

Protective benefits of Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells against Ischemia-Reperfusion injury

Dott.ssa Ilaria Troisio

Supervisor Dott.ssa Nadia Govoni

Cosupervisor Prof.ssa Maria Laura Bacci, Prof. Salvatore Nesci

OUTLINE

- Background del progetto
- Attività a.a.2023/2024
- Pubblicazioni
- Partecipazione Congressi
- Progetto per periodo all'estero
- Attività di formazione personale



Trapianto di cuore

Heart **D**onation after **B**rain **D**eath (**DBD**)
heart-beating organ donation

- Ischemia di breve durata;
- Facile valutazione funzionalità cardiache prima del trapianto;

Incrementare **Pool Donatori** con **D**onation after **C**ardiocirculatory **D**eath (**DCD**) *Nonheart-beating organ donation*

Mancanza di biomarkers e parametri fisiologici predittivi della trapiantabilità;
Risultati a lungo termine incerti;

Ischemia calda non controllata → successivo danno da Ischemia da
riperfusion (IRI) → Mitocondri principale bersaglio dello stress ossidativo

2021, 54 Countries

- **8.409** Heart Transplantations
- **21.935** patients in waitlist

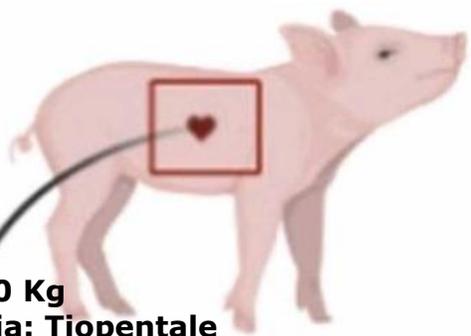
the World Observatory on Donation and Transplantation GODT, 2022

MSC-EV su danno
mitocondriale in un modello
preclinico di trapianto
cardiaco

SCOPO
Attività A.A.
2023/2024



N = 6
PV 40-50 Kg
Eutanasia: Tiopentale
(Pentotal sodium) 30mg/kg



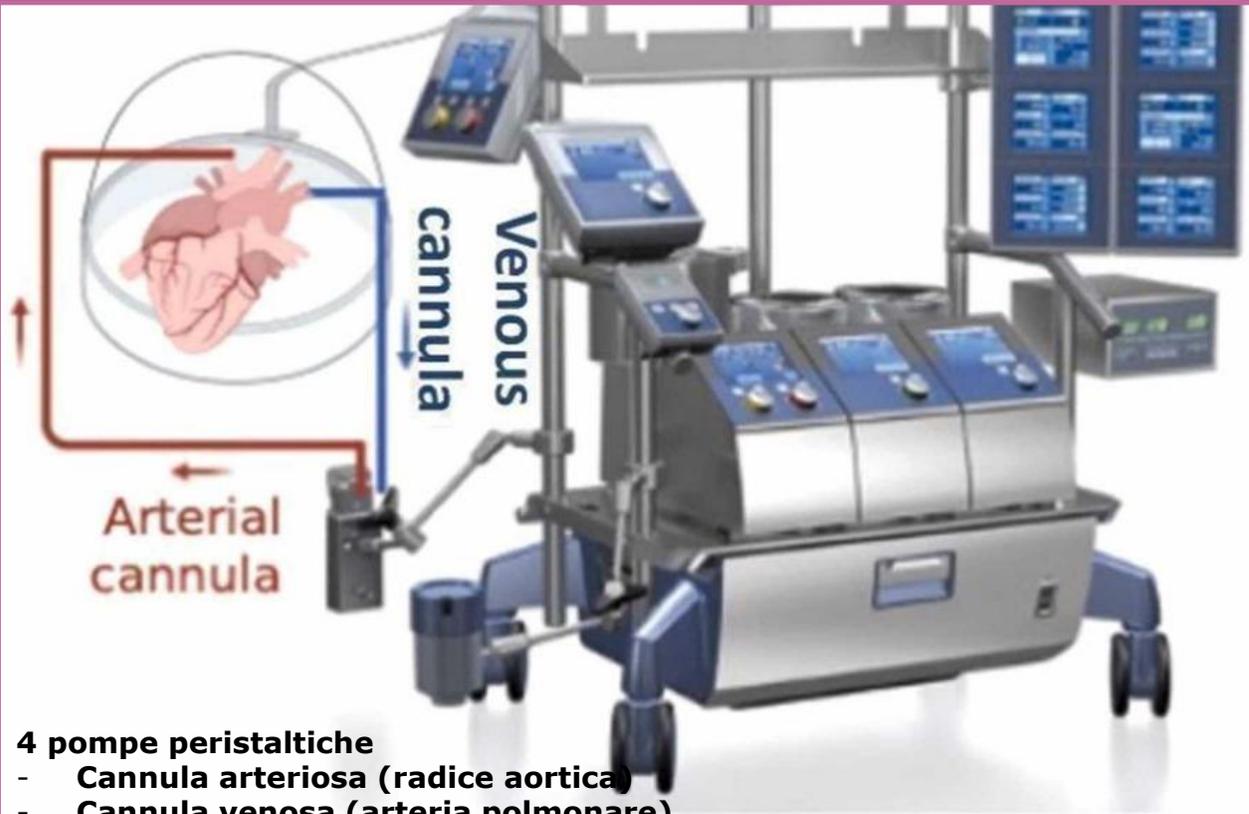
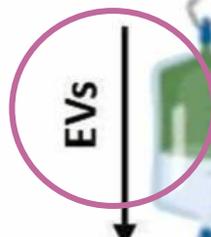
“no-touch”
period
(20 min)



Sternotomia
mediana
Prelievo
organo

Ex vivo
Perfusion
(120 min)

N = 3 sperimental group (Evs 1×10^{11} in final volume 1-2 mL)
N = 3 control group (1-2mL PBS + 500mM NaCl)



- 4 pompe peristaltiche
- Cannula arteriosa (radice aortica)
 - Cannula venosa (arteria polmonare)
 - 2 per ventilazione

Produzione EVs (Vescicole extracellulari)

Coltura cellulare segue linee guida dall'International Society for Cellular Therapy (ISCT)

HUCPVCs (cellule perivascolari del cordone ombelicale umano) *Promocell*

1.Semina in DMEM ↓ Glucosio + 10% FBS + penicillina e streptomicina

2.Trasferimento 3°-4° passaggio in fiasche 175 cm²

Densità: 4000 cell/cm²

Crescita fino al 70% di confluenza

3.Spostamento in α -MEM (minimum essential medium):

48h senza FBS

4.Raccolta Surnatante (Evs):

Centrifugazione: 2500 x g per 10 minuti

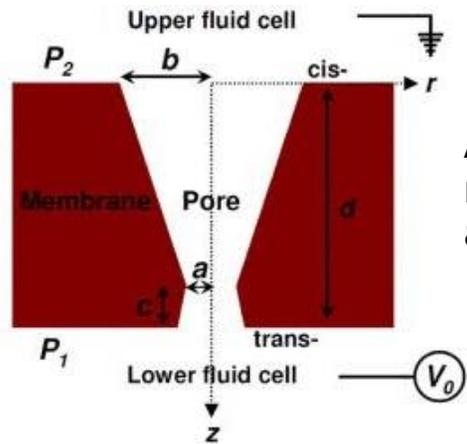
Filtrazione: filtro 0,22 μ m

5.Conservazione:

Stock a -80 °C dopo ripetizione dell'isolamento

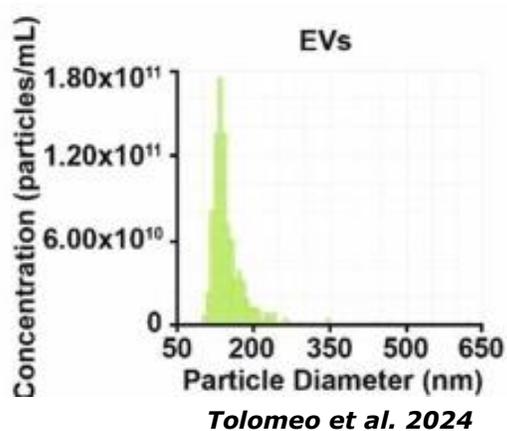
Caratterizzazione EVs (Vescicole extracellulari)

Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS) technology

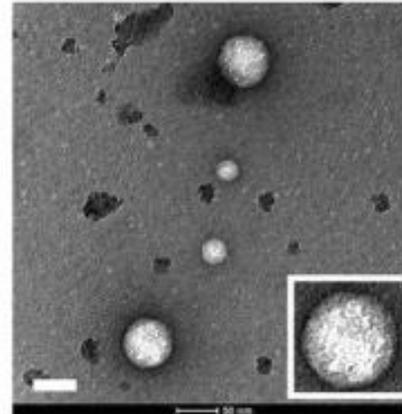


Analizza il cambiamento di resistenza elettrica al passaggio attraverso un poro

Popolazione omogenea
Dimensioni < 100nm



Imagin technology: Microscopia elettronica a trasmissione



Scala 50nm Tolomeo et al. 2024

Identificazione EV come sferoidi omogenei
Dimensioni 30-250 nm

Secondo i criteri MISEV2018, le particelle possono essere definite piccole EV
Assenza corpi apoptotici

TEM per valutazione mitocondriale: M&M

- **Raccolta campioni** (1- 2mm³)
 - Ventricolo destro (RV)
 - Ventricolo sinistro (LV)
 - Septum interventricolare (IVS)
- Soluzione di **fissazione** overnight
(2% glutaraldeide + 2% paraformaldeide tampone sodio cacodylato pH 7.4)
- **Trasferimento** in soluzione osmio tetrossido 1%
(marcatore di membrane)
- **Incastonamento** in resina (matrice solida intorno)
- Sezioni **semithin** (micrometri) colorazione blu toluidina, microscopia ottica
- Sezioni **ultrathin** con ultramicrotomo (spessore 60-70nm) per microscopia elettronica
- **Colorazione** con acetato di uranile e citrato di piombo
(migliorare contrasto)
- **Osservazione** al microscopio elettronico



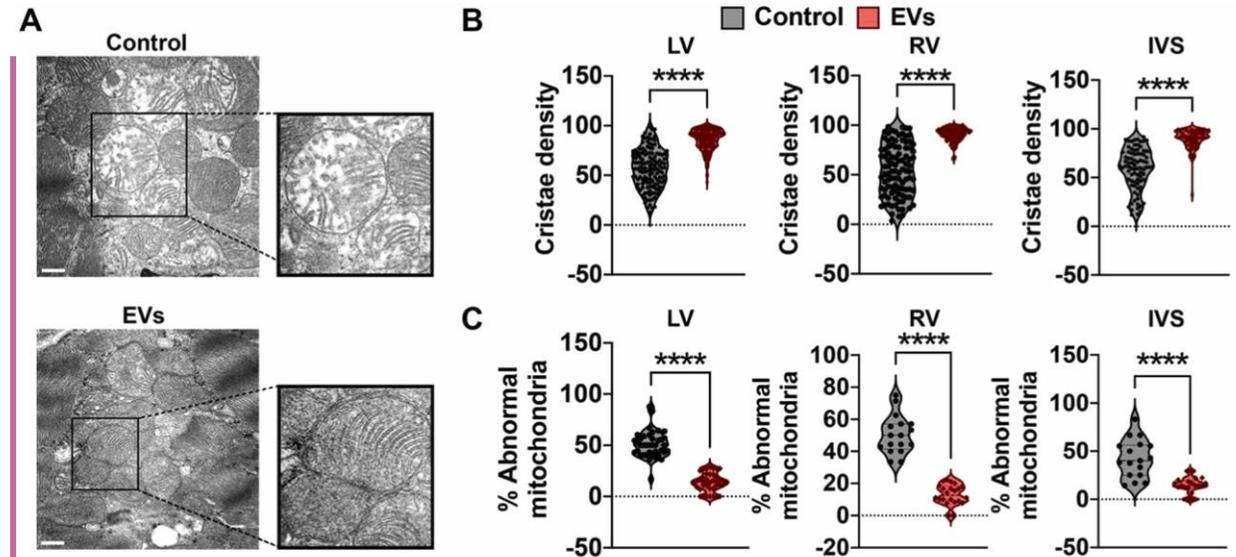
Leica Ultracut EM UC7 ultramicrotome



Tecnai G2 (FEI) transmission electron microscope

TEM per valutazione mitocondriale: Risultati

- **Raccolta campioni** (1- 2mm³)
 - Ventricolo destro (RV)
 - Ventricolo sinistro (LV)
 - Septum interventricolare (IVS)
- Soluzione di **fissazione** overnight (2% glutaraldeide + 2% paraformaldeide tampone sodio cacodylato pH 7.4)
- **Trasferimento** in soluzione osmio tetrossido 1% (marcatore di membrane)
- **Incastonamento** in resina (matrice solida intorno)
- Sezioni **semithin** (micrometri) colorazione blu toluidina, microscopia ottica
- Sezioni **ultrathin** con ultramicrotomo (spessore 60-70nm) per microscopia elettronica
- **Colorazione** con acetato di uranile e citrato di piombo (migliorare contrasto)
- **Osservazione** al microscopio elettronico



Analysis of mitochondrial ultrastructure. Representative microphotographs of cardiac tissue mitochondria obtained by transmission electron microscopy (A). Analysis of mitochondria was carried out by quantifying the density of mitochondrial cristae (B) and the percentage of abnormal mitochondria (C). 30 photos per group were analyzed. Bar scale = 500 nm. Results were expressed as median \pm range and significance was determined for independent samples using one-way ANOVA with post-hoc Tukey's test ($n = 3$). **** $P < 0.0001$ (B and C). **Tolomeo et al. 2024**

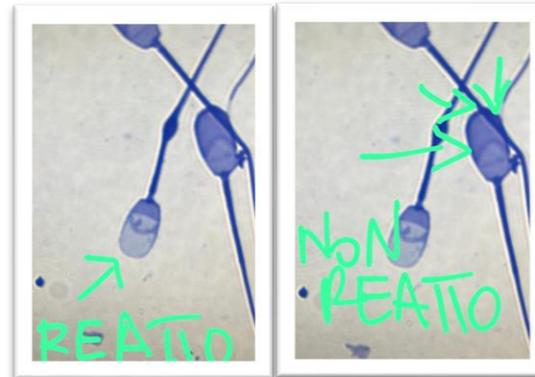
MSC-EV aiutano a ridurre e prevenire il danno ultrastrutturale dei mitocondri

Attività non correlate al progetto

- Gestione e Training suini presso Stabulario ANFI-ASA;
- Attività di laboratorio a sostegno dei progetti di ricerca ANFI-ASA;

- Training valutazione del seme del verro:

- eosin-nigrosin staining;
- Coomassie Blue staining;
- JC-1 dye;
- Computer Assisted Semen Analysis;



- Studi di espressione genica sul pathway ossidativo e angiogenico con modello animale di regolazione della spermatogenesi



Publicazioni A.A. 2023/2024

scientific reports

OPEN

Short- and long-term effects of essential oils on swine spermatozoa during liquid phase refrigeration

Ilaria Troisio^{1,7}, Martina Bertocchi^{1,7}, Domenico Ventrella^{1b,c}, Maurizio Scozzoli², Maura Di Vito³, Eleonora Truzzi⁴, Stefania Benvenuti⁵, Paola Mattarelli⁶, Maria Laura Bacci¹ & Alberto Elmi¹

Check for updates

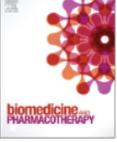
Parte di uno studio approfondito sugli effetti degli oli essenziali sulle cellule spermatiche per sopperire all'uso degli antibiotics-added extenders per conservazione del seme del verro;

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

 **ELSEVIER**

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph



Protective effects of mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles against ischemia-reperfusion injury of hearts donated after circulatory death: Preliminary study in a pig model

Anna Maria Tolomeo^{a,b,*}, Ricardo Malvicini^{b,c,d,1}, Domenico Ventrella^e, Alberto Elmi^{e,f}, Valentina Lombardi^a, Fabio Zanella^g, Marco Andreis^a, Giada De Lazzari^{b,c}, Giulia Todeschini^g, Federico Caicci^h, Camilla Anibaldi^e, Ilaria Troisio^e, Gianfranco Santovito^h, Maria Laura Bacci^e, Maurizio Muraca^b, Assunta Fabozzo^{g,2}, Gino Gerosa^{a,b,g,*,2}

Check for updates

Valutazione dell'attività delle vescicole extracellulari derivate da cellule stromali mesenchimali (MSC-EV) sui danni dell'ischemia da ri-perfusione

Congressi A.A. 2023/2024



Scientific Meeting, Amsterdam (NL)
22-24 Maggio 2024



77° Convegno SISVet, Parma (IT)

12-14 Giugno 2024

Presentazione orale: *Study of gene expression of angiogenesis and oxidative stress pathways in testicles of roe deer in different reproductive stages*

Poster: *Use of hair in the analysis of the steroid profile of wild species: the case study of the Apennine wolf*



Xth International Conference on Boar Semen Preservation, Vic (ES)

18—22 Agosto 2024

Poster: *Essential oils and boar semen preservation: a comprehensive assessment of preliminary toxicity and efficacy*



TURKISH & ITALIAN
JOINT INTERNATIONAL CONGRESS OF
ANIMAL REPRODUCTION
10 - 13 October 2024

International Congress of Animal Reproduction, Antalya (TR)

10-13 Ottobre 2024

Presentazione orale: *Angiogenesis and oxidative stress pathways: a gene expression study in roe deer testis*

Progetto per periodo all'estero

Titolo del Progetto: *The pathways involved in autophagy of paternal mitochondria in fertilized oocyte*

Sede: Facoltà di Medicina Veterinaria, Utrecht University, the Netherland

Professore di riferimento: Prof. Dr. Bart Gadella

Studio del meccanismo di degradazione dei mitocondri di eredità paterna nelle prime fasi di sviluppo dell'embrione e comprendere i meccanismi che ne sono alla base

Metodiche: impiego di saggi di mito/autofagia con:

- **Western blotting;**
- **microscopia confocale;**
- saggi di **interazione proteica;**
- **microiniezione** di oociti;
- studi **metabolici** e **lipidomici** di membrana cellulare;

Attività di formazione personale



E.C.M.

Commissione Nazionale Formazione Continua



GIMBE
EVIDENCE FOR HEALTH

Programma per la formazione continua dei professionisti della Sanità

Premesso che la **Commissione Nazionale per la Formazione Continua** ha accreditato il Provider GIMBE accreditamento n. 878

Premesso che il Provider ha organizzato l'evento formativo n. 878-394975, edizione n. 1 dal titolo

Introduzione alla statistica medica per la ricerca clinica

Rltrain^{PLUS}



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

RltrainPlus Training Programme Summer School 2

"Communicating Research – Introduction to Science to Science and Science to Public Communication"



GRAZIE PER L'ATTENZIONE