così, una situazione patologica, come accade nelle malattie neurodegenerative. Lo scopo della ricerca è quello di rimuovere il più possibile lo stato di infiammazione cronica.

Per fare tutto ciò, è necessario preparare delle colture cellulari. Il ricercatore ci ha spiegato che in commercio sono disponibili delle linee di cellule modificate (mediante le tecniche dell'ingegneria genetica), che sono in grado di sopravvivere all'interno di un supporto e di riprodursi praticamente all'infinito, ma senza perdere le caratteristiche della cellula iniziale (cioè senza tornare allo stadio di fibroblasti). Una volta che queste cellule sono state "piastrate" e "seminate", per potersi moltiplicare, vanno poste in un incubatore che le mantenga ad una temperatura di circa 37°C e in un'atmosfera di diossido di carbonio al 5% (condizioni simili a quelle delle cellule che sono nel corpo umano).



In realtà, le cellule che vengono utilizzate non sono cellule neuronali, bensì cellule del surrene di ratto, alle quali viene somministrato l'N.G.F., molecola in grado di farle trasformare in neuroni. Si opera in questo modo, perché i neuroni (essendo cellule differenziate a termine) non si potrebbero riprodurre in coltura.

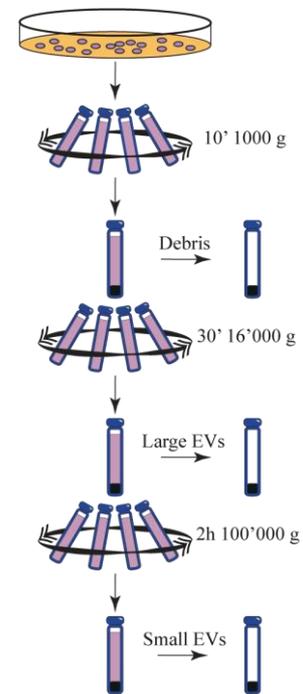


Dalle colture dei neuroni (derivati dalle cellule del surrene di ratto) è possibile ottenere gli esosomi, che si trovano nel liquido di coltura.

Come già detto, però, gli esosomi sono estremamente piccoli, pertanto non è possibile separarli per filtrazione e neppure utilizzando una normale centrifuga.

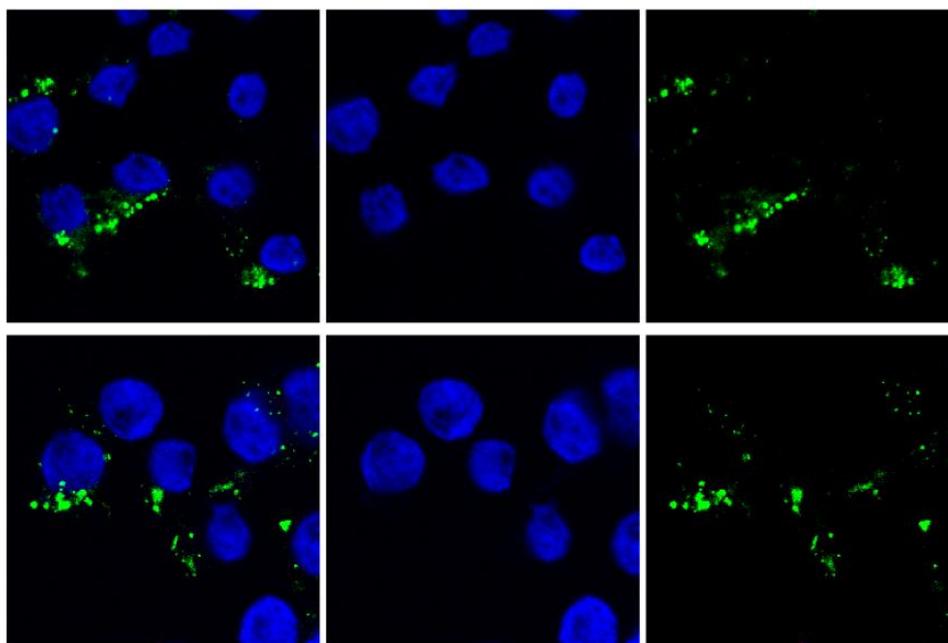
Pertanto, si utilizza un'ultracentrifuga, capace di produrre una forza 100.000 volte maggiore rispetto alla gravità terrestre.

Questo tipo di centrifuga ha bisogno di particolari provette (che ci sono state mostrate), le quali riescono a sopportare questa imponente forza.



Gli esosomi estratti vengono, poi, colorati e mandati verso le cellule per vedere in che modo vengono inglobati.

Ci sono state mostrate immagini che evidenziano questo processo di inglobamento degli esosomi in alcune cellule. Nella figura seguente si vedono in blu i nuclei delle cellule ed in verde gli esosomi, che sono entrati nel citoplasma delle cellule (il citoplasma non ha colorazione).



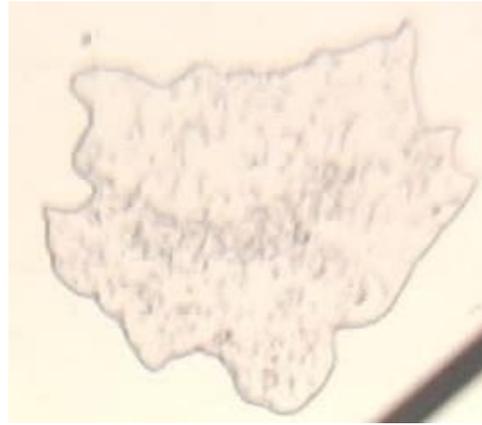
## UTILIZZO DEGLI ESOSOMI

Gli esosomi possono essere caricati al loro interno con molecole che agiscono da farmaco (anche farmaci ad RNA). Spesso gli esosomi vanno anche modificati nella loro parte superficiale, in maniera tale da farli interagire proprio con il tipo cellulare di interesse (sempre tenendo conto dell'interazione ligando-recettore).

Inoltre, gli esosomi possono essere usati come strumento diagnostico studiandone il contenuto, che può dare informazioni circa lo stato della cellula che li ha prodotti. Le cellule malate, infatti, producono esosomi con sostanze specifiche.

Al termine della lezione, il ricercatore ci ha permesso di esaminare al microscopio due dei suoi vetrini, che contenevano due tipologie di cellule differenti. Dopo averle esaminate accuratamente, le abbiamo fotografate ponendo il cellulare sull'obiettivo di un microscopio della nostra scuola:

-nel primo vetrino era presente una cellula, nella quale (in base a quanto spiegato dal ricercatore) il DNA può essere modificato in vario modo, allo scopo di far esprimere una determinata proteina di interesse.



-nel secondo vetrino erano presenti alcune cellule tumorali, che vengono usate nel laboratorio di Farmacia dell'Università di Pisa per testare alcuni farmaci specifici.



Le altre immagini istologiche contenute nel testo ci sono state fornite dal ricercatore stesso. Si tratta di fotografie che sono state scattate in parte nel laboratorio di Biochimica del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Pisa (dove egli lavora) ed in parte nel laboratorio di cellule staminali e neurodegenerazione di Valencia (dove egli ha svolto un periodo di studio).

## **CONCLUSIONI**

Il Progetto BRIGHT NIGHT ci ha permesso di conoscere direttamente un ricercatore, Lorenzo Ceccarelli, che ci ha portato alla scoperta di minuscole vescicole extracellulari, chiamate esosomi, responsabili di importanti funzioni all'interno del nostro organismo. Abbiamo capito che gli esosomi possono essere sfruttati sia come mezzo diagnostico, sia per inserire al loro interno farmaci a bersaglio specifico (cioè diretti solo verso determinati tipi cellulari). È stato un incontro particolarmente stimolante, che ci ha fatto anche comprendere l'importanza del lavoro dei ricercatori.

Queste persone, animate dalla passione per la propria attività, lavorano senza sosta, con grande impegno e senza orari prestabiliti, allo scopo di comprendere qualcosa di ancora inesplorato, che possa dare risultati utili alla cura di alcune patologie (le malattie neurodegenerative, nel caso di Lorenzo Ceccarelli).