



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

INDIRIZZO: INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI

XXV CICLO

TESI DI DOTTORATO

**CELLULE FIBROBLASTOIDI MULTIPOTENTI
DA SANGUE PERIFERICO: UNA NUOVA RISORSA
PER LA RIGENERAZIONE TESSUTALE**

Direttore della Scuola: Ch.ma Prof.ssa MARIA TERESA CONCONI

Coordinatore di indirizzo: Ch.ma Prof.ssa MARIA TERESA CONCONI

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa ROSA DI LIDDO

Dottoranda: SILVIA BARBON

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
ABSTRACT	pag. 3
INTRODUZIONE	pag. 5
1. Terapia cellulare	pag. 5
1.1 Terapia staminale	pag. 6
2. Cellule staminali per la rigenerazione tissutale	pag. 7
2.1 Cellule staminali embrionali	pag. 9
2.2 Cellule staminali adulte	pag. 10
2.3 Cellule staminali mesenchimali	pag. 12
2.4 Cellule staminali circolanti nel sangue periferico.....	pag. 13
3. Proprietà immunomodulatoria del trapianto cellulare	pag. 15
<i>a) Regolazione dei linfociti T nei trapianti cellulari</i>	<i>pag. 17</i>
<i>b) Regolazione dei linfociti B</i>	<i>pag. 18</i>
<i>c) Regolazione dei monociti/macrofagi</i>	<i>pag. 18</i>
<i>d) Regolazione delle cellule dendritiche</i>	<i>pag. 18</i>
<i>e) Regolazione delle cellule Natural Killer</i>	<i>pag. 18</i>
4. Cellule staminali e prodotti di ingegneria tissutale	pag. 19
4.1 Il danno tissutale	pag. 19
4.2 Gli “strumenti” dell’ingegneria tissutale.....	pag. 21
<i>a) Cellule</i>	<i>pag. 21</i>
<i>b) Scaffold</i>	<i>pag. 22</i>
<i>c) Fattori di crescita</i>	<i>pag. 22</i>
5. L’ingegneria tissutale valvolare cardiaca	pag. 22
5.1 Le valvole cardiache	pag. 23
5.1.1 Valvola semilunare aortica.....	pag. 26
5.1.2 Valvola semilunare polmonare	pag. 26
5.2 Valvulopatie.....	pag. 27
5.2.1 Stenosi valvolare aortica	pag. 27
5.2.2 Insufficienza valvolare aortica	pag. 28
5.3 Terapia delle valvulopatie.....	pag. 29

5.3.1	Protesi valvolari meccaniche e biologiche	pag. 29
5.3.2	Protesi biologiche ingegnerizzate sintetiche e naturali	pag. 31
5.3.3	Cellule per l'ingegneria tessutale valvolare	pag. 32
	a) Cellule staminali isolate da midollo osseo	pag. 33
	b) Cellule staminali isolate da cordone ombelicale	pag. 33
	c) Cellule progenitrici endoteliali isolate da sangue	pag. 33
SCOPO DELLA TESI		pag. 35
MATERIALI E METODI		pag. 37
1.	Isolamento di cellule multipotenti da sangue periferico	pag. 37
2.	Analisi di microscopia ottica.....	pag. 38
3.	Studio della morfologia cellulare mediante microscopia elettronica a scansione (SEM)	pag. 38
4.	Studio dell'immunofenotipo	pag. 38
	4.1 Citofluorimetria	pag. 39
	4.2 Caratterizzazione fenotipica delle popolazioni PBC	pag. 41
5.	Valutazione della stabilità fenotipica delle popolazioni PBC	pag. 42
6.	Studio del cariotipo delle popolazioni PBC.....	pag. 43
7.	Identificazione del <i>doubling population</i>	pag. 43
8.	Studio delle potenzialità multidifferenziative delle popolazioni PBC	pag. 44
	8.1 Differenziamento adipogenico.....	pag. 45
	8.1.1 Colorazione Oil Red O.....	pag. 45
	8.2 Differenziamento osteogenico	pag. 45
	8.2.1 Colorazione Von Kossa.....	pag. 46
	8.3 Differenziamento condrogenico	pag. 46
	8.1.1 Colorazione Alcian Blue	pag. 47
9.	Studio delle proprietà immunomodulatorie delle cellule hPBC.....	pag. 47
	9.1 Trattamento con INF γ	pag. 47
	9.2 Co-coltura con linfociti umani	pag. 48
10.	Ricostruzione di una valvola cardiaca ingegnerizzata <i>in vitro</i>	pag. 49
	10.1 Caratterizzazione del potenziale cardiomiogenico della cellule pPBC	pag. 49
	10.1.1 Immunofluorescenza e microscopia confocale	pag. 50
	10.1.2 Western Blot.....	pag. 50
	a) Estrazione delle proteine	pag. 51

b) <i>Quantificazione proteica</i>	pag. 51
c) <i>Elettroforesi su gel di poliacrilamide</i>	pag. 52
d) <i>Transfer</i>	pag. 54
e) <i>Immunoblotting</i>	pag. 54
f) <i>Rivelazione</i>	pag. 55
10.2 Decellularizzazione dei lembi aortici e polmonari porcini mediante il metodo TRICOL.....	pag. 55
10.3 Caratterizzazione delle matrici acellulari mediante immunofluorescenza	pag. 56
10.4 Valutazione della crescita delle popolazioni pPBC su matrici valvolari acellulari	pag. 57
10.4.1 Semina delle cellule pPBC su lembi decellularizzati aortici (VDA) e polmonari (VDP)	pag. 57
10.4.2 Studio morfologico mediante SEM.....	pag. 57
10.4.3 Colorazione con DAPI e immunocitochimica sulle matrici VDA e VDP ingegnerizzate.....	pag. 58
10.4.4 Analisi di espressione genica mediante RT-PCR di cellule pPBC seminate Su VDA e VDP	pag. 59
11. RT-PCR.....	pag. 59
11.1 Estrazione di mRNA	pag. 59
11.2 Quantificazione spettrofotometrica dell'RNA estratto	pag. 60
11.3 <i>One Step</i> RT-PCR.....	pag. 60
11.4 Elettroforesi su gel di agarosio	pag. 61
12. Real-Time PCR	pag. 62
12.1 Trascrizione inversa dell'RNA con <i>random</i> esameri	pag. 63
12.2 Reazione di <i>Real-Time</i> PCR	pag. 63
RISULTATI	pag. 67
1. Colture cellulari e capacità proliferativa.....	pag. 67
2. Studio di espressione genica nelle popolazioni PBC.....	pag. 69
2.1 Geni di pluripotenza.....	pag. 69
2.2 Marcatori di matrice extracellulare	pag. 71
3. Caratterizzazione fenotipica delle cellule PBC	pag. 71
4. Analisi del cariotipo.....	pag. 73
5. Caratterizzazione del potenziale multidifferenziativo delle cellule PBC	pag. 73

5.1 Differenziamento adipogenico.....	pag. 74
5.2 Differenziamento osteogenico	pag. 74
5.3 Differenziamento condrogenico delle cellule pPBC	pag. 75
5.4 Differenziamento miogenico e neurogenico di cellule hPBC	pag. 76
6. Studio delle potenzialità di impiego delle cellule PBC in medicina rigenerativa.....	pag. 78
6.1 Potenziale cardiomiogenico delle cellule pPBC.....	pag. 79
6.2 Ricostruzione di una valvola cardiaca in vitro mediante cellule pPBC e matrici acellulari.....	pag. 80
6.2.2 Caratterizzazione delle matrici acellulari.....	pag. 80
6.2.3 Crescita delle pPBC su matrici valvolari decellularizzate	pag. 81
6.3 Proprietà immunomodulatorie delle cellule hPBC	pag. 86
6.3.1 Trattamento con INF γ	pag. 87
6.3.2 Co-coltura con linfociti umani	pag. 90
DISCUSSIONE.....	pag. 93
CONCLUSIONI	pag. 103
BIBLIOGRAFIA	pag. 105

RIASSUNTO

Nell'ultimo decennio, l'impiego di cellule staminali adulte multipotenti (CSM) ha consentito l'individuazione di nuovi approcci terapeutici per la cura di difetti tessutali strutturali acquisiti o di malattie degenerative. Per la realizzazione dei cosiddetti prodotti di terapia avanzata, l'identificazione di cellule staminali multipotenti circolanti animali ha suscitato un particolare interesse nei confronti del sangue periferico umano quale fonte ideale, caratterizzata da facile reperibilità e da tecnica estrattiva non invasiva. Nel presente lavoro è stata definita una metodica di isolamento di cellule multipotenti da sangue periferico umano (*human Peripheral Blood Cells / hPBC*). La caratterizzazione delle proprietà immunofenotipiche, proliferative e differenziative delle popolazioni fibroblastoidi estratte ne ha evidenziato la potenzialità di impiego in applicazioni di ingegneria tissutale. Il confronto con le popolazioni cellulari isolate da sangue periferico animale (*porcine Peripheral Blood Cells / pPBC*) ne ha dimostrato proprietà immunofenotipiche e proliferative distintive. In particolare, per entrambe le popolazioni cellulari, l'analisi di qPCR ha evidenziato l'espressione di geni di pluripotenza quali Nanog, SOX2, Klf4 e c-Myc, mentre lo studio del *Doubling Time* ne ha messo in luce una capacità proliferativa costante associata ad una stabilità immunofenotipica nella coltura espansiva. L'analisi mediante citofluorimetria ha definito per le popolazioni umane e animali la derivazione da nicchie staminali differenti: infatti le cellule hPBC, esprimendo marcatori quali NG2 e CD13, potrebbero derivare dalla regione perivascolare, mentre le cellule pPBC, esprimendo il CD44, potrebbero mobilitare nel sangue periferico da midollo osseo. Risultando entrambe responsive *in vitro* a stimoli di tre differenti linee differenziative, le cellule pPBC e hPBC possono considerarsi cellule staminali multipotenti. Studi di crescita su matrici valvolari acellulari porcine hanno dimostrato che le cellule pPBC rispondono agli stimoli del supporto esprimendo il profilo genico specifico delle popolazioni cellulari tipicamente presenti nelle valvole cardiache aortiche e polmonari. Lo studio delle proprietà immunomodulatorie delle cellule hPBC mediante co-coltura con linfociti umani e analisi di qPCR dopo trattamento con la citochina proinfiammatoria INF γ , ne ha evidenziato la capacità di regolare la proliferazione di linfociti, monociti e granulociti mediante l'espressione di geni coinvolti nella risposta infiammatoria, quali CXCL9, IDO1 e COX2.

ABSTRACT

In the last decade, the use of multipotent adult stem cells (MSC) has paved way for the identification of new therapeutic approaches for the treatment of acquired structural tissue defects or degenerative diseases. For exploiting the maximum therapeutic potential of these cells, there is an urgent need for clear understanding of the characteristics of multipotent stem cells isolated from animal and human peripheral blood, being an ideal source, characterized by high availability and non-invasive extraction technique.

In the present work, a method for the isolation of multipotent cells from human peripheral blood (*human Peripheral Blood Cells* / hPBC) has been defined. The characterization of the immunophenotypic, proliferative and differentiative properties of extracted fibroblast-like populations has highlighted their potential use in tissue engineering applications. The comparison with the cell populations isolated from animal peripheral blood (*porcine Peripheral Blood Cells* / pPBC) has demonstrated their distinctive immunophenotypic and proliferative properties.

In particular, for both cell populations, qPCR analysis showed the expression of genes of pluripotency such as Nanog, SOX2, Klf4 and c-Myc, while the Doubling Time study has highlighted a constant proliferative capacity associated to immunophenotypic stability in the culture expansion. Flow cytometry analysis showed that the animal and human populations originate from different stem cell niches: hPBC, because of the expression of markers such as NG2 and CD13, may arise from the perivascular region, while pPBC, expressing CD44, could mobilize to the peripheral blood from bone marrow. Being responsive to *in vitro* stimuli and differentiating towards osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages, pPBC and hPBC can be considered as multipotent stem cells.

Growth assays on porcine acellular valvular matrices have shown that pPBC engraft well onto the matrices expressing the specific gene profile of cell populations typically present in aortic and pulmonary heart valves. The immunomodulatory properties of hPBC were investigated by co-culture with human lymphocytes and analysis of qPCR after treatment with the proinflammatory cytokine INF γ ; these studies have shown the ability of human populations to regulate the proliferation of lymphocytes, monocytes and granulocytes by the expression of genes involved in inflammatory response, such as CXCL9, IDO1 and COX2.

INTRODUZIONE

1. Terapia cellulare

La terapia cellulare è un ramo della medicina rigenerativa che si basa sull'introduzione di cellule in un paziente che presenta disfunzioni ereditarie o acquisite a livello di un tessuto o di un organo. Il termine identifica, dunque, una modalità di cura in cui i farmaci sono sostituiti da cellule. Più recentemente, il concetto è stato utilizzato soprattutto per indicare procedure che prevedono l'uso di sottopopolazioni cellulari ben caratterizzate, che vengono isolate da biopsie o prelievi di tessuti secondo protocolli standardizzati e vengono infine introdotte nel ricevente dopo una manipolazione *ex vivo* o direttamente dopo l'estrazione (Giordano, 2007) (Figura 1).

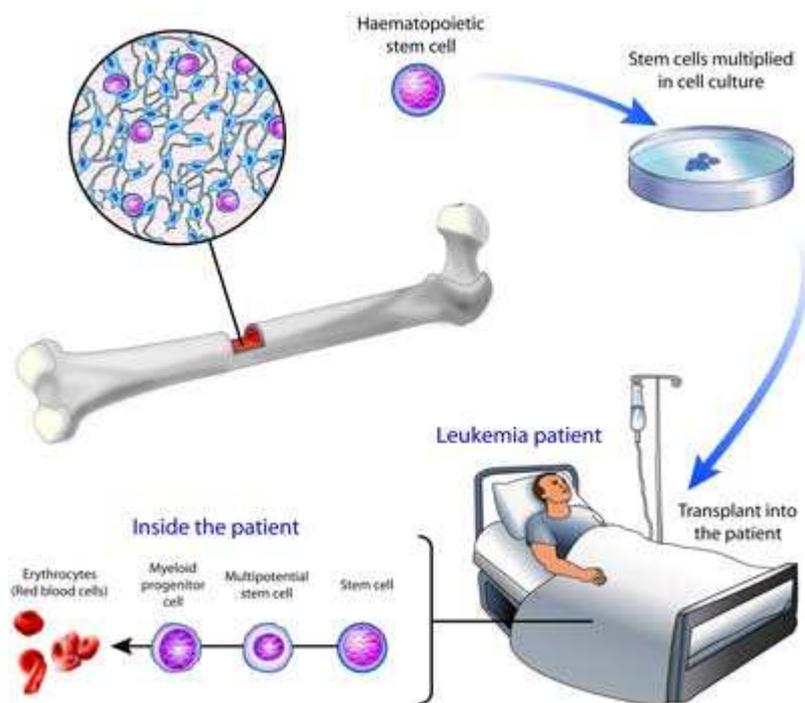


Figura 1. Esempio di terapia con cellule staminali ematopoietiche per la cura della leucemia

Non essendo possibile sottoporre a procedure di sterilizzazione i prodotti cellulari senza incidere sulla loro vitalità e quindi sulle loro proprietà terapeutiche, tutti questi trattamenti devono essere eseguiti in condizioni che garantiscano un bassissimo livello di contaminazione ambientale, allo scopo di ridurre il rischio microbiologico associato. Lo sviluppo di un prodotto di terapia cellulare che possa essere impiegato in protocolli clinici

sperimentali segue una procedura ben definita che prevede una fase preclinica, una fase di validazione ed una di approvazione.

La fase preclinica è orientata sin dal concepimento del disegno sperimentale alla raccolta di informazioni necessarie alla traslazione in campo clinico. In breve, tali informazioni riguardano:

- la definizione e la verifica sperimentale di *endpoint* biologici di funzione (ad esempio: il potenziale di crescita *in vitro* di cellule staminali, il profilo immunofenotipico, la secrezione di specifici fattori);
- la verifica sperimentale del mantenimento delle caratteristiche biologiche del prodotto anche dopo criopreservazione e/o coltura cellulare;
- la verifica sperimentale della funzione biologica, laddove possibile, in modelli animali della patologia per la cui cura saranno impiegate le cellule.

L'attività di convalida del processo produttivo deve essere svolta in osservanza a quanto prescritto dalle pratiche GMP (*Good Manufacturing Practice*) e i risultati delle prove e delle convalide costituiscono parte integrante del protocollo sperimentale che dovrà essere sottoposto a processi autorizzativi (Giordano, 2007).

Esistono diverse forme di terapia cellulare (Brindley *et al.*, 2011):

- ✓ il trapianto di cellule tessuto-specifiche, specializzate e funzionali (*Cell Replacement Therapy*);
- ✓ l'uso di cellule umane geneticamente modificate per l'ottenimento di prodotti biologici a scopo terapeutico (*cell-based gene therapy*);
- ✓ il trapianto di cellule staminali o cellule progenitrici di origine sia autologa che allogenica.

1.1 Terapia staminale

È una strategia di intervento medico basata sull'uso di cellule staminali (*Stem Cells*, SC) e finalizzata al recupero di organi o tessuti danneggiati da malattie o traumi. Si definisce staminale una cellula non specializzata che ha la capacità di moltiplicarsi indefinitamente e, in condizioni fisiologiche o sperimentali, è in grado di differenziarsi in cellule mature con specifiche funzioni (Ratajczak *et al.*, 2008). Se le cellule staminali isolate dall'embrione nelle prime fasi di sviluppo sarebbero le più adatte allo scopo rigenerativo, in virtù del loro elevato tasso proliferativo e della loro notevole capacità differenziativa, i problemi etici sollevati dalla loro origine pre-natale hanno portato la comunità scientifica a rivolgere l'attenzione verso l'impiego terapeutico di cellule staminali adulte (*Adult Stem*

Cells, ASC). Queste ultime sono state identificate in diversi tessuti in età post-natale, e popolazioni cellulari di varia origine sono già state isolate e caratterizzate, alcune solo di recente (Körbling e Estrov, 2003). Le cellule staminali adulte, pur avendo capacità proliferative e differenziative più limitate rispetto a quelle embrionali, sono in grado di garantire il proprio autorinnovamento (*self-renewal*) e la sostituzione degli elementi cellulari tessuto-specifici terminalmente differenziati per il *turnover* fisiologico del distretto in cui sono localizzate o la riparazione dello stesso in seguito ad infortuni o all'insorgenza di stati patologici (Kuci *et al.*, 2009).

Studi recenti suggeriscono che le cellule staminali adulte sono caratterizzate da un'elevata responsività agli stimoli differenziativi, una proprietà definita plasticità cellulare (Körbling e Estrov, 2003). In particolare, tra le diverse popolazioni di ASC, quelle mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSC) sono caratterizzate dal più alto potenziale differenziativo, essendo in grado di evolvere in numerosi *lineage* cellulari di origine mesodermica, ectodermica ed endodermica (Hipp e Atala, 2008).

Sulla base di queste considerazioni, la possibilità di impiegare cellule staminali isolate da tessuti adulti ha rivoluzionato l'approccio terapeutico nel campo della medicina rigenerativa, rendendo possibile avanzare nuove proposte di intervento per la cura di malattie e disfunzioni tessutali. Sono, infatti, numerosi i *trial* clinici che hanno dimostrato la potenzialità terapeutica dell'impianto di cellule staminali isolate da fonti diverse (midollo osseo, tessuto adiposo, sangue periferico) nella rigenerazione tessutale. Il trapianto di cellule ematopoietiche è il primo esempio di terapia staminale realizzato con grande successo ed è attualmente molto usato per il recupero di diverse tipologie di linfomi e mielomi. Anche il trapianto autologo di cellule staminali mesenchimali è una strategia terapeutica sempre più diffusa per il riparo di tessuti di origine mesodermica, come i polmoni e il cuore, e per il trattamento di condizioni patologiche quali l'ictus, il diabete, la sclerosi multipla e le malattie degenerative del sistema nervoso (Alzheimer, Parkinson) (Sng e Lufkin, 2012).

2. Cellule staminali per la rigenerazione tessutale

Il compartimento staminale a livello tessutale viene definito nicchia staminale (Schofield, 1978); esso consente il mantenimento dello stato indifferenziato della cellula staminale mediante uno specifico controllo della divisione cellulare.

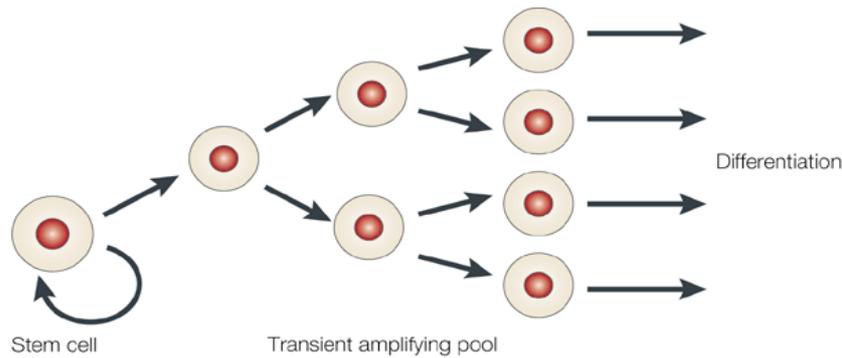


Figura 2. Divisione asimmetrica di una cellula staminale

La mitosi staminale è definita asimmetrica, in quanto le due cellule figlie che si originano hanno caratteristiche diverse. Infatti, una eredita la staminalità della cellula madre assicurando il cosiddetto “*self-renewal*” o autorinnovamento della popolazione e l’altra, *Transient Amplifying Cell* (TAC) o cellula progenitrice, va incontro ad un processo differenziativo mediante successive divisioni mitotiche simmetriche e acquisizione di peculiari caratteristiche tessutali (*commitment*) (Figura 2). Questa proprietà consente l’omeostasi tessutale, assicura il corretto *turnover* cellulare in tutti i tessuti dell’organismo e, in occasione di un danno, promuove processi di rigenerazione (Knoblich, 2001).

Come descritto da Ratajczak e colleghi (Ratajczak *et al.*, 2008), il diverso grado di potenzialità differenziativa delle cellule staminali (SC) porta a distinguere 4 tipologie diverse (Figura 3):

- ✓ **totipotenti**, che danno origine a tutti i tessuti e agli annessi embrionali. Fisiologicamente, le cellule staminali totipotenti sono l’oocita fecondato (zigote) o i blastomeri derivati dalle prime due divisioni. La controparte artificiale è il cosiddetto *clonote*, ottenuto tramite trasferimento nucleare in un oocita anucleato;
- ✓ **pluripotenti**, che danno origine a tessuti derivanti da tutti e tre i foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma). Un esempio sono le cellule staminali embrionali che si trovano nella massa cellulare interna della blastocisti;
- ✓ **multipotenti**, che danno origine a tessuti derivanti da un solo foglietto embrionale, come ad esempio le cellule staminali adulte;
- ✓ **unipotenti**, ovvero cellule *tissue-committed* che danno origine ad una sola linea cellulare. Alcuni esempi sono le cellule staminali tessuto-specifiche ematopoietiche, epidermiche, epatiche e neurali.

Inoltre, in base alla loro origine, le cellule staminali si distinguono in embrionali e adulte.

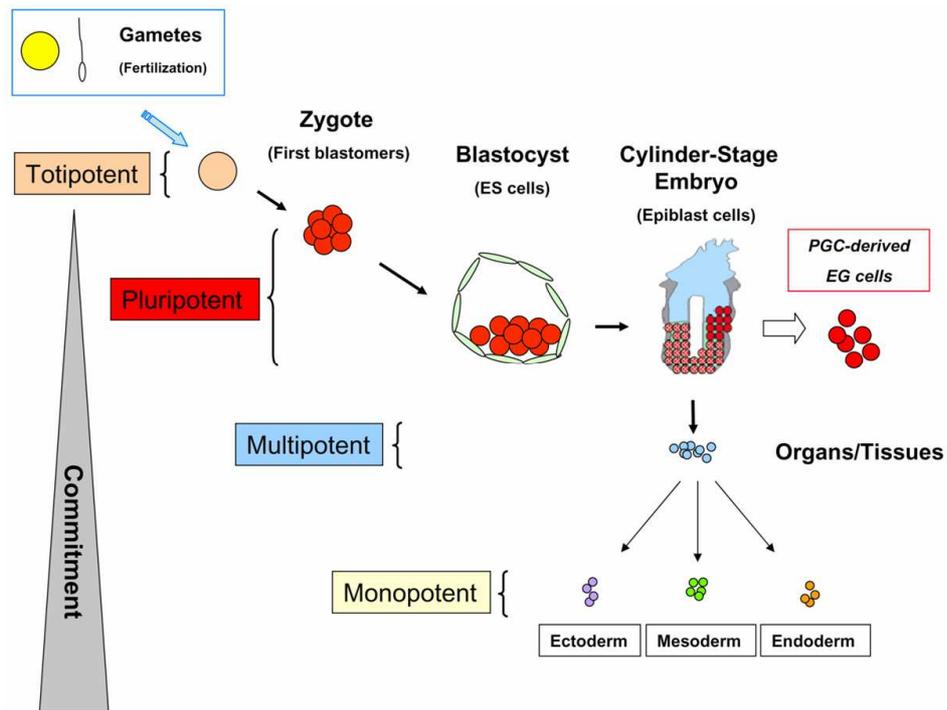


Figura 3. Sviluppo gerarchico del compartimento cellulare staminale

2.1 Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali (*Embryonic Stem Cells*, ESC) (Surani *et al.*, 2007) derivano da un embrione allo stadio di blastocisti, quindi a 4-5 giorni dalla fecondazione. La blastocisti è costituita da tre strutture: un sottile strato cellulare più esterno, chiamato *trofoblasto*, da cui prendono origine i tessuti extraembrionali; una cavità interna o *blastocoele* e la *massa cellulare interna* (ICM), un gruppo di circa 30 cellule all'interno del blastocoele, destinato a svilupparsi in embrione (Figura 4). Le cellule staminali embrionali sono cellule pluripotenti, capaci quindi di generare tutti i differenti tipi cellulari presenti nell'organismo. Durante lo sviluppo embrionale, marcatori genetici di pluripotenza, quali Oct-4, Nanog e Sox-2 indirizzano le ESC verso la differenziazione tessutale, dando origine ai tre foglietti germinativi (Nichols *et al.*, 1998; Surani *et al.*, 2007).

Le prime linee di cellule staminali embrionali murine sono state isolate nel 1981 dalla ICM di blastocisti di topo (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981). Se mantenute in coltura su un *feeder layer* di fibroblasti embrionali murini (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF) o in presenza del *leukemia inhibitory factor* (LIF), le ESC mantengono la loro capacità proliferativa nonché il loro stato indifferenziato per un periodo di tempo indefinito (Williams *et al.*, 1988). LIF è un fattore che appartiene alla famiglia delle interleuchina-6

(IL-6) e che attiva la via di *signaling* responsabile del mantenimento della pluripotenza delle ESC (Matsuda *et al.*, 1999).

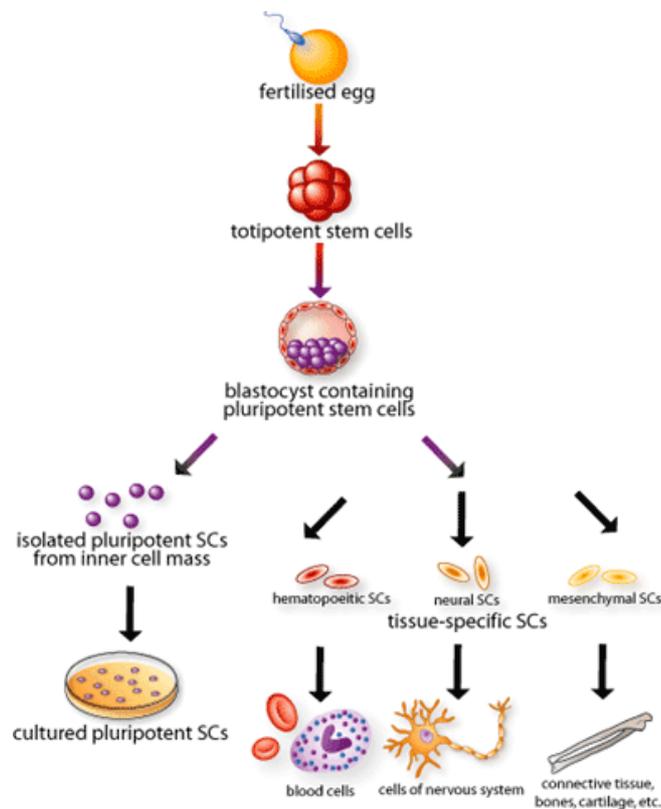


Figura 4. Cellule staminali embrionali

Per la loro enorme potenzialità proliferativa e differenziativa, le ESC sono oggetto di studio per l'eventuale applicazione in medicina rigenerativa (Donovan e Gearhart, 2001; Prella *et al.*, 2002). Numerosi studi hanno dimostrato che le ESC possono essere estratte e replicate *ex vivo* e che sono geneticamente manipolabili, ma evolvono in formazioni tumorali (teratocarcinomi) quando trapiantate in sede ectopica (Solter *et al.*, 1970; Diwan e Stevens, 1976). Il più grande limite per l'utilizzo terapeutico di queste cellule è rappresentato dai problemi di ordine etico sollevati dalla loro origine embrionale.

2.2 Cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte sono cellule indifferenziate con caratteristiche di *self-renewal* che risiedono in specifici distretti tissutali di età post-natale (Kuci *et al.*, 2009). La prima popolazione di cellule staminali adulte è stata isolata negli anni '70 dallo stroma del midollo osseo di porcellino d'india, ad opera di Friedenstein e colleghi (Friedenstein *et al.*,

1970; Friedenstein *et al.*, 1976). Le caratteristiche della nicchia staminale adulta sono state definite da Schofield nel 1978 come l'insieme di cellule specializzate, matrice extracellulare e molecole solubili caratteristiche del tessuto ospite che contribuiscono alla modulazione degli stimoli differenziativi ed attivano i processi di rigenerazione (Schofield, 1978; Kolf *et al.*, 2007) (Figura 5). Nicchie staminali sono state identificate in distretti tissutali diversi, quali la pelle, il fegato, il muscolo scheletrico, il tratto gastrointestinale, il pancreas, l'occhio, il cervello, il tessuto adiposo, il midollo osseo e il sangue (Spradling *et al.*, 2001; Presnell *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2002, Hipp e Atala, 2008). La caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule staminali adulte è risultata essenziale per la definizione dei protocolli terapeutici della medicina rigenerativa (Tuan *et al.*, 2003).

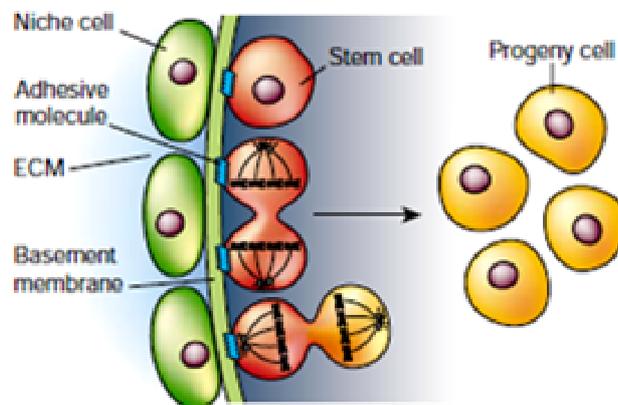


Figura 5. Struttura della nicchia staminale

Tra le cellule staminali adulte, le più studiate sono forse quelle ematopoietiche, isolate dal midollo osseo e capaci di dare origine alle cellule della linea linfoide e mieloide del sangue; esse sono usate in clinica per la terapia delle malattie del sistema immunitario (Hipp e Atala, 2008). Un'eccezione alla tessuto-specificità delle ASC è rappresentata dalle cellule staminali mesenchimali, che, essendo in grado di differenziare in diversi *lineage*, hanno destato un interesse sempre maggiore nel corso degli anni e numerose applicazioni nel campo della medicina rigenerativa sono state proposte per il recupero di danni strutturali e funzionali dei tessuti mesodermici, endodermici ed ectodermici attraverso la terapia cellulare con MSC (Pittenger *et al.*, 1999).

2.3 Cellule staminali mesenchimali

Le MSC sono una popolazione eterogenea di cellule non specializzate e multipotenti che in coltura *ex vivo* aderiscono alla plastica formando piccole colonie di cellule fibroblastoidi (*Colony Forming Unit-Fibroblast*, CFU-F). Secondo i criteri stabiliti dalla Società Internazionale per la Terapia Cellulare (ICT) (Dominici *et al.*, 2006), oltre che per la capacità di aderire alla plastica, le MSC si caratterizzano per l'alta espressione ($\geq 95\%$) dei marcatori CD105, CD73, CD90 e la bassa espressione ($\leq 2\%$) degli antigeni CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 e HLA-DR. Esse, inoltre, presentano un elevato potenziale multidifferenziativo in senso osteogenico, adipogenico, condrogenico e miogenico (Figura 6 A).

Le proprietà e la funzionalità delle MSC dipendono dalle caratteristiche della nicchia staminale da cui hanno origine (Figura 6 B), all'interno della quale preservano il loro stato indifferenziato (Spradling *et al.*, 2001; Estes *et al.*, 2004) e si ancorano a cellule di supporto mediante proteine di giunzione e di adesione rappresentate dalle *connesine* e dalle *caderine* (Perez-Moreno *et al.*, 2003). È riportato che in seguito a particolari stimoli quale un danno tissutale, la cellula staminale migra dalla sua nicchia ed entra nel circolo sanguigno, fino a raggiungere il sito in cui viene reclutata per il processo di rigenerazione tissutale (*homing*). La presenza sulla sua superficie di specifici recettori di chemochine, ad esempio il recettore CXCR4 per l'SDF (*stromal cell-derived factor*)-1 α , ne consente la migrazione specifica al sito di reclutamento (Kolf *et al.*, 2007).

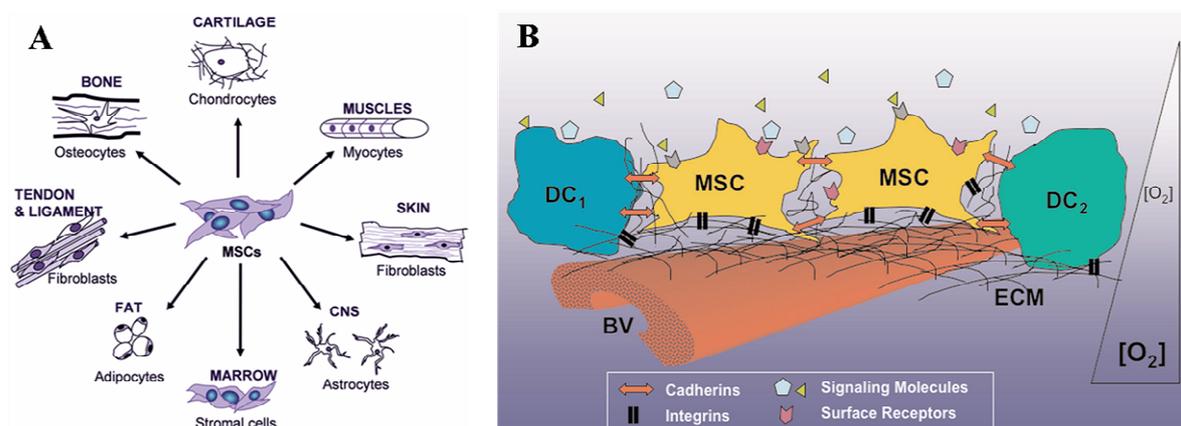


Figura 6. (A) Potenziale multidifferenziativo di cellule MSC. (B) Nicchia delle cellule staminali mesenchimali. Le MSC sono rappresentate all'interno della componente perivascolare della nicchia (BV: blood vessel), e interagiscono (1) con cellule differenziate (DC) mediante molecole di adesione, quali le caderine; (2) con la matrice extracellulare (ECM) mediante recettori per integrine; (3) con molecole segnale, quali fattori autocrini, paracrini, endocrini. Le MSC presenti nella nicchia del midollo osseo sono associate ad ipossia (Kolf *et al.*, 2007).

Fin dalla prima identificazione di una popolazione di cellule staminali adulte multipotenti da parte di Friedenstein e collaboratori, le MSC più studiate in termini di immunofenotipo, plasticità e strategie di impianto sono quelle isolate dal midollo osseo (He *et al.*, 2007). Tali cellule, indicate con l'acronimo BMMSC (*Bone Marrow-derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*), risiedono, appunto, nel midollo osseo in età post-natale, dove sembrano avere la funzione di ricreare un microambiente favorevole per la proliferazione e il differenziamento della componente cellulare ematopoietica (Friedenstein, 1989). Nella coltura *in vitro*, esse sono popolazioni di cellule aderenti, clonogeniche, non fagocitiche e di morfologia fibroblastoide (CFU-F) (Friedenstein, 1995; Bianco e Robey, 2000), che risultano eterogenee per quanto riguarda la dimensione delle colonie, la capacità proliferativa, l'immunofenotipo e il potenziale differenziativo (Bianco e Robey, 2000). È stato inoltre dimostrato sia *in vitro* che *in vivo* che le cellule BMMSC sono in grado di differenziare, in presenza di specifici stimoli induttivi, in cellule dell'osso, del tessuto adiposo, della cartilagine, del tessuto fibroso e del muscolo scheletrico e cardiaco (He *et al.*, 2007).

Per anni il midollo osseo ha rappresentato l'esclusiva fonte di cellule staminali ematopoietiche e di MSC multipotenti. Essendo la procedura estrattiva altamente invasiva per il donatore e la resa cellulare estremamente variabile e dipendente dall'età del soggetto (Nishida *et al.*, 1999; Mueller e Glowacki, 2001; Stenderup *et al.*, 2003), nell'ultimo decennio sono state oggetto di studio fonti alternative, quali il cordone ombelicale (Rubinstein *et al.*, 1993), il tessuto adiposo (Zuk *et al.*, 2002), la placenta (Kern *et al.*, 2006) e il sangue periferico (Seta e Kuvana, 2007).

2.4 Cellule staminali circolanti nel sangue periferico

L'esistenza di popolazioni circolanti di cellule staminali o progenitrici multipotenti è un argomento di ricerca che sta destando sempre più interesse nella comunità scientifica, in quanto può rappresentare un fattore chiave per assicurare la rigenerazione dei tessuti periferici (Kucia *et al.*, 2008). Ad esempio, le cellule HSC circolano continuamente a livelli molto bassi nel sangue per mantenere un *pool* di componenti ematopoietici nel compartimento midollare delle ossa periferiche. Tali HSC vengono mobilizzate nel sangue attraverso un trattamento farmacologico (somministrazione di *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, G-CSF) (Petit *et al.*, 2002), oppure in seguito ad un danno indotto al

midollo osseo (Kucia *et al.*, 2008). Ci sono, però, evidenze sempre più numerose della presenza in circolo di popolazioni cellulari non ematopoietiche che esprimono marcatori tipici di cellule staminali mesenchimali, di fibrociti, di progenitori muscolari scheletrici ed endoteliali e di cellule staminali epatiche (Kucia *et al.*, 2008).

Cellule fibroblastoidi ad attività clonogenica e proliferativa sono state identificate nel sangue periferico di diverse specie di animali adulti, quali il guinea pig (Kuznetsov *et al.*, 2001), il coniglio (Wan *et al.*, 2006), il cane (Huss *et al.*, 2000), il topo (Kuznetsov *et al.*, 2001), il ratto (Wu *et al.*, 2003) e infine anche l'uomo (He *et al.*, 2007). In coltura *ex vivo*, tali popolazioni si presentano aderenti alla plastica ed organizzate in tipiche colonie fibroblastoidi CFU-F. Denominate PB CFU-F (*Peripheral Blood Colony Forming Unit-Fibroblast*) (Maximow, 1928) o PBMSC (*Peripheral Blood-derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*) (He *et al.*, 2007), presentano poco espressi i marcatori:

- della linea ematopoietica, quali il CD34, il *marker* macrofagico CD14 e l'antigene leucocitario CD45;
- della linea endoteliale, quali il CD117 (c-Kit) e il CD31, la proteina procoagulante fattore VIII;
- del complesso di istocompatibilità di classe II (HLA-DR), la cui assenza ne determina la non immunogenicità.

Esse esprimono invece marcatori tipici della linea staminale mesenchimale (CD90, CD105, CD73) (He *et al.*, 2007) e il CD106 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e la proteina ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), che sono molecole che mediano l'adesione delle cellule stromali mesenchimali ai progenitori ematopoietici midollari (Tondreau *et al.*, 2005). All'interno della popolazione PB CFU-F sono state inoltre identificate cellule positive al CD133 (Tondreau *et al.*, 2005), marcatore tipicamente espresso da cellule con potenzialità ematopoietica, endoteliale, o emoangioblasti (Loges *et al.*, 2004). Studi *in vitro* e *in vivo* hanno evidenziato la potenzialità differenziativa delle PB CFU-F in senso osteogenico, adipogenico, condrogenico e miogenico (Kuznetsov *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003; Tondreau *et al.*, 2005).

È stato dimostrato che, in seguito ad un danno tissutale o in condizioni di stress, le cellule PBMSC vanno incontro ad un significativo incremento numerico, mediante un meccanismo ancora sconosciuto. Alcuni autori suggeriscono che tali cellule siano, in condizioni normali, accumulate a livello del midollo osseo (Kucia *et al.*, 2005) o in sedi periferiche diffuse (*nicchia staminale perivascolare*) (Shi e Gronthos, 2003) e che in

particolari condizioni fisiologiche o in seguito a danno tissutale, si attivino, migrando nel torrente sanguigno e stimolando il processo di rigenerazione del tessuto leso.

Per il processo di *homing*, le cellule staminali multipotenti devono abbandonare la loro nicchia di origine tramite la divisione mitotica asimmetrica che ne garantisce da un lato il *self-renewal* e dall'altro il *commitment* verso uno stato sempre più differenziato. Quest'ultimo processo può verificarsi con il passaggio delle cellule attraverso nicchie diverse che ne regolano il differenziamento (Watt e Hogan, 2000). Inoltre, devono venir meno le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice tra i componenti della nicchia e i progenitori indifferenziati, così da facilitarne l'ingresso nel flusso sanguigno. Il sangue periferico, quindi, potrebbe rappresentare una via di transito attraverso cui tali progenitori raggiungono il tessuto *target*, dove possono proliferare e differenziarsi ulteriormente. In base a queste considerazioni, alcuni studiosi ipotizzano che le cellule PBMSC possano derivare da cellule staminali primitive di tipo pluripotente (PSC) della nicchia midollare o perivascolare o da precursori tessuto-specifici (TCSC) che si accumulano nel midollo durante l'ontogenesi; esse verrebbero poi mobilitate nel sangue attraverso la stimolazione in condizioni fisiologiche, farmacologiche o patologiche dell'asse SDF-1 α /CXCR4 (Ratajczak *et al.*, 2003).

Kucia e collaboratori hanno inoltre osservato che il numero di cellule staminali non emopoietiche nel sangue periferico può essere aumentato dalla somministrazione di agenti simili a quelli impiegati per la mobilitazione di HSC (es. G-CSF) (Ratajczak *et al.*, 2004) o stimolati da fattori di stress associati ad un danno tissutale (es. infarto) (Kucia *et al.*, 2004). Un aumento di tali cellule nel sangue periferico in seguito a danno supporta l'ipotesi secondo la quale tali popolazioni possano giocare un ruolo importante nella rigenerazione dei tessuti. Quindi, è verosimile che i processi di rigenerazione locali coinvolgano il reclutamento non solo di progenitori presenti in sede, ma anche di cellule staminali specifiche per l'organo danneggiato, che risiedono nella nicchia staminale midollare o nella nicchia perivascolare.

3. Proprietà immunomodulatoria del trapianto cellulare

Uno dei punti critici dell'applicazione terapeutica delle cellule staminali è il fatto che esse potrebbero interferire con il sistema immunitario dell'organismo ricevente. Per questo motivo, l'immunogenicità e le proprietà immunomodulatorie delle MSC sono degli aspetti che vengono studiati accuratamente nella fase pre-clinica di caratterizzazione di una

popolazione destinata all'impiego per la terapia cellulare di disfunzioni tessutali (Nauta e Fibbe, 2007). Mentre la non immunoreattività delle cellule staminali è garantita dalla mancata espressione sulla membrana plasmatica degli antigeni del complesso di istocompatibilità di classe II (HLA-DR), molti studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che diversi tipi di SC, e soprattutto quelle mesenchimali, sono dotate di proprietà immunomodulatorie e immunosoppressive in virtù delle quali prevengono il rigetto del trapianto (Le Blanc e Ringden, 2005; Nauta e Fibbe, 2007). In seguito ad un danno o ad un trauma, la capacità di un tessuto di mantenere l'omeostasi e il *turnover* cellulare può essere compromessa dal processo infiammatorio correlato o dalla degradazione della ECM tessutale, con conseguente perdita dell'efficacia dell'azione rigenerativa della componente staminale. Proprio per questo si ricorre alla somministrazione di cellule staminali esogene, che possano ottimizzare il processo di riparazione del tessuto lesso. Il meccanismo attraverso il quale tali cellule agiscono non è ancora stato definito: fino ad ora sono stati ipotizzati a) la fusione delle cellule morte con le MSC, b) il loro differenziamento in cellule tessuto-specifiche e c) la loro attività di secrezione di fattori bioattivi (Semedo *et al.*, 2011). Nonostante i meccanismi con cui le MSC riparano il danno tessutale siano numerosi e complessi, si è consolidata sempre di più la teoria che esse agiscano mediante la secrezione paracrina ed endocrina di citochine e fattori solubili che nel sito *target* contribuiscono a rendere il microambiente responsivo alla rigenerazione. Il meccanismo è mediato dall'interazione con le cellule del sistema immunitario, quali linfociti, monoliti, cellule dendritiche e *Natural Killer* e porta all'attenuazione del processo infiammatorio indotto dalla lesione o dalla patologia da curare (Bifari *et al.*, 2010) (Figura 7).

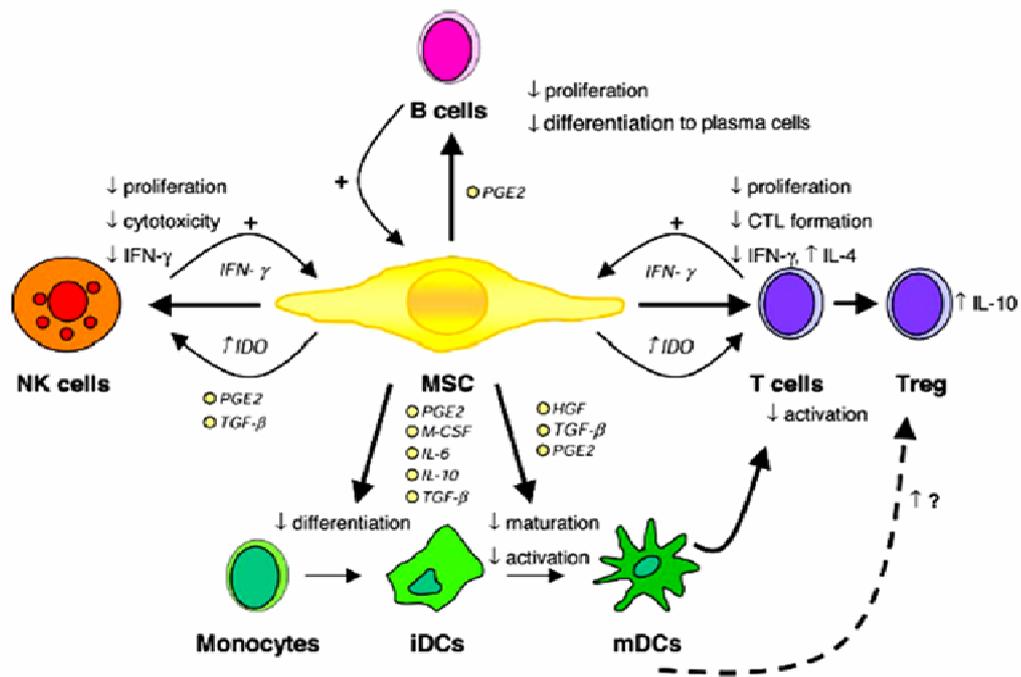


Figura 7. Proprietà immunomodulatorie delle cellule MSC

a) Regolazione dei linfociti T nei trapianti cellulari

La regolazione della proliferazione e del differenziamento dei linfociti T ha un ruolo importante nel carattere terapeutico delle MSC. Innanzitutto, in condizioni patologiche le MSC esogene tendono ad accumularsi nella milza e nei linfonodi, in particolare accanto alle cellule immunitarie come quelle dendritiche e i linfociti B e T, suggerendo un'interazione cellulo-specifica (Lim *et al.*, 2010). *In vitro*, le MSC inibiscono la proliferazione dei linfociti T sia tramite il contatto cellula-cellula, sia attraverso la secrezione di fattori umorali specifici quali IDO-1 (Indoleamina 2,3-diossigenasi-1) e Galectina-1. Inoltre queste cellule contribuiscono a diminuire la produzione linfocitaria delle citochine proinfiammatorie TNF α (*Tumor Necrosis Factor- α*) e INF γ (*Interferon- γ*) e ad aumentare la secrezione di interleuchina-10 (IL-10), probabilmente mediante la produzione di IDO-1 e di PGE2 (Prostaglandina E2) e l'espressione della molecola co-stimolatoria B7-H (Yoo *et al.*, 2009). Numerose evidenze sono emerse a dimostrazione del ruolo delle MSC nell'attivazione e nel reclutamento dei linfociti T_{Reg} attraverso l'espressione di HLA-G5 e di altre molecole (Selmani *et al.*, 2008). Questo prova che le cellule staminali possono modulare l'infiammazione non solo in modo diretto, ma anche indirettamente, stimolando l'intervento di cellule ad azione immunosoppressiva.

b) Regolazione dei linfociti B

Se da un lato sono numerosi gli studi sulla regolazione dei linfociti T da parte delle cellule staminali mesenchimali, ci sono invece poche e controverse evidenze sperimentali riguardo ad una loro azione modulatrice nei confronti delle cellule B. Alcune ricerche hanno dimostrato che le MSC possono inibire il differenziamento dei linfociti B in plasmacellule attraverso la produzione di fattori umorali (Corcione *et al.*, 2006).

c) Regolazione dei monociti/macrofagi

Queste cellule sono le maggiori responsabili della produzione di citochine nel sito di infiammazione e quindi rappresentano uno dei punti critici dell'immunomodulazione. Recentemente Maggini e colleghi hanno dimostrato che le cellule staminali mesenchimali modulano l'attività di monociti e macrofagi inibendo la loro produzione di citochine pro-infiammatorie, quali TNF α , IL-6 e INF γ (Maggini *et al.*, 2010). Inoltre, in presenza di infiammazione, le MSC producono citochine anti-infiammatorie come IL-10, bloccando l'attivazione delle cellule del sistema immunitario, attenuando il processo infiammatorio e controllando l'estensione del danno tissutale. Infine, le cellule MSC promuovono la fagocitosi delle cellule apoptotiche ripulendo il sito danneggiato ed inibiscono il differenziamento delle cellule dendritiche derivanti dai monociti. Questi effetti sembrano essere mediati dalla secrezione di PGE₂, che ha un effetto diretto sull'attivazione dei macrofagi (Kronsteiner *et al.*, 2011).

d) Regolazione delle cellule dendritiche

Le cellule dendritiche (*Dendritic Cells*, DC) svolgono un ruolo fondamentale nella presentazione dell'antigene e nella modulazione dell'attività linfocitaria. È stato dimostrato che, attraverso il contatto cellula-cellula e la secrezione di PGE₂ e IL-6, le cellule staminali mesenchimali sono in grado di inibire la maturazione delle DC, che di conseguenza mostrano un'espressione *downregolata* di molecole costimolatorie (CD80 e CD86) e molecole MHC di classe II (Aggarwal e Pittenger, 2005).

e) Regolazione delle cellule Natural Killer

L'azione immunomodulatrice delle MSC sulle cellule *Natural Killer* (NK) è ancora poco conosciuta, ma ci sono alcune evidenze riguardo all'inibizione di questi effettori della reazione immunitaria mediante la secrezione di HLA-G5 e PGE₂ da parte delle cellule staminali mesenchimali (Semedo *et al.*, 2011). È importante considerare l'effetto delle

MSC sul sistema immunitario in regime di controllo dell'insorgenza di tumori, che è dovuto proprio all'inibizione delle cellule NK (Li *et al.*, 2011).

4. Cellule staminali e prodotti di ingegneria tissutale

L'intervento terapeutico di difetti strutturali e/o funzionali dei tessuti solidi può prevedere l'impiego di matrici naturali o sintetiche ingegnerizzate con cellule staminali; tale strategia rientra nel campo dell'ingegneria tissutale.

Il termine *tissue engineering* (ingegneria tissutale) è stato coniato circa vent'anni fa per indicare “una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dell'organismo e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne la funzionalità”. In tale settore convergono significativi contributi delle scienze di base, della scienza dei biomateriali, della bioingegneria, delle biotecnologie, della biologia cellulare e della medicina rigenerativa (Langer e Vacanti, 1993).

La creazione di tessuti *ex novo* a partire da cellule, biomateriali di supporto e specifici fattori di crescita ha suscitato un interesse sempre maggiore nella comunità scientifica, in quanto rappresenta un nuovo approccio terapeutico che potrebbe ovviare ai limiti che caratterizzano l'attuale terapia del trapianto d'organo e dell'impianto di protesi artificiali per il recupero di tessuti ed organi parzialmente o del tutto compromessi a causa di traumi, malattie congenite o patologie tumorali (Langer e Vacanti, 1993).

4.1 Il danno tissutale

La perdita dell'integrità strutturale di un tessuto o la compromissione funzionale di un organo a causa di eventi patologici o traumatici è uno dei più importanti e costosi problemi della pratica clinica moderna (Shieh e Vacanti, 2005). La risposta da parte dell'organismo ad un danno di media o alta entità consiste principalmente nei processi di riparazione che mirano a limitarlo nella prima fase tramite la formazione di tessuto cicatriziale. Tale tessuto è essenzialmente collagenoso e non ristabilisce la composizione fisiologica del tessuto danneggiato. Questa, dunque, è una risposta preliminare che può essere efficace, ma non sufficiente per ripristinare la struttura e la funzione fisiologica del sito del danno. Risulta quindi necessario un intervento di tipo medico-chirurgico che possa far fronte in modo più esaustivo alla riparazione del danno tissutale. I trattamenti chirurgici attualmente

in uso nella pratica clinica prevedono, a seconda dei casi, quattro possibili approcci: il trapianto di un organo da donatore (trapianto allogenico), il trapianto di tessuto autologo, il trapianto di protesi sintetiche e il trattamento farmacologico (Williams, 2006) (Figura 8).

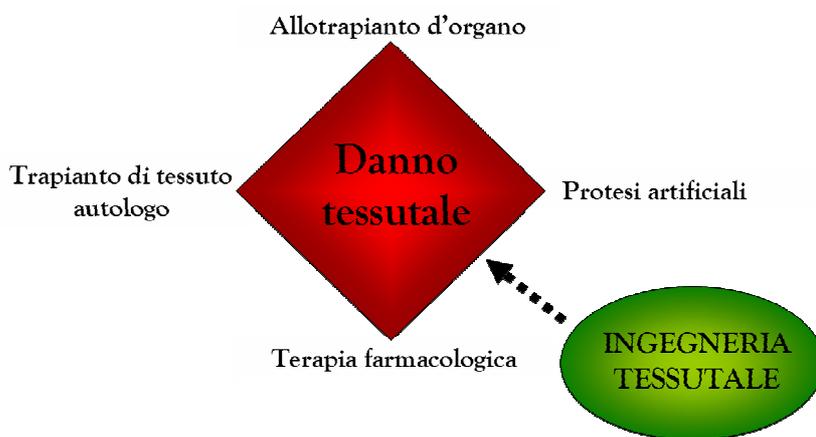


Figura 8. Approcci terapeutici per il recupero di un danno tissutale

Nonostante gli incoraggianti risultati ottenuti mediante l'impiego di una di tali strategie, il recupero di danni tissutali costituisce ancora un problema irrisolto della moderna. Un limite del trapianto allogenico è, ad esempio, rappresentato dall'esiguo numero di donazioni e dalla obbligatoria terapia immunosoppressiva a cui il ricevente deve sottoporsi per il resto della sua vita.

Il trapianto autologo, sebbene rappresenti una soluzione ideale in ragione dell'assenza di rischio di rigetto, può comportare la compromissione strutturale e funzionale del sito di prelievo del tessuto.

L'uso di dispositivi protesici si è rivelato, negli ultimi anni, un approccio vincente da un punto di vista clinico-medico: le protesi di anca e di ginocchio (Behairy e Jasty, 1999), le lenti intraoculari per il trattamento della cataratta (Lloyd *et al.*, 2001), l'impianto di pacemaker per la correzione delle aritmie cardiache (Bourke *et al.*, 2002) e le valvole cardiache artificiali (Moffatt-Bruce *et al.*, 2004) rappresentano alcuni esempi di applicazione della strategia protesica nella pratica clinica. Sebbene sia riconosciuto il loro grande potenziale terapeutico, essi possono comportare reazioni di rigetto e, a causa della loro natura sintetica, si adattano scarsamente ai processi di crescita naturale del sito di impianto (Williams, 2006).

In base alle precedenti considerazioni, si può comprendere come l'ingegneria tissutale possa essere una valida soluzione o almeno un'alternativa plausibile ai trattamenti sopra citati (Figura 8).

4.2 Gli “strumenti” dell'ingegneria tissutale

Per stimolare un processo di rigenerazione di tessuti ed organi, l'ingegneria tissutale si avvale di tre diversi strumenti: a) cellule, b) matrici di supporto (*scaffold*) e c) fattori di crescita (Figura 9). Ciascuno di tali elementi può essere funzionale al ripristino della funzionalità di un organo perché contribuisce direttamente o indirettamente alla formazione di neotessuto: i trapianti cellulari, mediante secrezione di specifica matrice extracellulare (ECM), lo *scaffold* per garantire un adeguato sostegno strutturale e i fattori di crescita per la modulazione della risposta cellulare (Ikada, 2006). La combinazione dei tre elementi porta alla definizione di prodotti avanzati di ingegneria tissutale (sostituto tissutale ingegnerizzato).

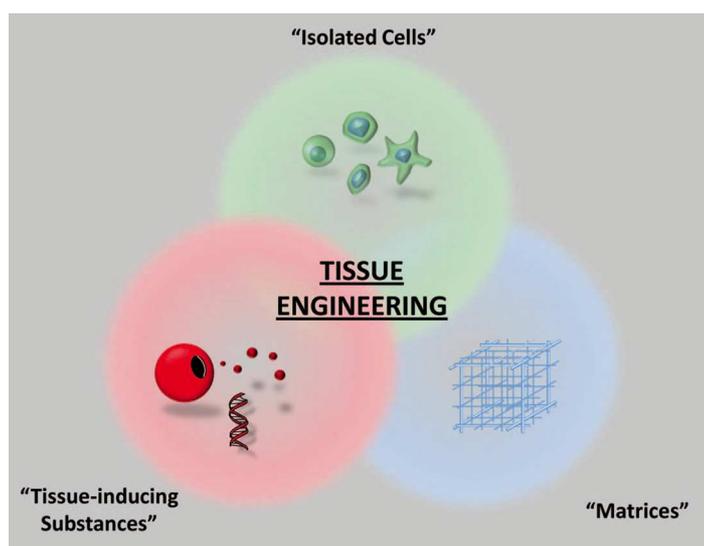


Figura 9. Il paradigma dell'ingegneria tissutale

a) Cellule

Il potenziale terapeutico del sostituto tissutale ingegnerizzato è fortemente dipendente dalle caratteristiche della componente cellulare, quali l'origine e il grado di staminalità. Le cellule destinate ad un impiego nella medicina rigenerativa possono essere di origine autologa (derivanti dal paziente stesso), allogenica (provenienti da un altro individuo) o xenogenica (estratte da un'altra specie animale). Le cellule autologhe risultano chiaramente le candidate ideali, in quanto quelle di origine eterologa richiedono la

somministrazione al paziente di un trattamento immunosoppressivo. Sono comunemente impiegate cellule tessuto- o organo-specifiche (cellule staminali unipotenti) o cellule staminali multipotenti. Le cellule tessuto-specifiche contribuiscono in modo limitato al processo di rigenerazione *ex vivo* perché sono dotate di un basso potenziale proliferativo e differenziativo rispetto alle cellule staminali multipotenti. Pertanto negli ultimi anni la ricerca scientifica sta promuovendo programmi terapeutici basati sull'impiego di popolazioni ad elevato grado di staminalità (Wong *et al.*, 2010; Bianco e Robey, 2001).

b) Scaffold

Gli *scaffold* o matrici di supporto sono biomateriali naturali o sintetici che forniscono alle cellule sostegno meccanico-strutturale e protezione fisica e consentono la veicolazione di cellule o di fattori bioattivi e modulano le interazioni cellula-matrice necessarie per la rigenerazione tessutale (Furth *et al.*, 2007). Gli *scaffold* ingegnerizzati ricreano *in vivo* un ambiente extracellulare adatto alla rigenerazione tessutale (Place *et al.*, 2009). A causa della scarsa disponibilità di biomateriali naturali di origine autologa, allogenica e xenogenica, l'impiego di *scaffold* sintetici in forma di biopolimeri e idrogel ha avuto un forte sviluppo nell'ultimo decennio (Drury e Mooney, 2003).

c) Fattori di crescita

Sono proteine che svolgono un ruolo chiave nei processi di proliferazione e differenziamento cellulare. Possono essere estratti da tessuti oppure prodotti mediante tecniche di trasfezione batterica. L'interesse che suscitano è legato alle loro potenzialità di impiego nel processo di ottimizzazione di un sostituto tessutale. I fattori più comunemente utilizzati nell'ambito dell'ingegneria tessutale sono: *bone morphogenetic protein* (BMP), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *vascular epithelial growth factor* (VEGF) e *transforming growth factor- β* (TGF- β) (Tabata, 2003).

5. L'ingegneria tessutale valvolare cardiaca

Una delle più interessanti e promettenti applicazioni terapeutiche basate sull'utilizzo delle cellule staminali combinate con *scaffold* di supporto per il recupero di danni e disfunzioni tessutali è l'ottenimento di valvole cardiache ingegnerizzate.

5.1 Le valvole cardiache

Le valvole cardiache sono strutture che regolano il flusso del sangue all'interno del cuore (Figura 10). Si tratta di appendici di tessuto essenzialmente fibroso, rivestite da endocardio, che controllano il passaggio del sangue attraverso gli orifizi che collegano gli atri con i ventricoli ed i ventricoli con l'arteria aorta o l'arteria polmonare (Stevens e Lowe, 1997). Esse comprendono:

- la valvola tricuspide;
- la valvola bicuspide o mitrale;
- la valvola aortica formata da tre cuspidi semilunari;
- la valvola polmonare dotata di tre cuspidi semilunari.

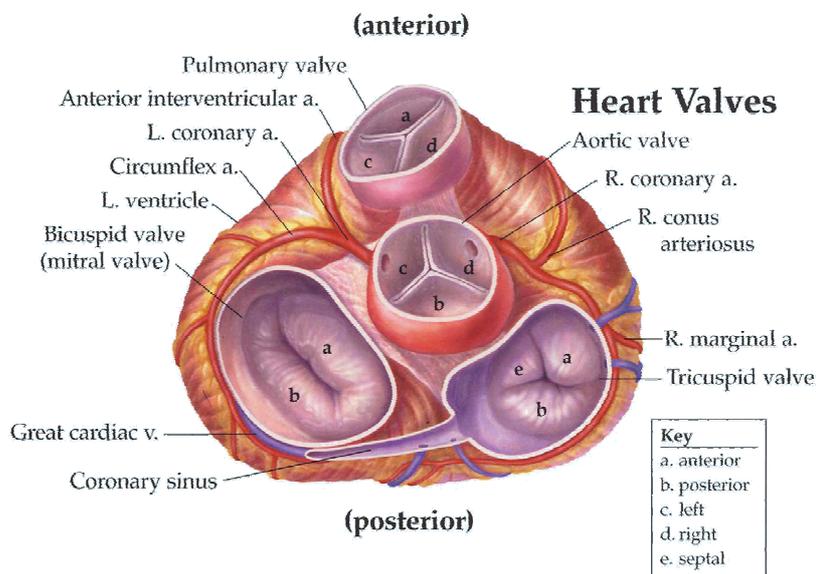


Figura 10. Anatomia delle valvole cardiache

Ciascuna valvola semilunare è costituita da tre lembi a forma di nido di rondine, ognuno dei quali presenta un margine aderente, attaccato alla linea di trapasso tra ventricolo e arteria, e un margine libero che sporge nel lume del vaso.

Al centro del margine libero, ciascun lembo presenta un inspessimento nodulare che serve a far meglio aderire i tre lembi durante la chiusura (Goglia, 1999).

L'apertura e la chiusura delle valvole sono dipendenti dalle variazioni pressorie intracardiache. Non esiste, infatti, alcun tipo di controllo nervoso o muscolare sull'attività valvolare (Swanson e Clark, 1974). Garantendo una resistenza efficace e passiva, le valvole impediscono il reflusso del sangue verso gli atri durante la fase sistolica o

"contrazione ventricolare" (valvole tricuspide e bicuspide) o verso i ventricoli durante la fase diastolica o "rilasciamento ventricolare" (valvole semilunari).

Tutte le valvole cardiache presentano una struttura generale in cui si riconoscono: un disco centrale di tessuto fibroso denso che si estende dal tessuto connettivo del corpo fibroso centrale e dagli anelli valvolari, uno strato fibroelastico e uno strato esterno di endotelio (*endocardio*) (Favaro, 1914).

Tali strati, il cui spessore varia da valvola a valvola, da zona a zona e con l'età del soggetto, formano tre diverse tonache denominate (Figura 11):

1. *ventricularis*, che è presente sul lato ventricolare, nella zona di afflusso, ed è per lo più costituita da fibre elastiche (Filovà *et al.*, 2009);
2. *spongiosa*, che è presente nella parte mediana, ed è un tessuto lasso, ricco di glicosamminoglicani e collagene (Mendelson e Schoen, 2006);
3. *fibrosa o arterialis*, che definisce la superficie valvolare nella alla zona di deflusso e presenta una componente fibrosa molto sviluppata (Filovà *et al.*, 2009).

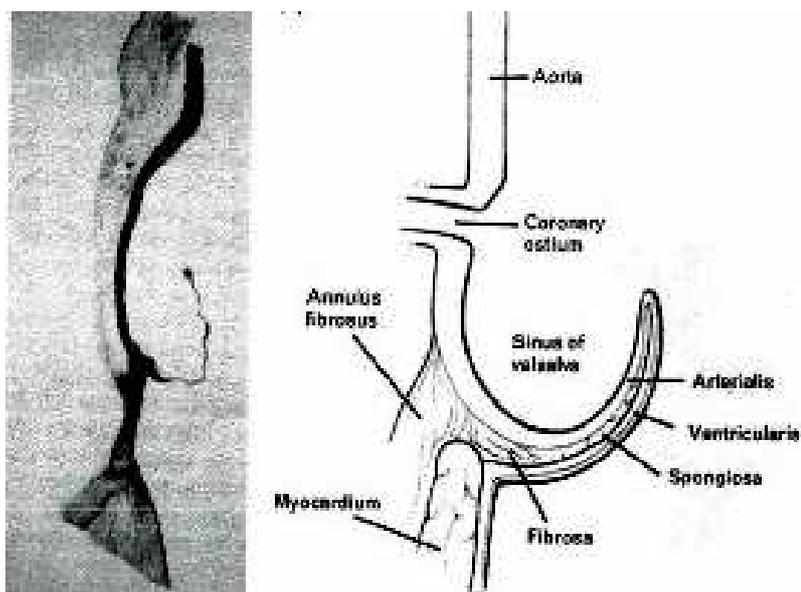


Figura 11. Istologia della valvola cardiaca.

Nelle valvole si distingue una componente cellulare comprendente:

1. cellule endoteliali valvolari (VEC) (Filovà *et al.*, 2009);
2. cellule interstiziali valvolari (VIC) (Filovà *et al.*, 2009).

Le VEC formano sulla superficie di ogni lembo valvolare un rivestimento funzionale deputato a mantenere una superficie non trombogenica e a modulare l'attività delle cellule VIC sottostanti (Filovà *et al.*, 2009).

Le VIC sono il tipo cellulare maggiormente rappresentato nella valvola, presentano le caratteristiche morfologiche e funzionali dei fibroblasti e sono essenziali per il mantenimento delle strutture valvolari, in quanto sono deputati alla produzione della matrice extracellulare (ECM). Rappresentano una popolazione eterogenea in cui si riconoscono sottotipi diversi, presentanti le caratteristiche tipiche di:

1. fibroblasti;
2. miofibroblasti;
3. cellule muscolari lisce di tipo fetale (SMC).

Le SMC ed i miofibroblasti sono essenzialmente localizzati nella tonaca fibrosa, mentre i fibroblasti sono presenti essenzialmente in quella ventricolare. La spongiosa è in generale lo strato più povero di cellule. I miofibroblasti sono caratterizzati da un'alta espressione di α -actina muscolare liscia e da numerose fibre di stress; sono cellule attive nella proliferazione e nella migrazione.

I fibroblasti sono essenziali per il *turnover* del tessuto valvolare perché sono attivi nella sintesi di fattori di crescita, citochine, componenti della matrice extracellulare (collagene, elastina, proteoglicani, fibronectina) ed enzimi (metalloproteinasi e loro specifici inibitori) (Taylor *et al.*, 2003).

Le SMC, dotate di capacità contrattile, garantiscono il mantenimento di una forza valvolare intrinseca e la resistenza alle pressioni emodinamiche alle quali le valvole sono sottoposte. Nel loro insieme le VIC mantengono la stabilità e l'integrità delle valvole e sono primariamente coinvolte nella sintesi e nel rimodellamento della matrice extracellulare (Fayet *et al.*, 2003).

La tabella 1 riassume le componenti strutturali delle valvole cardiache e le loro funzioni.

Componenti	Sub-strutture	Funzione
Matrice extracellulare	Collagene	Fornisce la resistenza e la rigidità per mantenere la coaptazione durante la diastole (quando la cuspidè presenta massima distensione)
	Elastina	Permette l'estensione in diastole e la contrazione in sistole (quando la cuspidè presenta minima distensione)
	Glicosamminoglicani	Fungono da cuscini ammortizzando gli urti ricevuti durante il ciclo della valvola
Cellule	Endoteliali	Assicurano la non trombogenicità della superficie valvolare, regolano reazioni infiammatorie ed immunitarie
	Interstiziali	Sintetizzano ECM, MMP, TIMP e median oil rimodellamento della matrice extracellulare

Tabella 1. Elementi strutturali delle valvole cardiache (Mendelson e Shoen, 2006).

5.1.1 Valvola semilunare aortica

La valvola semilunare aortica o valvola aortica (diametro di 20 mm) regola il flusso sanguigno dal cuore verso il circolo sistemico. Localizzata presso l'orifizio che collega l'aorta al ventricolo sinistro, la valvola ha una struttura a nido di rondine. Erroneamente si considera come unica valvola la somma dei tre lembi o cuspidi, in realtà ogni lembo costituisce una valvola e la loro posizione sfalsata assicura la chiusura del vaso impedendo il reflusso del sangue nel ventricolo. Tali lembi hanno una caratteristica forma a semiluna, e per questo sono detti cuspidi semilunari; essi presentano un ispessimento fibroso marginale, detto nodulo di Aranzio, che ottimizza la chiusura della valvola (Stevens e Lowe, 1997). Tale ispessimento è talora visibile come una linea bianca e pertanto viene detto linea alba (Stevens e Lowe, 1997). La valvola aortica risulta strutturalmente più robusta della valvola polmonare.

5.1.2 Valvola semilunare polmonare

La valvola semilunare polmonare o valvola polmonare (diametro di 20 mm) regola il flusso sanguigno dal cuore verso la circolazione polmonare. Come la valvola aortica, si presenta suddivisa in tre cuspidi semilunari, la cui chiusura è completata da un ispessimento fibroso che prende il nome di nodulo di Morgagni (Stevens e Lowe, 1997). L'ispessimento fibroelastico risulta di minor grado rispetto a quello che si osserva nella valvola aortica, poiché le cuspidi sono soggette ad una minore sollecitazione meccanica indotta dal flusso ematico, la cui pressione è inferiore nel circolo polmonare rispetto al sistemico (Stevens e Lowe, 1997).

5.2 Valvulopatie

Le malattie delle valvole cardiache rappresentano un grave problema sanitario: attualmente la valvulopatia, in particolare quella aortica, è una delle più frequenti cause di mortalità a livello mondiale.

5.2.1 Stenosi valvolare aortica

Sebbene le valvole aortiche possano diventare stenotiche per cause differenti, nella maggior parte dei casi la stenosi è dovuta a malformazioni congenite o a degenerazione calcifica (Dare *et al.*, 1993). I mutamenti degenerativi che si verificano nel corpo umano coinvolgono anche valvola aortica e radice. L'età determina un ispessimento delle fibre di collagene a livello delle cuspidi; tali fibre sembrano anche perdere il loro orientamento. Si verifica inoltre un aumento delle fibre elastiche dovuto più alla frammentazione delle stesse che ad un aumento effettivo di numero (Fleg, 1986). Altri cambiamenti correlati all'età includono un accumulo di prodotti di degradazione cellulare, come lipidi e calcio. Questo è dovuto probabilmente ad un insufficiente meccanismo "scavenger" microvascolare nelle cuspidi valvolari (Kim *et al.*, 1976). Il risultato è un aumento del grado di calcificazione, particolarmente nelle zone di maggiore stress meccanico per i lembi, che sono le zone di ancoraggio. Una volta iniziato il processo di calcificazione a livello della linea di ancoraggio del lembo, la distribuzione dello stress sulle rimanenti parti di cuspidi cambia e la calcificazione progredisce di solito lungo la linea di coaptazione. Questi cambiamenti correlati all'età risultano nell'ispessimento della valvola e nella riduzione di distensibilità dei lembi. Nelle valvole bicuspidi è stato proposto il trauma meccanico come possibile meccanismo di calcificazione (Kim *et al.*, 1976). La lunghezza differente dei margini liberi dei due lembi ne determina un anomalo contatto, che produce tensione e quindi trauma meccanico; ne consegue un focale ispessimento fibroso che causa calcificazione distrofica. Quest'ipotesi spiega perché la stenosi che coinvolge la valvola bicuspidi è il risultato di un trauma dei lembi ma non spiega perché alcune valvole aortiche bicuspidi funzionino efficacemente senza creare problemi indefinitamente.

La calcificazione, quando insorge, coinvolge l'intera superficie del lembo. La storia naturale della stenosi aortica nell'adulto è caratterizzata da un periodo prolungato di latenza in cui morbilità e mortalità sono molto basse (Bonow *et al.*, 1998). La terapia medica durante questo intervallo di tempo consiste principalmente nella riduzione del postcarico (esso rappresenta la somma delle resistenze periferiche; clinicamente, è

approssimativamente equivalente alla pressione arteriosa sistemica al momento dell'apertura della valvola aortica). La comparsa di sintomi, quali angina, sincope o scompenso cardiaco, identifica un momento critico nella progressione della stenosi aortica, per cui risulta necessario intervenire chirurgicamente.

5.2.2 Insufficienza valvolare aortica

L'insufficienza aortica può interessare la valvola, l'aorta ascendente o entrambe (Olson *et al.*, 1984). Le più comuni cause di insufficienza aortica sono la dilatazione della radice aortica, la patologia post-infiammatoria o reumatica, l'incompleta chiusura di una valvola congenitamente bicuspidale e l'endocardite infettiva. Nella febbre reumatica, le cuspidi valvolari aortiche diventano fibrose e tendono a retrarsi. Questo causa la mancata coaptazione dei lembi durante la diastole e conseguentemente un rigurgito centrale. La fusione delle commissure può inoltre impedire l'apertura della valvola, determinando stenosi associata a rigurgito. Altre cause primarie di rigurgito aortico sono l'incompleta chiusura e/o il prollasso di un lembo di valvola bicuspidale.

Cause meno comuni includono traumi, rottura di una valvola congenitamente fenestrata e rigurgito associato a patologie sistemiche, come il lupus eritematoso, l'artrite reumatoide, la spondilite anchilosante, la sifilide e la malattia di Takayasu o il rigurgito associato alla malattia di Chron o di Whipple (Braunwald, 1997).

L'incidenza di pazienti sottoposti a chirurgia per rigurgito aortico puro, secondario a patologia della radice aortica con successiva dilatazione, è andata crescendo negli anni e oggi ammonta a circa il 50% dei casi (Dare *et al.*, 1993). Cambiamenti correlati all'età che interessano la radice aortica e l'aorta ascendente includono l'accumulo di sostanza *ground*, frammentazione delle fibre elastiche, graduale sostituzione di cellule muscolari lisce con collagene, causando un graduale irrigidimento della radice aortica che tende a dilatarsi con l'età.

Altre condizioni patologiche, associate a dilatazione della radice aortica, includono l'ipertensione (Waller *et al.*, 1982), o altre patologie associate ad anomalie del connettivo come l'osteogenesi imperfetta (Stein e Kloster, 1977). Tutte queste condizioni non colpiscono inizialmente la valvola aortica, ma la dilatazione della radice; il conseguente rigurgito aortico centrale, ovvero il reflusso di sangue dall'aorta nel ventricolo sinistro in diastole, può secondariamente coinvolgere i lembi valvolari che diventano spessi e retratti, aggravando la disfunzione.

L'alterazione della funzionalità ventricolare sinistra è un *marker* precoce dei conseguenti sintomi, come angina, dispnea e scompenso cardiaco. Come per la stenosi aortica, divenuto il paziente sintomatico, la condizione spesso degenera rapidamente e la sopravvivenza dei pazienti con scompenso cardiaco generalmente non supera i due anni (Braunwald, 1997). Le indicazioni attuali per la chirurgia sono insufficienza valvolare acuta, insufficienza valvolare severa, associate o no a sintomatologia o a ventricolo sinistro dilatato, insufficienza ventricolare sinistra e pazienti sintomatici.

5.3 Terapia delle valvulopatie

La terapia attualmente più diffusa per la cura delle patologie valvolari cardiache è la chirurgica protesica finalizzata alla sostituzione delle valvole non funzionanti. Tali protesi si possono dividere in due tipi: quelle meccaniche e quelle biologiche.

5.3.1 Protesi valvolari meccaniche e biologiche

Le protesi valvolari meccaniche sono costituite essenzialmente da carbonio pirolitico combinato con componenti metallici e polimerici; ne esistono tre sottotipi diversi: le protesi a palla (*caged-ball*), quelle a disco oscillante (*tilting-disk*) e quelle a due emidischi (*bileaflet*) (Figura 12).

La prima valvola artificiale, impiantata nel 1952, era quella a palla, costituita da una gabbia di metallo contenente una palla di silicone. Durante la contrazione del cuore, quando la pressione sanguigna all'interno dei ventricoli o degli atri superava quella esterna, la palla veniva spinta contro la gabbia e permetteva al sangue di affluire o defluire. Una volta terminata la fase di contrazione, la pressione nelle camere cardiache diminuiva e la palla tornava di nuovo in corrispondenza della base della gabbia, creando una sorta di chiusura al passaggio del flusso sanguigno (Hufnagel *et al.*, 1958).

Una tipologia più avanzata di valvola cardiaca artificiale è quella a disco oscillante, usata per la prima volta in clinica nel 1969. Questa protesi è costituita da un anello di metallo rivestito da politetrafluoroetilene (PTFE) che, attraverso due supporti metallici, sostiene un disco di carbonio pirolitico che si apre e si chiude quando il cuore pompa sangue attraverso la valvola (Björk, 1977).

La valvola meccanica più innovativa è quella a due emidischi, il cui uso in cardiocirurgia è stato introdotto nel 1979 dalla compagnia americana St. Jude Medical. Essa consiste di due foglietti semicircolari che ruotano attorno a due supporti ancorati alla struttura della valvola, la quale è fatta interamente di carbonio pirolitico; si evita, quindi, l'uso

dell'acciaio inossidabile che caratterizzava le protesi più primitive. Pur essendo più sensibile ai fenomeni di reflusso, la protesi a due emidischi assicura un flusso sanguigno molto più naturale rispetto a quelle a palla e a disco oscillante ed è quella che garantisce l'area di apertura più grande (Emery *et al.*, 1979).

Le protesi meccaniche per la chirurgia valvolare, pur avendo il vantaggio di essere durature in virtù dei materiali di cui sono costituite, presentano numerosi limiti dovuti alla possibile formazione di trombi, all'insorgenza di endocarditi che si sviluppano soprattutto sulla superficie del materiale estraneo e ai rischi legati alla terapia immunosoppressiva che si rende necessario somministrare al paziente vita natural durante (un esempio sono le eventuali complicazioni emorragiche) (Filovà *et al.*, 2009).

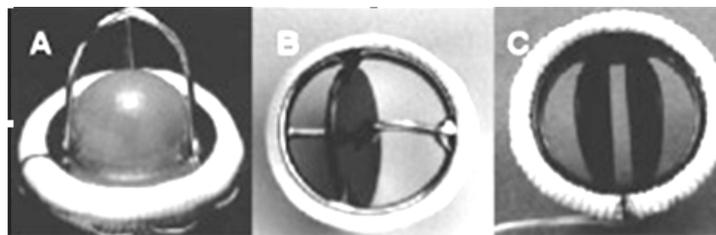


Figura 12. Protesi meccaniche (A: *caged-ball*; B: *single-tilting disk*; C: *bileaflet-tilting disk*)

La ricerca di una soluzione ai problemi legati all'impianto delle valvole meccaniche ha portato allo sviluppo delle protesi valvolari biologiche, che sono in uso fin dagli anni '70. Esse possono essere eterologhe, composte da tessuto porcino o bovino montato su di un supporto metallico e non, oppure omologhe, ossia valvole umane aortiche prelevate da cadavere (Vesely, 2005) (Figura 13). Se da un lato queste protesi hanno il vantaggio di ridurre il rischio di trombogenesi, il principale problema legato al loro utilizzo è la durata limitata: esse infatti vanno incontro a biodegradazione e devono essere sostituite dopo circa 10-15 anni dall'impianto. Tale degenerazione è causata da molti fattori, come la reazione immulogica del paziente al trapianto, o l'eccessiva produzione di tessuto fibroso stimolata dalla protesi stessa (Filovà *et al.*, 2009).

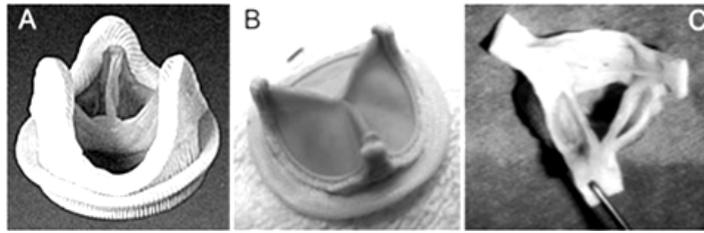


Figura 13. Protesi biologiche (A: porcina; B: bovina; C: omologa)

Sebbene la chirurgia sostitutiva protesica abbia dimostrato di modificare sostanzialmente il corso della malattia valvolare, sia le protesi meccaniche che quelle biologiche hanno il grande limite di non poter adattarsi alle esigenze fisiologiche ed emodinamiche del paziente. E' stato dimostrato che, entro 10 anni dall'intervento, nel 60% dei casi si verifica una serie di complicazioni correlate all'impianto protesico, quali la limitata durata, la trombogenicità, l'insorgenza di processi infiammatori nel sito di impianto e il limitato o del tutto assente potenziale di crescita e di rimodellamento (Wassenaar *et al.*, 1997). Di conseguenza, si stanno cercando delle strategie per migliorare la qualità delle protesi valvolari cardiache costruendo valvole bioartificiali tramite tecniche di ingegneria tessutale.

5.3.2 Protesi biologiche ingegnerizzate sintetiche e naturali

Per ovviare ai problemi derivati dall'impianto delle protesi valvolari meccaniche e biologiche è nata l'ingegneria tessutale valvolare cardiaca (*Tissue Engineered Heart Valve*, TEHV), che ha l'obiettivo di ricreare la struttura e la funzionalità della valvola nativa mediante l'utilizzo di un'adeguata matrice di supporto che sia in grado di mimarne l'anatomia e l'istologia e una popolazione cellulare capace di sostenere il ripopolamento del supporto con cellule simil VEC e VIC (Neuenschwander e Hoerstrup, 2004).

Una matrice biologica ingegnerizzata funzionale deve garantire:

- ✓ adeguate proprietà meccaniche ed emodinamiche;
- ✓ l'adesione, il differenziamento e la proliferazione di cellule endoteliali ed interstiziali valvolari;
- ✓ nessun rischio trombogenico, immunologico e di calcificazione;
- ✓ una crescita e un rimodellamento appropriati allo sviluppo del paziente e alle sue richieste fisiologiche.

Per la realizzazione del costrutto ingegnerizzato si possono usare *scaffold* sintetici preparati con polimeri quali l'acido polilattico, poliglicolico e poliidrossialcanoato

(Vesely, 2005); le strutture tridimensionali ottenute risultano riassorbibili, non tossiche e di grandezza confrontabile con quella dei lembi valvolari nativi (Knight *et al.*, 2008). La tecnica di produzione di tali supporti risulta essere riproducibile ed il prodotto finale è caratterizzato da un basso potenziale immunologico (Brody e Pandit, 2007).

In alternativa, le matrici biologiche ingegnerizzate possono essere preparate per decellularizzazione di un tessuto eterologo (valvole cardiache porcine e bovine). Tale procedura consiste nella rimozione di tutti gli elementi immunogenici quali cellule (VEC, VIC) e acidi nucleici, senza però causare alterazioni significative delle proprietà strutturali del tessuto (Brody e Pandit, 2007). La rimozione di tutti gli epitopi immunogeni è essenziale per l'ottenimento di un costrutto destinato all'impianto *in vivo*. Inoltre, la rimozione degli acidi nucleici, in particolare del DNA, previene la calcificazione della protesi e, conseguentemente, la degenerazione a lungo termine dell'impianto (Ketchedjian *et al.*, 2005). La procedura di acellularizzazione deve anche consentire l'allontanamento di tutti i residui di detergenti utilizzati, così da evitare, in seguito a ripopolamento, incontrollabili fenomeni di apoptosi cellulare (Ketchedjian *et al.*, 2005). Valvole biologiche acellulari sono state ampiamente testate in modelli animali e in alcuni casi in pazienti umani (Simon *et al.*, 2003).

Una protesi acellulare ideale presenta caratteristiche meccaniche che le conferiscono funzionalità immediatamente dopo l'impianto (Knight *et al.*, 2008), conserva nel tempo le sue proprietà emodinamiche e sostiene il ripopolamento cellulare grazie al mantenimento della sua struttura tridimensionale tipica, della lamina basale e della fibronectina, che sono modulatori essenziali per la crescita e la migrazione cellulare (Grauss *et al.*, 2005). I numerosi metodi di decellularizzazione sperimentati nel corso dell'ultimo ventennio hanno previsto l'utilizzo di enzimi quali tripsina ed endonucleasi, e di detergenti quali: sodio dodecil solfato (SDS), sodio colato (SC) e sodio deossicolato (SD), Triton X-100.

Diversi gruppi di ricerca hanno inoltre sviluppato specifici protocolli di decellularizzazione combinando due o più agenti, con lo scopo di rimuovere tutta la componente cellulare recando il minimo danno alla matrice. Tali procedure hanno previsto l'uso combinato di: a) SDS e tripsina (Wilcox *et al.*, 2005); b) SD e Triton X-100 (Rieder *et al.*, 2004); c) SC e Triton X-100. Quest'ultimo protocollo, denominato metodo TRICOL, prevede l'utilizzo di Triton X-100, SC, soluzioni ipo- e iper-toniche e Benzonase. Esso è stato sviluppato da Spina e collaboratori (Spina *et al.*, 2003; Iop *et al.*, 2009) per la decellularizzazione delle valvole porcine aortiche e polmonari.

5.3.3 Cellule per l'ingegneria tissutale valvolare

Per le loro distinte proprietà proliferative e multidifferenziative, le cellule staminali di origine autologa o allogenica (Mendelson e Schoen, 2006) e progenitori tessuto-specifici (endoteliali e miofibroblasti, McBrearty *et al.*, 1998) risultano le candidate ideali per l'applicazione in ingegneria tissutale valvolare.

a) Cellule staminali isolate da midollo osseo

Sono cellule multipotenti con proprietà adatte all'impiego nell'ingegneria valvolare cardiaca: a) possono essere estratte senza la compromissione delle strutture vascolari sane del paziente; b) sono dotate di un elevato potenziale differenziativo; c) presentano attività immunomodulatorie dopo trapianto *in vivo* (Weber *et al.*, 2012). Utilizzate per ingegnerizzare una matrice valvare, hanno risposto allo stimolo della matrice organizzandosi in un tessuto stratificato (Hoerstrup *et al.*, 2002b) e secernendo proteine di matrice extracellulare caratteristiche della valvola cardiaca, quali il collagene I e III e glicosaminoglicani. L'analisi ultrastrutturale della valvola ingegnerizzata ha dimostrato che le cellule staminali hanno acquisito un'attività secretoria simile a quella dei miofibroblasti, essendo in grado di produrre filamenti di actina e miosina, fibrille di collagene ed elastina (Hoerstrup *et al.*, 2002). Non è stata osservata alcuna forma di differenziamento cellulare in strato ventricolare, spongioso e fibroso.

b) Cellule staminali isolate da cordone ombelicale

Il cordone ombelicale rappresenta una fonte ideale di cellule staminali mesenchimali: a) la metodica estrattiva è semplice e non invasiva; b) conservato in condizioni controllate (banche dei tessuti), garantisce nel tempo la disponibilità di cellule staminali multipotenti per uso autologo (Weber *et al.*, 2012). La presenza nella gelatina di Wharton di progenitori mesenchimali dotati di potenzialità multidifferenziativa e di una discreta capacità proliferativa in coltura, rende questa sorgente cellulare ancora più idonea allo sviluppo di procedure terapeutiche nel campo delle valvulopatie (Wang *et al.*, 2004). Hoerstrup e colleghi (2002a) hanno dimostrato che popolazioni cellulari multipotenti isolate da cordone ombelicale possono essere utilizzate per la preparazione di condotti vascolari (Hoerstrup *et al.*, 2002a).

c) Cellule progenitrici endoteliali isolate da sangue

Il rivestimento endoteliale della valvola cardiaca è fondamentale per ridurre il rischio di insorgenza di trombi, processi di coagulazione e complicazioni infiammatorie. Di conseguenza, per migliorare la funzionalità della valvola cardiaca ingegnerizzata, essa viene spesso ricoperta con uno strato di cellule endoteliali autologhe, isolate da diverse sorgenti vascolari (Zünd *et al.*, 1998). La raccolta di questo tipo di cellule dai vasi sanguigni richiede una procedura di estrazione invasiva che comporta l'alterazione dell'integrità delle strutture vascolari; pertanto, fonti alternative sono in fase di studio. Nell'ultimo decennio, grande interesse scientifico ha suscitato l'impiego dei progenitori endoteliali (*Endothelial Progenitor Cells*, EPC) isolati dal sangue periferico e cordonale (Schmidt e Hoerstrup, 2007). Data la facile reperibilità delle EPC, sono considerate la popolazione ideale per l'endotelizzazione delle valvole ingegnerizzate (Dvorin *et al.*, 2003) oltre che per la rigenerazione del tessuto valvolare mediante transdifferenziamento in senso miofibroblastico (Schmidt e Hoerstrup, 2007).

SCOPO DELLA TESI

Fin dall'isolamento della prima popolazione cellulare negli anni '70, le cellule staminali adulte multipotenti sono state oggetto di numerosi studi sperimentali finalizzati a definirne la possibilità di impiego nel recupero di danni tessutali congeniti o acquisiti. Nell'ultimo decennio, la presenza di cellule staminali multipotenti circolanti è stata oggetto di un grande interesse da parte della comunità scientifica. In termini di applicazione clinica, il sangue periferico, rispetto al tessuto adiposo, alla cute e al midollo osseo, rappresenterebbe una fonte ideale perché è accessibile ed inesauribile durante il corso della vita, non richiede procedure estrattive invasive, consente l'ottenimento di cellule per uso autologo e non richiede la crioconservazione del materiale di estrazione perché l'ottenimento del trapianto cellulare è possibile in coincidenza della necessità del paziente. Inoltre, non comportando alcun problema di tipo etico e non richiedendo costi di conservazione per il mantenimento di banche biologiche, il sangue periferico potrebbe rappresentare una valida alternativa al midollo osseo nel campo della medicina rigenerativa. In letteratura numerose pubblicazioni scientifiche riportano l'identificazione di cellule di tipo fibroblastoide le cui caratteristiche di crescita e di plasticità differenziativa sono risultate estremamente dissimili. Attualmente, l'esistenza e l'immunofenotipo della cellula staminale circolante, quale possibile candidato per la medicina rigenerativa, non è stato ancora ben definito e poche evidenze sono state riportate sulla loro capacità espansiva *in vitro*. Una più profonda comprensione delle popolazioni cellulari multipotenti circolanti nel sangue periferico e l'identificazione di un procedimento estrattivo standardizzato consentirebbe lo sviluppo di approcci terapeutici alternativi al trapianto di midollo osseo.

Pertanto, in considerazione di questo, nel presente lavoro di tesi, in accordo con le linee guida definite dalla *International Society for Cellular Therapy* (Dominici *et al.*, 2006), il sangue periferico umano è stato oggetto di studio quale fonte di cellule staminali multipotenti. Innanzitutto è stata standardizzata una metodica di isolamento di cellule fibroblastoidi multipotenti da campioni di sangue umano, usando in parallelo il sangue porcino per stabilire la validità e la riproducibilità della tecnica. Le popolazioni cellulari aderenti alla plastica (hPBC e pPBC) sono state caratterizzate per immunofenotipo, capacità espansiva *in vitro*, potenzialità multidifferenziativa e possibilità di impiego in applicazioni di ingegneria tissutale e lo schema sperimentale della ricerca ha previsto:

- ✓ l'isolamento di popolazioni cellulari da sangue periferico umano (hPBC) e porcino (pPBC) mediante separazione su gradiente di Ficoll, semina su piastre di polistirene non condizionate e selezione per adesione in terreno di coltura costituito da *Alpha*-MEM, siero bovino fetale e soluzione antibiotica;
- ✓ purificazione, espansione e caratterizzazione morfologica e fenotipica delle cellule hPBC e pPBC;
- ✓ valutazione della cinetica di crescita *in vitro* e studio della stabilità fenotipica durante la coltura *in vitro* a lungo termine;
- ✓ studio di espressione dei geni di pluripotenza mediante *Real-Time* PCR;
- ✓ analisi del potenziale differenziativo in senso adipogenico, osteogenico, condrogenico e cardiomegenico mediante tecniche di immunocitochimica, immunofluorescenza, RT-PCR e Western Blot;
- ✓ per le cellule hPBC, studio delle proprietà immunomodulatorie mediante trattamento con INF γ e co-coltura con linfociti umani;
- ✓ per le cellule pPBC, preparazione di un prototipo di protesi valvolare biologica ingegnerizzata mediante semina delle cellule su matrici valvolari cardiache acellulari. La crescita delle cellule pPBC sulle matrici porcine è stata caratterizzata mediante analisi di microscopia elettronica a scansione, immunoistochimica, immunofluorescenza e biologia molecolare (RT-PCR).

MATERIALI E METODI

1. Isolamento di cellule multipotenti da sangue periferico

Le cellule staminali multipotenti da sangue periferico (PBC) sono state isolate da campioni di sangue ottenuto da bambini di età pediatrica (3-10 anni), in regime di autorizzazione del Comitato Etico e da maialini nani vietnamiti (*minipig*). I campioni (10 ml), raccolti in tubi S-monovette (Sarstedt) contenenti litio eparina, sono stati processati entro 24 h dal prelievo. Dopo diluizione con tampone fosfato (PBS) nel rapporto 1:1, il sangue è stato stratificato (rapporto 2:1) su Ficoll-Hystopaque (Sigma-Aldrich) e poi centrifugato a 2000 rpm per 30 min, a temperatura ambiente (TA) per ottenere la separazione delle popolazioni cellulari (Figura 14). Lo strato all'interfaccia tra le fasi del plasma e del Ficoll (anello linfocitario) è stato prelevato e raccolto in un tubo sterile (Becton-Dickinson). Dopo diluizione con PBS nel rapporto 1:1, la sospensione cellulare è stata centrifugata a 2800 rpm per 10 min.

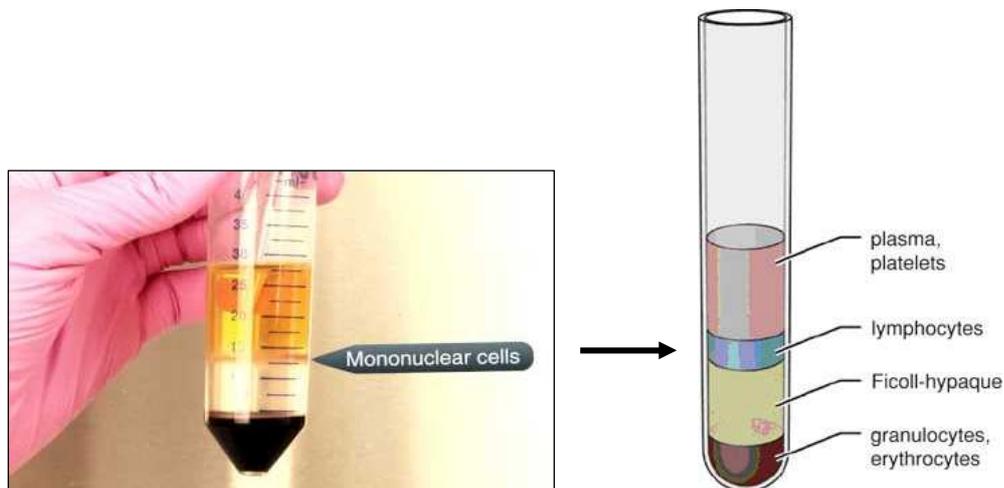


Figura 14. Separazione cellulare su gradiente di Ficoll-Hystopaque

Dopo eliminazione del surnatante, il pellet è stato risospeso nel terreno di coltura preparato con *Alfa-Modified Eagle Medium* (α -MEM) *Without Nucleosides* (Invitrogen), siero bovino fetale (FBS) al 16.5% (Invitrogen), glutamax all'1% (Invitrogen), soluzione antibiotica di penicillina (100 mg/ml) e streptomina (100 mg/ml) (APS) all'1% (Sigma-Aldrich) e poi è stato seminato ad alta densità in piastre di coltura non condizionate di polistirene (Becton Dickinson). Le colture cellulari sono state mantenute a 37°C, in

atmosfera umidificata al 95% contenente CO₂ al 5% e controllate giornalmente mediante microscopio ottico DM/IL (Leika). Alla comparsa di elementi cellulari a morfologia fibroblastoide (PBC) dopo 7-10 giorni dalla semina, sono stati eseguiti 2-3 lavaggi della piastra con PBS ed il terreno è stato poi cambiato ogni 3 giorni fino al raggiungimento della confluenza cellulare dell'80%. Le colture primarie sono state distaccate mediante trattamento con una soluzione di EDTA allo 0,025% (Sigma-Aldrich) e tripsina allo 0.25% (Sigma-Aldrich) in PBS 1X. Le subcolture cellulari sono state preparate utilizzando una densità di semina di 10⁴ cellule/cm² per le hPBCe 5x10³ cellule/cm² per le pPBC.

2. Analisi di microscopia ottica

Le colture cellulari sono state osservate giornalmente mediante un microscopio ottico DM/IL e le immagini sono state acquisite mediante una videocamera Nikon Digital Sight DS-SMc (Nikon Corporation).

3. Studio della morfologia cellulare mediante microscopia elettronica a scansione (SEM)

Le cellule fibroblastoidi PBC sono state seminate su vetrini sterili (Falcon) e coltivate in terreno di proliferazione. Dopo 24 h i campioni sono stati lavati in PBS, fissati mediante una soluzione di tampone cacodilato (0,1 M, pH 7,2) (Sigma) con glutaraldeide (Sigma) al 3% e conservati a 4°C fino al momento della disidratazione. Quest'ultima è stata eseguita per immersione delle cellule fissate nella scala ascendente degli alcoli (70%, 90%, 95%) (5 min/alcool). I campioni, mantenuti in alcool assoluto fino al momento dell'analisi, sono stati poi sottoposti a *Critical Point Drying* e metallizzati con oro. Le immagini sono state acquisite mediante l'utilizzo del microscopio elettronico a scansione JSM Jeol 6490 in dotazione presso il CUGAS - Centro Interdipartimentale di Servizi dell'Università di Padova.

4. Studio dell'immunofenotipo

L'identificazione di specifici marcatori di membrana sulle popolazioni cellulari aderenti PBC è stata eseguita mediante citometria a flusso (CFM).

4.1 Citofluorimetria

L'analisi citofluorimetrica permette di misurare in cellule o altre particelle biologiche le caratteristiche fisiche e chimiche quali la dimensione, la granularità superficiale, il contenuto di acidi nucleici (DNA, RNA), l'organizzazione del citoscheletro, il potenziale di membrana, i recettori di superficie ed intracellulari, le attività enzimatiche o lo stato di fosforilazione delle proteine. La misurazione si basa sull'identificazione di un segnale di fluorescenza emesso da molecole (fluorofori) autogene o esogene (anticorpi) dopo eccitazione con una luce monocromatica laser. Il termine "fluorescenza" determina dunque la caratteristica di alcuni cromofori di emettere luce a lunghezza d'onda maggiore ed energia minore rispetto a quella dalla quale vengono eccitati. Questo fenomeno è noto per fluorofori nel *range* di lunghezza d'onda 300 a 800 nm. I massimi di assorbimento e di emissione sono sfasati di 15-40 nm (shift di Stokes) (Figura 15).

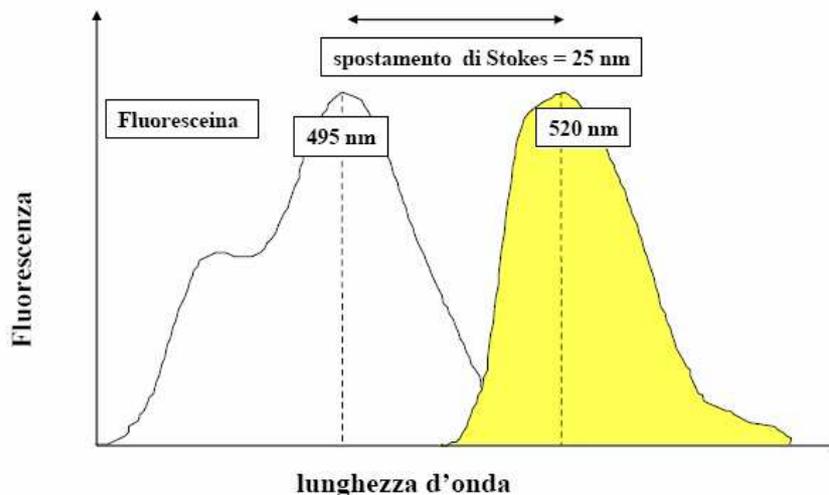


Figura 15. Spostamento di Stokes di fluoresceina dopo eccitazione laser. (a) Spettro di eccitazione; (b) spettro di emissione

I fluorofori presentano caratteristici spettri di assorbimento e di emissione. Attualmente sono di comune utilizzo l'isotiocianato di fluoresceina, conosciuto anche con l'acronimo FITC, e la ficoeritrina (PE), un derivato dei cianobatteri (Figura 16).

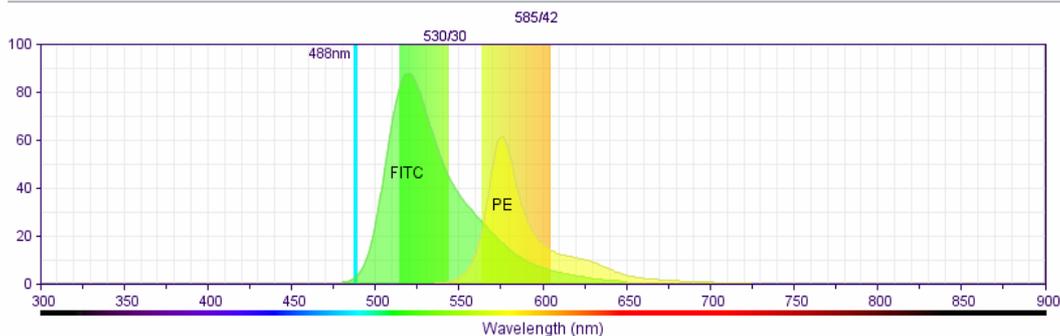


Figura 16. Spettro di emissione dei fluorocromi FITC e PE

La preparazione del campione destinato all'analisi di citofluorimetria prevede: a) l'ottenimento della sospensione cellulare in fase monodispersa; b) la marcatura con uno (singola) o più anticorpi (multipla) fluorescenti specifici; c) il caricamento su apparecchiatura dedicata (citofluorimetro) dotata di sistema fluido di trasporto; d) l'eccitazione del campione nella camera di flusso mediante un fascio di luce laser focalizzata di alcune decine di micron (Figura 17) ed infine e) l'analisi dei dati.

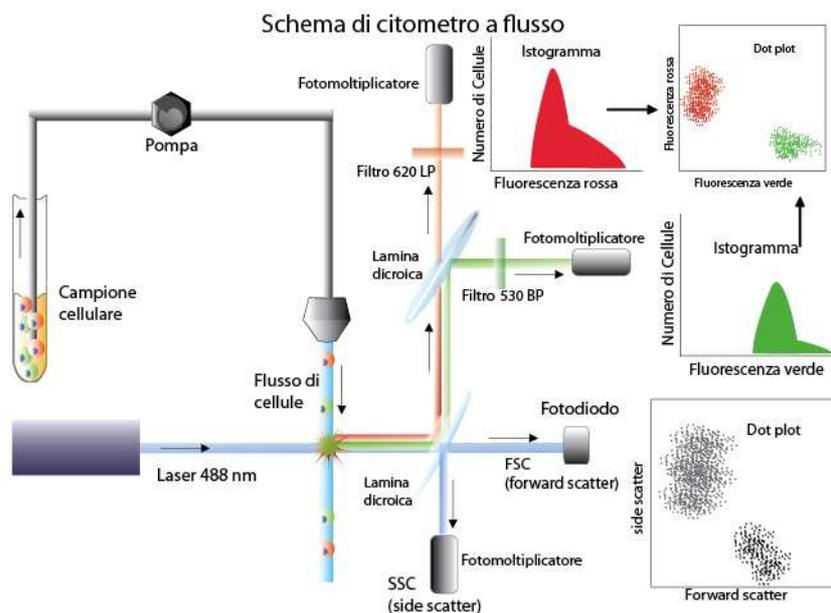


Figura 17. Caricamento ed eccitazione del campione nella camera di flusso

Quando il raggio di luce intercetta il campione, la singola cellula o particella eccitata genera segnali relativi alle sue proprietà fisiche (*dimensione, granularità interna, rugosità di membrana*) e chimiche (*presenza di specifici marcatori di membrana o intracellulari*). I

segnali vengono poi raccolti da un sistema di lenti, specchi dicroici e filtri ottici ed inviati a specifici sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. I segnali elettrici (*analogici*) provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati, vengono inviati ad un computer per essere poi digitalizzati (Figura 18).

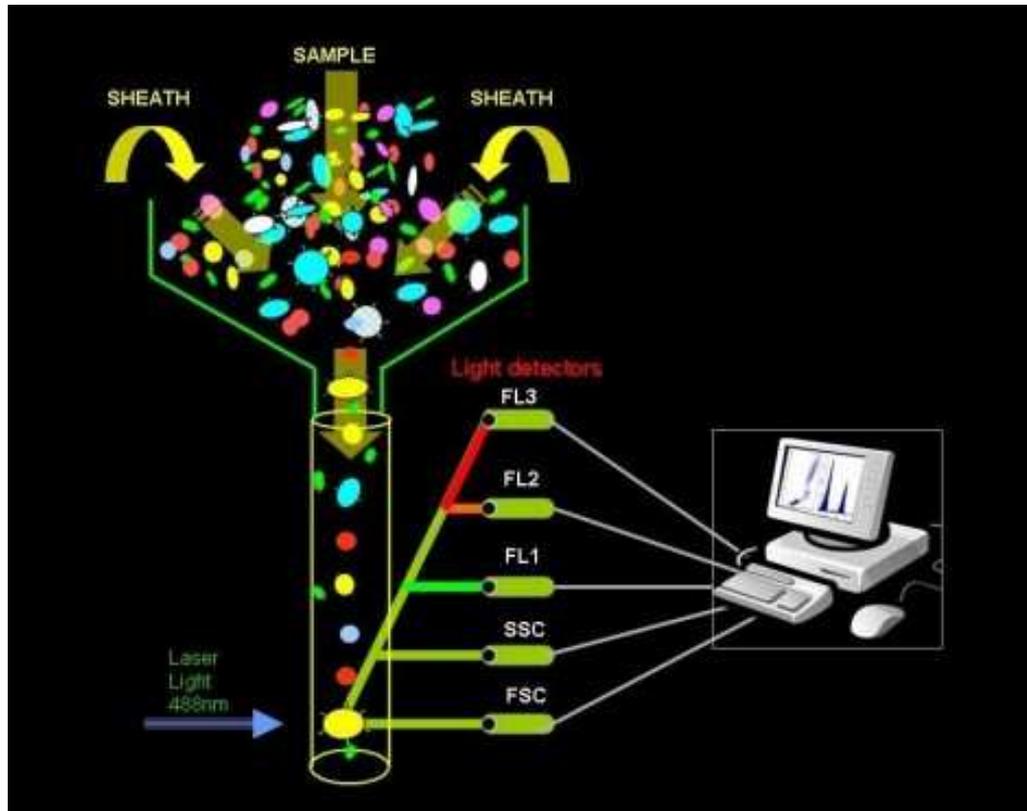


Figura 18. Elementi costitutivi di un citofluorimetro

4.2 Caratterizzazione fenotipica delle popolazioni PBC

Per ottenere un numero sufficiente di cellule adatto per l'analisi citofluorimetrica, le popolazioni cellulari sono state espanse per sette generazioni. Le subcolture VII di 3 popolazioni cellulari differenti sono state distaccate dalla piastra mediante il trattamento con una soluzione di EDTA/tripsina, centrifugate a 1200 rpm per 5 min ed infine risospese in PBS allo 0,2% di albumina sierica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) (PBS-BSA). Ogni campione è stato allestito trattando, a TA, al buio, per 15 min, 2×10^5 cellule/100 μ l di PBS-BSA con 5 μ l di anticorpo primario monoclonale *mouse* anti-*pig* CD44 non coniugato (AbD Serotec), monoclonale *mouse* anti-*pig* SLA-DR non coniugato (AbD Serotec), monoclonale *mouse* anti-*pig* CD106 coniugato FITC (Acris), monoclonale *mouse* anti-*pig* CD90 coniugato FITC (Lifespan Bioscience), monoclonale *mouse* anti-*pig* CD34

coniugato PE (Santa Cruz), monoclonale *mouse* anti-*pig* CD45 coniugato PE (Santa Cruz), monoclonale *mouse* anti-*pig* CXCR4 coniugato PE (Santa Cruz), monoclonale *mouse* anti-*human* CD14 (Santa Cruz), monoclonale *mouse* anti-*human* Integrina- β 1 (Santa Cruz), monoclonale *mouse* anti-*human* CD34 (Santa Cruz), monoclonale *mouse* anti-*human* CD44 (Santa Cruz), monoclonale *mouse* anti-*human* CD45 (Santa Cruz), monoclonale *mouse* anti-*human* CD73 (BioLegend), monoclonale *mouse* anti-*human* CD90 (Santa Cruz), monoclonale *mouse* anti-*human* CD105 (Miltenyi Biotec SRL), monoclonale *mouse* anti-*human* NG2 (BD Biosciences), monoclonale *mouse* anti-*human* CD13 (Santa Cruz), monoclonale *mouse* anti-*human* CXCR4 (Santa Cruz), monoclonale *mouse* anti-*human* HLA-DR (BD Biosciences). L'incubazione dei campioni con gli anticorpi primari non coniugati e coniugati a fluorocromo è stata eseguita al buio. Al termine dell'incubazione con l'anticorpo primario non coniugato, i campioni sono stati risciacquati in PBS-BSA e trattati a TA, al buio per 15 min con 5 μ l dell'anticorpo secondario anti-*mouse* coniugato a FITC (AbD Serotec, Santa Cruz, BioLegend, Miltenyi Biotec SRL, BD Biosciences).

Per quanto riguarda gli altri marcatori, il campione negativo è stato allestito mediante incubazione con 5 μ l del controllo isotipico corrispondente coniugato con lo stesso fluorocromo legato all'anticorpo primario.

Al termine della preparazione, tutti i campioni sono stati risciacquati con PBS-BSA e centrifugati a 1200 rpm per 5 min. L'analisi è stata eseguita su FacsCanto II (Becton Dickinson) ed ha previsto la risospensione dei campioni in 200 μ l di tampone FacsFlow. Mediante il programma FacsDIVA sono stati acquisiti i dati relativi a 1×10^4 cellule totali, nel range di lunghezza d'onda di 530 ± 40 (FITC) e 580 ± 30 nm (PE). I risultati, espressi come percentuale di cellule positive rispetto al campione di controllo, sono stati ottenuti applicando la funzione statistica *Substraction* del programma di analisi Summit 4.3.

5. Valutazione della stabilità fenotipica delle popolazioni PBC

E' noto che, in adeguate e stabili condizioni di coltura *ex vivo*, le cellule staminali multipotenti mantengono lo stato indifferenziato. Per valutare la stabilità fenotipica delle popolazioni PBC estratte, l'analisi citometrica di espressione dei marcatori di superficie CD44, SLA-DR, CD106, CD90, CD34, CD45, CXCR4, CD14, Integrina- β 1, CD45, CD73, CD105, NG2, CD13, HLA-DR è stata ripetuta su generazioni diverse nel corso della coltura espansiva fino alla subcoltura XXXI. I campioni sono stati allestiti come riportato nel paragrafo 4.2. I dati ottenuti sono stati messi a confronto con quelli relativi

alla subcoltura VII.

6. Studio del cariotipo delle popolazioni PBC

L'analisi del cariotipo delle cellule hPBC è stata effettuata dal Laboratorio di Citogenetica del Servizio Aggregato di Genetica Medica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata (Policlinico G. B. Rossi) di Verona. Lo studio è stato ripetuto su tre diverse popolazioni e la stabilità cariotipica è stata valutata su tre diverse generazioni. L'analisi citogenetica è stata effettuata allestendo due colture indipendenti, ciascuna ottenuta dalla semina di 10^5 cellule in capsule Petri contenenti sulla base un vetrino (*amnio-dish*). Le cellule sono state seminate alla densità di $1,2 \times 10^3$ cell/cm² in terreno proliferativo. Le cellule della prima coltura sono state bloccate con colchicina dopo 24-96 h dalla semina, ad una confluenza del 20%, mentre la seconda coltura è stata bloccata a distanza di 24 h dalla prima. In seguito lo studio ha previsto il blocco delle metafasi con colcemid ed il mantenimento delle cellule in coltura per un periodo compreso tra le 12 e le 16 h. Si è poi proseguito con il trattamento osmotico tramite incubazione in soluzione ipotonica (KCl 0,075 M) e fissazione con una soluzione di metanolo, etanolo e acido acetico in rapporto 2:1:1. I vetrini sono stati, quindi, estratti dalle capsule Petri e asciugati in condizioni controllate di temperatura (26°C) e umidità (36% RH). Per il bandeggio QFQ, i vetrini sono stati immersi in una soluzione di Quinacrina in tampone McIlvaine, al buio per 10 min e, dopo il risciacquo nello stesso tampone, sono stati montati su un vetrino portaoggetti. Le metafasi sono state visualizzate in microscopia ottica in fluorescenza ed acquisite tramite un sistema di analisi di immagine.

7. Identificazione del *doubling population*

La valutazione della capacità espansiva delle cellule PBC ha previsto lo studio del *doubling population* cumulativo (*Doubling Population Level*, D.P.L). La durata vitale *in vitro* di una popolazione cellulare non trasformata è definita dal numero di raddoppiamenti eseguiti a partire dall'isolamento ed il D.P.L è dunque una misura intrinseca della sua età. Il tempo di raddoppiamento (*doubling time*) è caratteristico per ogni tipo cellulare e si mantiene stabile durante la crescita espansiva delle cellule staminali fino al sopraggiungere del loro invecchiamento.

Nei nostri esperimenti lo studio della capacità proliferativa delle popolazioni PBC è stata

eseguita mediante l'identificazione del *doubling population* cumulativo sulle generazioni comprese tra la VII e la XXXI ed ha previsto la semina delle subcolture alla densità di 5×10^3 cellule/cm² in piastre *multiwell* non condizionate da 6 pozzetti (Becton-Dickinson). Per ogni campione sono state preparate tre repliche. Ad intervalli di 24 h dalla semina per ogni passaggio, il numero di cellule adese è stato misurato previo distacco con la soluzione di EDTA/tripsina e tramite conta con la camera di Burker.

Ad ogni passaggio sono stati calcolati a) il valore medio del numero di cellule raccolte in 3 pozzetti, b) la deviazione standard, c) il *doubling population* (DP), d) il *doubling population* cumulativo.

Il *doubling population* è stato calcolato applicando la seguente formula:

$$D.P. = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

dove N rappresenta il numero medio delle cellule raccolte, mentre N₀ rappresenta il numero delle cellule seminate in ciascun pozzetto.

Il *doubling population* cumulativo in corrispondenza di un determinato passaggio, è stato calcolato sommando il *doubling population* di quel passaggio con quelli relativi alle precedenti generazioni.

8. Studio della potenzialità multidifferenziativa delle popolazioni PBC

Per definire il grado di potenzialità differenziativa delle cellule PBC, è stata valutata la risposta cellulare al trattamento con terreni specifici induttivi di tipo adipogenico, osteogenico, miogenico, neurogenico e condrogenico. Le cellule sono state seminate alla densità di 3×10^3 (pPBC) e 10^4 cellule/cm² (hPBC) in piastre non condizionate contenenti un vetrino sterile (Becton-Dickinson) e terreno proliferativo. Al raggiungimento dell'80% di confluenza, il terreno di coltura è stato sostituito con il terreno induttivo. Le colture sono state osservate giornalmente tramite microscopia ottica e il cambio di terreno è stato eseguito nella misura pari al 50% due volte alla settimana. Per definire la stabilità differenziativa delle cellule PBC durante la coltura espansiva, lo studio è stato eseguito sulle subcolture VII, XV, XXXI ed i risultati sono stati messi a confronto.

8.1 Differenziamento adipogenico

Le cellule sono state trattate con il terreno specifico induttivo costituito da *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose* (DMEM HG) (Euroclone), FBS al 10% (Sigma-Aldrich), APS all'1% (Sigma-Aldrich), insulina (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich), isobutilmetilxantina (IBMX) (0,5 mM) (Sigma-Aldrich), desametasone (DEX) (1 mM) (Sigma-Aldrich), indometacina (60 mM) (Sigma-Aldrich). In parallelo, è stato preparato il campione di controllo indifferenziato in terreno proliferativo. Ad intervalli di 7 e 14 giorni dall'induzione, le cellule sono state lavate con PBS 1X e fissate in soluzione di formalina al 10% in PBS, per 1 h a TA, per lo studio degli accumuli di trigliceridi a livello citoplasmatico mediante la colorazione citochimica Oil Red O.

8.1.1 Colorazione Oil Red O

E' stata preparata una soluzione di Oil Red O (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 5 mg/ml in isopropanolo (Sigma-Aldrich). Dopo filtrazione, la soluzione è stata diluita (3:2) in acqua distillata, incubata per 1 h a TA ed infine filtrata prima dell'uso.

Dopo lavaggio in acqua di fonte, le cellule fissate in formalina sono state incubate per 15 min con la soluzione filtrata Oil Red O, lavate in acqua di fonte e contrastate con ematossilina per 1-2 min. Dopo due lavaggi veloci in acqua distillata e uno in acqua di fonte per 6 min, i preparati sono stati disidratati utilizzando la scala ascendente degli alcoli e poi montati con il montante *Crystal mount aqueous mounting medium* (Sigma-Aldrich).

I campioni sono stati infine osservati al microscopio ottico DM/R (Leica) e le immagini sono state acquisite con la videocamera DC 500 (Leica).

8.2 Differenziamento osteogenico

Le cellule sono state trattate con il terreno specifico induttivo preparato con *Alfa-Modified Eagle Medium* (α -MEM) *without nucleosides* (Invitrogen), FBS al 10% (Sigma-Aldrich), APS all'1% (Sigma-Aldrich), desametasone (100 nM) (Sigma-Aldrich), β -glicerofosfato (10 mM) (Sigma-Aldrich) e acido ascorbico (0,05 mM) (Sigma-Aldrich).

Per ottimizzare il trattamento induttivo le colture sono state preparate e differenziate su superfici condizionate con un gel di collagene I bovino. Il *coating* è stato preparato con una soluzione di collagene (Bovine collagen, Sigma-Aldrich) ottenuta previa diluizione della soluzione (8 ml) con NaOH 0,1 M (1 ml) e PBS 10X (1 ml). Dopo correzione del pH del preparato a 7.4 ± 0.2 , la soluzione neutralizzata e isotonica di collagene I è stata incubata a 4° - 6° C per 1 h e successivamente distribuita in piastre multiwell di 24 pozzetti nella

quantità pari a 183 μ l per pozzetto. Dopo gelificazione, ottenuta mediante incubazione di 10-20 min a 37°C, le piastre sono state utilizzate per la semina cellulare ($3 \times 10^3/\text{cm}^2$).

Al raggiungimento dell'80-90% di confluenza, le colture sono state trattate con il terreno differenziativo. In parallelo i campioni di controllo indifferenziato sono stati preparati in terreno proliferativo. Dopo 7 e 14 giorni, le cellule sono state fissate in formalina al 10% in PBS per l'identificazione di sali di calcio nella matrice extracellulare mediante la colorazione di Von Kossa.

8.2.1 Colorazione Von Kossa

Dopo reidratazione in acqua MilliQ, le cellule sono state trattate con una soluzione acquosa di nitrato d'argento all'1% (Sigma-Aldrich) e poi esposte a luce UV per 45 min. Dopo risciacquo con acqua MilliQ, i campioni sono stati incubati con una soluzione acquosa di tiosolfato di sodio (Sigma-Aldrich) al 3% per 5 min, lavate con acqua MilliQ e poi colorate con una soluzione filtrata di safranina (Sigma-Aldrich) allo 0,2% in acqua. Dopo disidratazione mediante passaggi veloci in alcool al 95% e alcool assoluto, i preparati sono stati montati con il montante Eukitt (Fluka). I campioni sono stati poi osservati al microscopio ottico DM/R (Leica) e le immagini sono state acquisite mediante la videocamera DC 500 (Leica).

8.3 Differenziamento condrogenico

La stimolazione condrogenica è stata eseguita su cellule coltivate in micromassa sul fondo di tubi sterili di 15 ml (Falcon). La formazione della micromassa è stata ottenuta per centrifugazione della sospensione cellulare alla velocità di 1200 rpm per 10 min. Dopo allontanamento del surnatante, evitando di dissolvere il pellet, è stato aggiunto il terreno condrogenico preparato con DMEM *high glucose* (DMEM HG) (Invitrogen), FBS all'1% (Sigma-Aldrich), insulina (0,5 μ g/ml) (Sigma-Aldrich), acido ascorbico (50 μ l) (Sigma-Aldrich), TGF- β (10 ng/ml).

In parallelo è stato preparato il campione di controllo indifferenziato in terreno costituito da DMEM HG (Invitrogen), FBS al 1% (Sigma-Aldrich), APS all'1% (Sigma-Aldrich). Dopo 20 giorni di coltura, i campioni sono stati risciacquati in PBS, inclusi in OCT (Leica) e poi tagliati mediante criostato CM 1850 UV (Leica).

Le sezioni sono state infine colorate con *Alcian Blue* (WWako) per visualizzare la presenza di mucine acide, che sono tipicamente espresse sulla membrana cellulare dei condrociti.

8.3.1 Colorazione Alcian Blue

Le sezioni (5 μm) sono state trattate con *Alcian Blue* (WWako) per 30 min e poi risciacquate prima con acqua di fonte per 2 min e poi con acqua distillata per altri 2 min.

Dopo aver contrastato i nuclei con il *Nuclear Fast Red* (Sigma) per 5 min, i campioni sono stati risciacquati in acqua di fonte, disidratati con passaggi veloci in alcool al 95%, alcool assoluto, ed infine Xilene (Sigma). Il montaggio dei vetrini è stato eseguito con il montante Eukitt ed i preparati sono stati osservati al microscopio ottico DM/R (Leica) per l'acquisizione delle immagini.

9. Studio delle proprietà immunomodulatorie delle cellule hPBC

Lo studio delle proprietà immunomodulatorie di una popolazione staminale è di fondamentale importanza per valutarne la potenzialità di impiego in programmi di terapia cellulare.

In questo lavoro, l'analisi dell'attività immunomodulatoria delle popolazioni hPBC è stata valutata allestendo due tipologie di esperimenti: il trattamento delle cellule con la citochina pro-infiammatoria $\text{INF}\gamma$ per verificarne la risposta all'infiammazione e la co-coltura delle hPBC con linfociti umani per studiare la loro azione regolatoria sulle cellule immunitarie.

9.1 Trattamento con $\text{INF}\gamma$

Tre subcolture di hPBC (VII, XV, XXXI) sono state seminate in piastre *multiwell* da 6 pozzetti, ad una densità di 10^4 cellule/ cm^2 , in terreno proliferativo addizionato con $\text{INF}\gamma$ alla concentrazione di 25 ng/ml e 500 ng/ml. In parallelo, i campioni di controllo sono stati mantenuti in terreno proliferativo. Dopo 48 h di incubazione, le cellule sono state raccolte e analizzate al citofluorimetro per l'espressione di molecole di istocompatibilità e costimolatorie. A tale scopo, le cellule sono state marcate con gli anticorpi primari *mouse* anti-*human* HLA-ABC coniugato PE-Cy7, HLA-DQ coniugato FITC, HLA-DR coniugato FITC, CD40 coniugato PE-Cy5, CD80 coniugato PE e CD86 coniugato APC. In parallelo, è stata studiata mediante *Real-Time* PCR la variazione dell'espressione degli RNA messaggeri dei geni CXCL-9, IDO1 (indoleamina 2,3-diossigenasi) e COX2 (cicloossigenasi 2) dopo trattamento con $\text{INF}\gamma$.

9.2 Co-cultura con linfociti umani

I linfociti sono stati isolati da campioni di sangue umano di soggetti di età pediatrica previa lisi dei globuli rossi con *Pharm Lysis Buffer* 1X (BD Pharmingen). Per ciascun campione, due aliquote da 1 ml di sangue sono state trattate con 10 ml di soluzione lisante per 15 min, a TA. Dopo centrifugazione a 1500 rpm per 5 min, il pellet derivato dalla prima aliquota è stato usato per la caratterizzazione citofluorimetrica, mentre quello della seconda aliquota è stato usato per l'allestimento della co-cultura.

La caratterizzazione dei sottotipi linfocitari è stata eseguita mediante analisi di citofluorimetria ed ha previsto l'incubazione di 50 µl di sospensione leucocitaria con 1 µl di anticorpo *mouse anti-human* CD4 coniugato FITC *mouse anti-human* CD8 coniugato PerCp-Cy5, e *mouse anti-human* FoxP3 coniugato PE (BD Pharmingen); in parallelo sono stati allestiti un campione per lo studio della coespressione di CD25 e FoxP3 e campioni di controllo isotipico. La marcatura degli antigeni di superficie ha previsto l'incubazione dei campioni con l'anticorpo primario, per 15 min, al buio. Dopo lavaggio con PBS e fissaggio in soluzione *Cytofix* (BD Pharmingen) per 20 min, a 4°C, i campioni sono stati risospesi in *FACSFlow* (BD Pharmingen) e caricati su citofluorimetro FACS Canto II. La marcatura intracellulare per l'identificazione di FoxP3 è stata eseguita dopo il fissaggio e la permeabilizzazione dei campioni con la soluzione *Cytofix/Cytoperm* (BD Pharmingen) per 20 min, a 4°C. Dopo incubazione con l'anticorpo primario per 30 min, al buio, i campioni sono stati risciacquati in PBS e infine risospesi in *FACSFlow* (BD Pharmingen). Un campione di controllo è stato allestito utilizzando colture permeabilizzate e poi trattate con l'anticorpo isotipico di riferimento. L'acquisizione dei dati dell'analisi di citofluorimetria è stata eseguita su un numero totale di 10^4 cellule/campione.

La co-cultura di hPBC e linfociti è stata preparata usando i filtri *Millicell[®] Culture Plate Insert* per piastre da 24 pozzetti. Tali supporti sono costituiti da una membrana di policarbonato, di diametro di 12 mm e aventi pori di 4,0 µm (Millipore) ([Figura 19](#)).

La semina dei linfociti (10^6 cellule totali in 600 µl di terreno) è stata eseguita nel pozzetto di raccolta di piastre *multiwell* da 24. I filtri *insert* sono stati, poi, alloggiati in ciascun pozzetto e utilizzati come supporto di crescita per le cellule hPBC (5×10^5 cellule in 400 µl di terreno). In parallelo, i campioni di controllo sono stati allestiti utilizzando solo le colture linfocitarie. Il terreno di coltura è stato preparato con RPMI, 1% Glutamina, 1% APS. A differenti intervalli di tempo (24 h e 5 giorni) dalla semina, i linfociti mantenuti in co-cultura con le hPBC e i rispettivi controlli sono stati sottoposti all'analisi di citofluorimetria per la caratterizzazione delle popolazioni positive per i marcatori CD4,

CD8, CD25 e FoxP3.

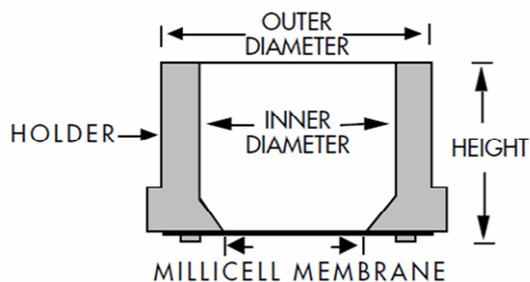


Figura 19. Schema di un *Millicell® CulturePlate Insert*

10. Ricostruzione di una valvola cardiaca ingegnerizzata *in vitro*

Per testare la potenzialità di utilizzo delle popolazioni cellulari isolate in applicazioni di ingegneria tissutale, le cellule pPBC sono state impiegate per ingegnerizzare valvole cardiache aortiche e polmonari di origine porcina.

10.1 Caratterizzazione della potenzialità cardiomiogenica delle cellule pPBC

Per indagare la potenzialità differenziativa in senso cardiomiogenico e valutare quindi la possibilità di impiegare le cellule pPBC per l'ingegnerizzazione delle valvole cardiache, le cellule stesse sono state seminate alla densità di 3×10^3 cellule/cm² in terreno proliferativo o in piastre non condizionate *multiwell* da 24 pozzetti contenenti vetrini idonei alla crescita cellulare e per lo studio di specifici marcatori di linea mediante immunofluorescenza, o in piastre di diametro 100 mm (P100, Becton-Dickinson) per studi di espressione mediante RT-PCR e Western Blot. Al raggiungimento della confluenza di circa l'80%, è stato indotto il differenziamento mediante trattamento con il terreno cardiomiogenico, costituito da DMEM LG (Invitrogen), FBS al 20% (Sigma-Aldrich), APS all'1% (Sigma-Aldrich), glutamax all'1% (Invitrogen) e 5-azacitidina (5-AZA) (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 6 μ M. Le cellule di controllo sono state coltivate nel medesimo terreno privo solo dell'agente demetilante 5-AZA. Dopo 24 ore, il terreno è stato sostituito con medium costituito da DMEM LG (Invitrogen), APS all'1% (Sigma-Aldrich), glutamax all'1% (Invitrogen) addizionato con FBS (Sigma-Aldrich) al 20% per i campioni trattati, al 5% per le cellule di controllo. Il cambio di terreno è stato eseguito nella misura pari al 50% due volte alla settimana. Ad intervalli di tempo di 7 e 14 giorni, i campioni sono stati fissati ed analizzati come sopra indicato.

10.1.1 Immunofluorescenza e microscopia confocale

Questa tecnica permette di individuare la presenza di specifici antigeni nel campione di interesse sfruttando anticorpi coniugati direttamente o indirettamente con sostanze fluorescenti. Dopo 7 e 14 giorni di trattamento, le cellule sono state lavate in PBS e fissate in para-formaldeide al 4% in PBS per 10 min e a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio in PBS, è stata eseguita la saturazione dei siti aspecifici incubando le cellule con una soluzione al 10% di *Horse Serum* (HS) (Sigma-Aldrich) in PBS 1X per 1 h a TA.

Successivamente, è stata eseguita l'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi primari diluiti in una soluzione di PBS con HS al 3%. Sono stati utilizzati gli anticorpi *mouse* anti-actina muscolo specifica (Acris) (diluito 1:100), *mouse* anti-fosfolambano (Acris) diluito 1:50, *mouse* anti-troponina cardiaca T (Acris) (diluito 1:100). Dopo 3 lavaggi di 10 min in PBS con HS all'1,5%, è stato aggiunto l'anticorpo secondario *Biotynilated Pan-specific secondary antibody* (Vectashield) (4 gocce/5 ml di PBS contenente HS all'1,5%). Le cellule sono state quindi incubate per 30 min a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi di 3 min in PBS, le cellule sono state trattate per 10 min a temperatura ambiente al buio con fluorocromo Fluorescein Avidin DCS del Fluorescent Avidin Kit (Vectashield) diluito 1:500 in soluzione di Hepes 10 mM, NaCl 0,15 M a pH 8,2. Dopo 3 lavaggi di 3 min in PBS 1X, i preparati così ottenuti sono stati montati con il montante *aqueous mounting medium with DAPI* (4',6-diamidino-2-fenilindolo) (Vectashield). In parallelo, il controllo negativo è stato allestito utilizzando la medesima procedura omettendo l'aggiunta dell'anticorpo primario. I preparati sono stati osservati mediante il microscopio confocale Leica TCS-SP5 (Leica), dotato di programma gestionale LAS AF (Leica).

10.1.2 Western Blot

Il western blot o immunofissazione è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in un estratto proteico, mediante il riconoscimento da parte di specifici anticorpi; in generale, le proteine vengono prima separate su un gel di poliaccrilammide in base al peso molecolare e poi trasferite su una membrana di nitrocellulosa o polivinildenfluoruro (PVDF). La proteina *target* viene poi riconosciuta mediante l'utilizzo di un anticorpo primario specifico ed uno secondario coniugato ad un enzima o a fluorocromo.

a) Estrazione delle proteine

Dopo trattamento con Trizol (Sigma-Aldrich) delle cellule pPBC mantenute in terreno induttivo cardiomiogenico per 7 e 14 giorni e dei rispettivi controlli, le proteine dell'interfase fenolo-cloroformio sono state prelevate, trattate con 300 µl di etanolo assoluto e poi incubate per 2-3min a TA. Dopo centrifugazione a 4°C, per 5 min, alla velocità di 4600 rpm, il surnatante è stato raccolto e trattato per 10 min con 1,5 ml di isopropanolo (Carlo Erba). I campioni sono stati poi centrifugati per 10 min a 12000 rpm ed il pellet è stato prelevato, trattato con 2 ml di una soluzione guanidinio cloruro 0,3 M per 20 min ed infine centrifugato per 5 min a 9000 rpm. I campioni sono stati ulteriormente purificati mediante un lavaggio di 20 min, a TA con 2 ml di etanolo assoluto. Dopo una centrifugazione a 9000 rpm per 5 min a 4°C, il pellet è stato asciugato per 5-10 min, risospeso in 100 µl di SDS 1X e poi conservato a -20°C fino al momento della quantificazione proteica.

b) Quantificazione proteica

La quantificazione delle proteine estratte ha previsto l'utilizzo del *BCA Protein Assay Reagent KIT* (Pierce). Questo metodo combina la riduzione del rame ($\text{Cu}^{+2} \rightarrow \text{Cu}^{+1}$) effettuata dalla proteina *target* in un mezzo alcalino (reazione del biureto) con la determinazione colorimetrica del catione Cu^{+1} da parte dell'acido bicinconico (BCA). In particolare, la reazione colorimetrica è data dalla chelazione di due molecole di BCA con uno ione rame. L'assorbanza di tale complesso idrosolubile a 562 nm è lineare con l'aumento della concentrazione proteica. Per il saggio di quantificazione sono stati preparati un set di 8 diluizioni dello stock di BSA standard (2 mg/ml; Pierce) e un bianco (Tabella 2).

In seguito, 25 µl di ogni diluizione e di ogni campione da quantificare sono stati posti in un pozzetto di una piastra multipla da 96 pozzetti e addizionati con 200 µl di *Working Reagent*. La piastra è stata poi incubata per 30 min a 37°C. La soluzione *Working Reagent* è stata preparata miscelando 50 parti del Reagente A (Sodio Carbonato, Sodio Bicarbonato, reagente per la detenzione della BSA e Sodio Tartrato in NaOH 0,2 N), con una parte del reagente B (soluzione di solfato di Rame al 4%).

L'assorbanza è stata poi misurata alla lunghezza d'onda di 562 nm utilizzando lo strumento *Microplate autoreader EL 13* (Bio-Tek Instruments). La retta di taratura è stata preparata riportando nell'ordinata del sistema grafico le concentrazioni degli standard ed in ascissa le relative assorbanze. Mediante analisi di regressione lineare eseguita al computer (Prism,

Graph Pad), è stata calcolata l'equazione della retta per estrapolare le concentrazioni proteiche (mg/ml) dei singoli campioni.

	Diluente (μl)	BSA (μl)	[BSA] (mg/ml)
A	0	300 μl dello stock	2
B	125	375 μl dello stock	1,5
C	325	325 μl dello stock	1
D	175	175 μl dello standard B	0,75
E	325	325 μl dello standard C	0,5
F	325	325 μl dello standard E	0,25
G	325	325 μl dello standard F	0,125
H	400	100 μl dello standard G	0,025
I	400	0	0 mg/ml = Bianco

Tabella 2. Diluizioni di BSA standard

c) Elettroforesi su gel di poliacrilammide

Tale procedura consente di analizzare e separare le proteine, sfruttando le loro dimensioni e la loro carica (Figura 20). Il gel viene preparato tramite copolimerizzazione dell'acrilammide (monomero monofunzionale) ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) e di un agente che forma legami trasversali così da formare un reticolo tridimensionale (N,N'-metilene bisacrilammide) (monomero bifunzionale) ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). La polimerizzazione avviene per mezzo di una reazione a catena dovuta alla formazione in serie di radicali liberi per aggiunta di ammonio persolfato e della base *N,N,N',N'*-tetraetilendiammina (TEMED). Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con la produzione del corrispondente radicale libero. In questo modo si formano lunghe catene di acrilammide. Queste sono tenute insieme tra loro da legami crociati derivanti dall'intersezione occasionale all'interno della catena di molecole di bis-acrilammide.



Figura 20. Apparato di elettroforesi su gel di poliacrilamide

Il gel di poliacrilammide è composto da due parti: lo *stacking gel* e il *running gel*: il primo è la parte superiore del gel e la sua funzione è quella di concentrare il campione proteico caricato negli appositi pozzetti, in modo che tutti i campioni arrivino uniformemente sul fronte di corsa; il secondo è la porzione inferiore e consente di separare le proteine in base al loro peso molecolare. *Stacking gel* e *running gel* hanno composizione uguale ma presentano una differente concentrazione di acrilammide, solitamente inferiore nello *stacking gel* (Tabella 3). In particolare, la composizione del *running gel* è decisa in funzione della grandezza della proteina da rilevare: ad esempio, una concentrazione maggiore consente di separare le piccole proteine da quelle di maggiori dimensioni. Per l'analisi della proteina fosfolambano nei campioni trattati ad intervalli di tempo di 7 e 14 giorni e nei rispettivi campioni di controllo, è stato utilizzato uno *stacking gel* al 4% e un *running gel* al 12%. L'acrilammide, l'ammonio persolfato (APS), il TEMED sono stati acquistati dalla ditta Bio Rad mentre l' SDS e il Tris-HCl dalla ditta Sigma-Aldrich.

<i>Stacking gel al 4%</i>	<i>Running gel al 12%</i>
<i>Acrylamide and bis-Acrylamide solutions (37:1)</i>	<i>Acrylamide and bis-Acrylamide solutions (37:1)</i>
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	Tris-HCL 1,5M, pH 8,8
Acqua MilliQ	Acqua MilliQ
SDS 10%	SDS 10%
APS 10%	APS 10%
TEMED	TEMED

Tabella 3. Composizione dello *stacking* e *running Gel*

Di ciascun campione sono stati caricati 40 µg di proteine totali, addizionati con SDS e *loading buffer* (Bio Rad) in un volume totale di 30 µl. In parallelo, sono stati caricati 5 µl del *Precision Plus Protein™ Dual Color* (Bio Rad) per la definizione dei pesi molecolari di riferimento.

Al termine del caricamento, l'apparato di elettroforesi è stato riempito di *running buffer* 1 M, chiuso con l'apposito coperchio e, dopo collegamento degli elettrodi, la corsa elettroforetica è stata eseguita a 140 Volt per 2 h.

d) Transfer

Alla fine della corsa, il gel è stato trasferito nell'apposito apparato, a contatto con la membrana di PVDF, e la corsa elettroforetica è stata eseguita a 25 Volt per una notte, a 4°C (Figura 21).

Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana è stato verificato mediante colorazione con Rosso *Ponceau* (Sigma-Aldrich): la membrana è stata immersa per pochi minuti nella soluzione colorante e poi risciacquata con acqua distillata.

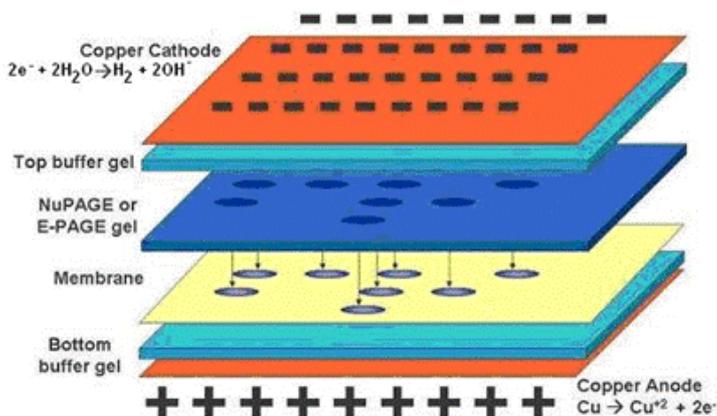


Figura 21. Trasferimento di proteine su membrana PVDF dopo elettroforesi

e) Immunoblotting

Per impedire eventuali interazioni non specifiche con l'anticorpo, le membrane sono state saturate in latte 5% (Sigma-Aldrich) in PBS, per 2 h, in agitazione. Successivamente, le membrane sono state trattate, per una notte a 4°C, con una soluzione di anticorpo primario *mouse* anti-fosfolambano (Acris) diluito 1:2000 in latte 1% in PBS. Come controllo del

carico è stato impiegato l'anticorpo *mouse* anti-GAPDH (Millipore; diluito 1:1000). Al termine del periodo di incubazione, la soluzione di anticorpo è stata aspirata e successivamente sono stati eseguiti ripetuti lavaggi con PBS + 0,25% Tween (Bio Rad). In seguito, la membrana è stata incubata per 1h con una soluzione di anticorpo secondario anti *mouse*-HRP (Bio Rad) diluito (1:5000) in latte preparato all'1% in PBS.

f) Rivelazione

La rivelazione è stata eseguita dopo ripetuti lavaggi delle membrane con PBS + 0,25% Tween ed ha previsto l'incubazione della membrana per 1 min con il substrato *Chemiluminescent Peroxidase Substrate* (Sigma-Aldrich), preparato utilizzando le soluzioni A e B nel rapporto 1:1. Una volta asciugata, la membrana è stata posta in una cassetta di autoradiografia, al buio e a contatto con una lastra autoradiografica (Sigma-Aldrich) per un tempo variabile a seconda dell'anticorpo (5-30 min). Successivamente la lastra impressionata è stata sviluppata tramite incubazione in liquido di sviluppo XOMAT EX II e di fissaggio RP X-OMAT LO (Kodak).

10.2 Decellularizzazione dei lembi aortici e polmonari porcini mediante il metodo TRICOL

Le valvole decellularizzate aortiche (VDA) e polmonari (VDP) sono state preparate dal gruppo di ricerca del Prof. Gerosa e del Prof. Spina, presso il Complesso di Biologia "A. Vallisneri" dell'Università di Padova ed il protocollo di decellularizzazione ha previsto l'utilizzo del metodo TRICOL (Spina *et al.*, 2003; Iop *et al.*, 2009).

Le matrici valvolari aortiche e polmonari sono state ottenute da animali minipig di 9-12 mesi d'età. I cuori sono stati prelevati presso il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Padova (Agripolis-Legnaro) in appositi locali. Immediatamente dopo il sacrificio dell'animale, i lembi sono stati trasferiti in contenitori sterili contenenti soluzione fisiologica e poi sottoposti alla dissezione delle radici aortiche e polmonari in una cappa a flusso laminare. Dopo incubazione in soluzione fisiologica per 4 h, a 4°C e in agitazione, i campioni sono stati trattati a 4°C per 8 h con due soluzioni di inibitori protesici contenenti rispettivamente a) fenilmetilsulfonil fluoruro (P.M.S.F.), N-etilmaleimmide (N.E.M.) e b) benzamidina (B.A.), iodoacetammide (I.A.). Le soluzioni sono state preparate al 10% in tampone A (preparato con ascorbato di sodio o acido ascorbico ed EDTA sciolti in PBS, pH 7.4) e dimetilsolfossido (DMSO) al 10%. Dopo lavaggio in A per 8 h, è stata eseguita una seconda fase di inibizione delle proteasi

mediante incubazione in soluzione acquosa di A al 10%, Triton X-100 all'1% ed inibitori, a 4°C per 8 h. Dopo due lavaggi (ciascuno di 8 h, in agitazione a 4°C) con una soluzione ipertonica di A al 10%, NaCl 0,5 M, Triton X-100 allo 0,1%, in PBS isotonico, i campioni sono stati poi trattati con soluzione di A al 10% e colato di sodio 10 mM o acido colico 10 mM. I tubi sono stati mantenuti per 8 h in agitazione a TA ed il trattamento è stato eseguito due volte. Per eliminare i detergenti ed i residui di matrice, i campioni sono stati lavati 2 volte in PBS isotonico a pH 7.4. Durante ciascun lavaggio i tubi sono stati mantenuti 1 h e 30 min in agitazione, a TA per il primo lavaggio (per asportare i residui di colato), a 4°C per il secondo lavaggio. Dopo un lavaggio in NaCl allo 0,9% per 30 min, sono stati effettuati due lavaggi in soluzione fisiologica costituita da NaCl allo 0,9% e isopropanolo al 10% per eliminare il colato di sodio ed il Triton. I tubi sono stati mantenuti per 1 h in agitazione a 4°C. La rimozione degli acidi nucleici è stata eseguita mediante trattamento con Benzonase (5000 U) a 37°C in 2 passaggi consecutivi di 24 h. I lembi sono stati poi disinfettati per 24 h a 37°C con una soluzione antibiotica costituita da fungizone (2,5 µg/ml), cefazolina (240 µg/ml) e vancomicina (50 µg/ml) in terreno *DMEM Hepes Modified* privo di siero.

10.3 Caratterizzazione delle matrici acellulari mediante immunofluorescenza

Dopo il trattamento decellularizzante, la verifica del mantenimento di collagene I, IV ed elastina è stata eseguita mediante il test di immunofluorescenza. Le matrici VDA e VDP sono state risciacquate in PBS e poi incubate per 3 h, a TA, in una soluzione di saccarosio (Sigma-Aldrich) al 15%. Dopo fissaggio per una notte in paraformaldeide al 4% a 4°C, i campioni sono stati inclusi in OCT (Carlo Erba Reagenti Spa), congelati con isopentano (Sigma-Aldrich) in azoto liquido e poi conservati a -20°C fino al momento della preparazione delle sezioni con il criostato CM 1850 UV (Leica). La disattivazione dei siti aspecifici è stata eseguita mediante incubazione con PBS contenente BSA al 2% per una notte, a 4°C. L'immunolocalizzazione dei *target* di interesse è stata eseguita mediante marcatura indiretta per 1 h, a 37°C, in cameretta umida, con i seguenti anticorpi primari: anti-collagene I porcino da topo (Sigma-Aldrich) (1:500), -collagene IV porcino da coniglio (Abcam) (1:500), -elastina porcina da coniglio (Abcam) (1:200). I campioni sono stati poi risciacquati in PBS ed infine incubati a 37°C per 30 min, in cameretta umida con una soluzione di anticorpo secondario *goat anti-rabbit* (1:50) e *goat anti-mouse IGG affinity purified, rhodamine conjugated secondary antibody* (Millipore) (1:50). Dopo lavaggi con PBS, i campioni sono stati montati con *aqueous mounting medium with DAPI*

montante (Vectashield). Le immagini sono state infine acquisite mediante il microscopio a fluorescenza DM2000 e la videocamera Nikon Digital Sight DS-SMC.

10.4 Valutazione della crescita delle popolazioni pPBC su matrici valvolari acellulari

La crescita delle popolazioni pPBC su matrici valvolari acellulari aortiche e polmonari è stata eseguita in assenza di fattori induttivi e in condizioni di coltura statica, ovvero in assenza di flusso.

10.4.1 Semina delle cellule pPBC su lembi valvolari decellularizzati aortici (VDA) e polmonari (VDP)

Prima della semina cellulare, i lembi sono stati sottoposti al test microbiologico previa coltura per 48 h, in incubatore, in terreno *DMEM Hepes Modified*, FBS al 10%. In assenza di contaminazione batterica o fungina, gli emilembi sono stati alloggiati in piastra *multiwell* da 24 pozzetti con lo strato *ventricularis* rivolto verso l'alto e fissando i bordi delle matrici con anelli metallici sterili. Per favorire l'adesione cellulare, i campioni sono stati pretrattati con FBS (500 µl/ml per pozzetto) per 12 h a 37°C e successivamente con fibronectina bovina (10 mg/cm²) (Calbiochem) per 24 h, in un volume massimo di 500 µl di PBS. I campioni sono stati mantenuti in PBS fino al momento della semina.

Le cellule pPBC sono state seminate alla densità di 6.5×10^5 cellule/emilembo in 200 µl di terreno *DMEM Hepes Modified* contenente L-Glutammina, FBS al 10% e soluzione antibiotica APS all'1%. Dopo rimozione del PBS da ciascun pozzetto, 50 µl della sospensione cellulare sono stati aggiunti ad intervalli di 15 min a ciascun campione e le matrici sono state mantenute a 37°C durante l'intera operazione. Al termine della semina sono stati aggiunti 800 µl di terreno di coltura ad ogni campione. Dopo 5 giorni dalla semina, è stato eseguito il primo cambio di terreno nella misura pari al 50% del volume totale. I cambi di terreno successivi sono stati eseguiti a giorni alterni. Ad intervalli di tempo di 7, 14, 28 e 35 giorni, i campioni sono stati fissati per l'analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione, per lo studio istologico mediante immunofluorescenza e immunistoichimica ed infine per lo studio di espressione mediante RT-PCR.

10.4.2 Studio morfologico mediante SEM

Le matrici valvolari sono state lavate in PBS 1X, fissate in tampone cacodilato 0.1 M pH 7,2 con glutaraldeide al 3%, e conservati a 4°C. Dopo tre lavaggi in tampone cacodilato 0,1

M, è stata eseguita la disidratazione per immersione in soluzioni di etanolo al 70% e 90% per 2 h a TA, sotto agitazione e per una notte in alcool al 95%. I campioni, dopo un passaggio in alcool assoluto, sono stati sottoposti a *Critical Point Drying* e metallizzati con oro. I preparati ottenuti sono stati osservati con microscopio elettronico a scansione (modello JSM Jeol 6490) in dotazione presso il CUGAS - Centro Interdipartimentale di Servizi dell'Università di Padova.

10.4.3 Colorazione con DAPI e immunocitochimica sulle matrici ingegnerizzate VDA e VDP

Le matrici VDA e VDP ingegnerizzate sono state risciacquate in PBS e poi incubate per 3 h, a TA, in una soluzione di saccarosio (Sigma-Aldrich) al 15%. Dopo fissaggio per una notte in paraformaldeide al 4%, a 4°C, i campioni sono stati inclusi in OCT (Carlo Erba Reagenti Spa), congelati con isopentano (Sigma- Aldrich) in azoto liquido e poi conservati a -20°C fino al momento della preparazione delle sezioni istologiche con il criostato CM 1850 UV (Leica). Per l'indagine della distribuzione delle cellule PBC nei supporti VDA e VDP, sezioni di 5 µm sono state preparate e poi colorate con il colorante fluorescente nucleare DAPI.

Lo studio di espressione mediante immunocitochimica dell' α -actina muscolare liscia è stato eseguito tramite fissaggio delle matrici VDA e VDP ingegnerizzate in formalina al 10% preparata in PBS 1X, incluse in paraffina e tagliate in sezioni da 5 µm con il microtomo HistoSlide 2000 (Leica). In seguito, le sezioni sono state sparaffinate con xilolo e reidratate mediante lavaggi con una scala discendente di alcol. I campioni sono stati, poi, trattati per 10 min a TA con una soluzione di Triton X-100 (Sigma-Aldrich) all'1% in PBS. La disattivazione delle perossidasi endogene ha previsto il trattamento di 1 h con una soluzione di H₂O₂ (Sigma-Aldrich) al 15%. Il blocco dei siti aspecifici è stato eseguito mediante trattamento di 45 min, a TA, con PBS contenente *Horse Serum* (HS) al 10% (Sigma-Aldrich). I campioni sono stati risciacquati in PBS e poi incubati in cameretta umida con una soluzione di anticorpo primario monoclonale *mouse* anti α -actina (Abcam), diluito 1:100 in PBS contenente HS al 3%. Dopo tre lavaggi di 10 min in PBS con HS al 10%, è stata eseguita l'incubazione di 30 min a TA, in cameretta umida, con l'anticorpo secondario *Biotynilated Pan-specific secondary antibody* (Vectashield) (4 gocce/5 ml di PBS contenente HS all'1.5%). Successivamente, i campioni sono stati trattati con una soluzione A/B (ABC kit, Vectashield) per 30 min a TA. La rivelazione dei siti specifici di legame è stata eseguita mediante l'utilizzo di una soluzione preparata con 5 ml di acqua

distillata, 100 µl di PBS 1X, 200 µl di 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), 100 µl di H₂O₂. La reazione è stata bloccata dopo 1 min utilizzando acqua distillata. Dopo lavaggio in PBS, i campioni sono stati contrastati con ematossilina e poi montati con il montante *Dako ultramount aqueous permanent medium* (Dako).

10.4.4 Analisi di espressione genica mediante RT-PCR di cellule pPBC seminate su matrici VDA e VDP

La risposta delle cellule pPBC alla stimolazione indotta dalle matrici VDA e VDP a breve e a lungo termine è stata studiata mediante l'identificazione di mRNA specifici per marcatori endoteliali (Tenascina, Pecam1, Caldesmone), valvolare-interstiziali (metalloproteinasi 2 e 13) e di matrice extracellulare (collagene I, collagene III, collagene IV, fibrillina, emilina) (Tabella 4).

MARCATORE	TIPOLOGIA	FUNZIONE
Metalloproteinasi-2	interstiziale	Collagenasi (degradazione Collagene IV)
Metalloproteinasi-13	interstiziale	Collagenasi (degradazione Collagene III)
Collagene I	ECM	Proteina strutturale del tessuto connettivo
Collagene III	ECM	Proteina strutturale della lamina fibroreticolare
Collagene IV	ECM	Proteina strutturale della lamina basale
Fibrillina	ECM	Proteina costituente la fibra elastica
Emilina	ECM	Proteina costituente la fibra elastica
Tenascina	endoteliale e valvolare interstiziale	Proteina implicata nella neoangiogenesi e nella vasculogenesi
Pecam 1	endoteliale	Marcatore di cellule endoteliali coinvolto nell'adesione cellulare
Caldesmone	endoteliale	Proteina partecipante al fenomeno contrattile in cellule non muscolari e muscolari lisce

Tabella 4. Marcatori endoteliali, interstiziali e di matrice

11. RT-PCR

La tecnica di RT-PCR permette di identificare la presenza di uno specifico RNA messaggero (mRNA) attraverso la trascrizione inversa dello stesso e l'amplificazione del cDNA ad esso complementare.

11.1 Estrazione di mRNA

Per eseguire la procedura di estrazione di mRNA è stato utilizzato il Trizol (Invitrogen), una soluzione monobasica di fenolo e guanidina isotiocianato. Le cellule da analizzare

sono state prelevate, risciacquate in PBS 1X, fissate in RNA later R0901 (Sigma-Aldrich), mantenute a 4°C per una notte e poi congelate a -80°C fino al momento dell'estrazione di RNA. Al momento dell'estrazione ogni campione è stato trattato prima con 1 ml di Trizol[®] Reagent (Sigma-Aldrich) per 5 min, a TA e poi con 200 µl di cloroformio. Per favorire una maggiore separazione dell'RNA, i campioni sono stati agitati manualmente per 15 sec e poi incubati a TA per 3 min. Dopo centrifugazione a 12000 rpm per 15 min a 4°C, i campioni appaiono risolti in una fase inferiore contenente proteine, un'interfase di colore bianco contenente DNA ed infine una fase superiore acquosa, incolore, contenente RNA. Dopo la raccolta della fase acquosa, è stata eseguita la precipitazione dell'RNA aggiungendo 500 µl di isopropanolo (Fluka) (0,5 ml/ml di Trizol impiegato) e agitando meccanicamente il campione. Dopo incubazione per 3 h a -20°C, il campione è stato centrifugato a 12000 rpm per 10 min a 4°C. Dopo rimozione del surnatante, il pellet è stato lavato con 1 ml di etanolo freddo al 75% e poi centrifugato a 8600 rpm, per 5 min, a 4°C. Rimosso il surnatante, il pellet è stato lasciato asciugare all'aria per 5-10 min e successivamente risospeso in 10 µl di acqua *RNAse free* (Invitrogen). Dopo quantificazione spettrofotometrica, i campioni di RNA sono stati conservati a -80°C.

11.2 Quantificazione spettrofotometrica dell'RNA estratto

La quantificazione dell'RNA è stata eseguita mediante lo spettrofotometro NANODROP 2000 (Thermo Scientific) utilizzando 1 µl di campione, alla lunghezza d'onda di 260 nm. In parallelo, è stata valutata la purezza del campione mediante identificazione dell'assorbanza a 280 e a 230 nm, corrispondenti rispettivamente alla lunghezza d'onda di assorbimento di proteine e carboidrati. I campioni di RNA per i quali il rapporto 260/280 è risultato nel *range* 1,8-2,0 sono stati utilizzati per lo studio di espressione.

11.3 One Step RT-PCR

Lo studio è stato condotto utilizzando il *Qiagen*[®] *One Step* RT-PCR Kit. La strategia *Qiagen* consente di eseguire in un unico tubo prima la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA e poi la sua amplificazione, utilizzando una miscela di enzimi appositamente formulata e formata da: *Omniscript* e *Sensiscript Reverse Transcriptases* (retrotrascrizione), *HotStarTaq DNA Polymerase* (amplificazione). Durante la retrotrascrizione, l'azione specifica ed efficiente del sistema è dipendente dalla temperatura: la *HotStarTaq DNA Polymerase* è completamente inattiva mentre, durante l'amplificazione, simultaneamente alla disattivazione della trascrittasi inversa, si attiva alla temperatura di 95°C. La miscela di

reazione (25 μ l) è stata preparata in ghiaccio utilizzando 1 μ l di RNA alla concentrazione di 30 ng/ μ l, 3 μ l *forward primer* (5 μ M), 3 μ l *reverse primer* (5 μ M), 1 μ l dNTP mix (10 mM), 1 μ l *Qiagen® One Step RT-PCR Enzyme Mix*, 1 μ l *RNAse inhibitor* (125 U), 5 μ l 5X buffer e acqua *RNAse free*. La *One Step RT-PCR* è stata effettuata con il termociclatore *iCycler iQ™* (Bio Rad) ed alle condizioni riportate in Tabella 5.

FASI	TEMPO	TEMPERATURA
Retrotrascrizione	30 min	50 °C
Step iniziale di attivazione	15 min	95 °C
Denaturazione	0,5-1 min	94 °C
<i>Annealing</i>	0,5-1 min	50-57 °C
Estensione	1 min	72 °C
Numero di cicli: 40		
Estensione finale	10 min	72 °C

Tabella 5. Fasi della reazione di RT-PCR.

Le coppie di *primer* utilizzate in questo studio sono indicate in Tabella 6. In parallelo, è stata valutata l'espressione del gene *housekeeping* GAPDH.

11.4 Elettroforesi su gel di agarosio

L'analisi elettroforetica dei prodotti di reazione PCR è stata eseguita su gel di agarosio (Sigma-Aldrich) preparato al 2% con la soluzione tampone TBE 1X (0,04 mM tris-Borato, 0,001 M EDTA, pH 8) (Sigma-Aldrich) ed il Gel Red (0,1 μ l/ml) (Biotium) come marcatore di acidi nucleici. Per il caricamento, sono stati utilizzati 6 μ l di amplificato addizionati di 2 μ l di colorante *Gel Loading Buffer* (Sigma-Aldrich). Come marcatore di riferimento per i pesi molecolari compresi tra 100 e 1000 pb, è stato utilizzato il prodotto *PCR 100 bp Low ladder* (Sigma-Aldrich). Le bande dei campioni amplificati sono state visualizzate mediante esposizione ai raggi UV e le immagini sono state acquisite con lo strumento Gel Doc 2000 (Bio Rad).

Primers	Sigla	Sequenza (5'-3')	Sequenza di riferimento	Lunghezza
Proteina acidica secretata ricca in cisteina	SPARC	F- TCAAGAACGTCCTGGTCACCTTGT	NM_001031794.1	388 pb
		R- ATCCTTGTCGATGTCCTGCTCCTT		
Metalloproteinasi 2	MMP2	F- CGGACAAAGAGTTGGCTGTGCAAT	NM_214192.1	506 pb
		R- AGCTGGGTGGAAGAGAACACAGTT		
Metalloproteinasi 13	MMP13	F- TCTTCTTGAGCTGGACCCACTGTT	FJ263939.1	288 pb
		R- ACCTCTAAGCCGAAGAAAGACTGC		
Fibrillina	FBN	F- TGGGATTTACCGTGCTTTAGCGT	NM_001001771.1	381 pb
		R- TTCTGGCACAGACAGTGGTCATCA		
Emilina	EMN	F- ACAAGACAGTGACGGACATGGAGT	XM_003125303.1	399 pb
		R- TGCTGCTGGATCTCATTGAGGGTT		
Tenascina	TEN	F- TTCAGTCGAAACAGCCCTTCTCA	NM_214230.1	347 pb
		R- AGAAGACTTCCAGCTTCTGGGCTT		
CollageneIII	COLIII	F- AGCCAGAACCATGCCAAATATGCG	XM_003133535.1	654 pb
		R- TGCCCTTTCATACCAGGGAATCCA		
Collagene I	COLI	F- GAACCAAAGGGCCCAAAGGTGAAA	NM_001243655.1	322 pb
		R- AGAGGGACCTTCTCACCAGCAAA		
Collagene IV	COLIV	F- ACAGTGCCACTCTATAGCGGGTTT	L47284.1	301 pb
		R- GTTTGGCTGTGAATGGCTATGGCA		
Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule	PECAM1	F- TCCTGCTGACACTTCAGCTCTGTT	NM_213907.1	262 pb
		R- ATAGACCCGGGCTTCGGAAATGAA		
Caldesmone	CLD	F- AGCTTCTTGGGTGGAAGAAGGGA	XM_003134653.1	854 pb
		R- ATCAGAAGGTTTGGGAGCAGGTGA		
Glicer aldeide 3 Fosfato Deidrogenasi	GAPDH	F- ACCACAGTCCATGCCATCAC	Liu <i>et al.</i> , 2004	450 pb
		R- TCCACCACCCTGTTGCTGTA		

Tabella 6. Primers per RT-PCR

12. Real-Time PCR (qPCR)

La *Real-Time* PCR è una tecnica che permette di stimare la quantità dei prodotti di PCR misurando il numero di cicli di amplificazione necessari allo sviluppo di un segnale fluorescente ben discriminato rispetto al rumore di fondo (Lekanne Deprez *et al.*, 2002). La chimica impiegata per la generazione del segnale di fluorescenza prevede, in questo lavoro, l'utilizzo del colorante intercalante "SYBR Green I", una molecola fluorescente in grado

di intercalarsi a livello del solco minore della doppia elica di DNA. L'emissione di un forte segnale di fluorescenza si osserva nella molecola complessata al DNA, mentre in forma libera, il segnale è significativamente ridotto. La reazione di amplificazione viene continuamente monitorata e l'incremento della fluorescenza può essere visualizzato in "tempo reale"; in questo modo è possibile misurare il numero di cicli necessari per il rilevamento di un segnale fluorescente (ciclo soglia, Ct) e usarlo per quantificare il livello di espressione di una sequenza *target*, definito per confronto con quello di un gene *housekeeping* (*calibrator*). Infatti, maggiore è il numero di copie di partenza del gene *target*, più basso è il ciclo di amplificazione in cui si osserverà un incremento significativo della fluorescenza. Inoltre, essendo il SYBR *Green* un colorante aspecifico che potrebbe legarsi a strutture dimeriche di *primers*, al termine dell'amplificazione si calcola la curva di *melting* dei prodotti di PCR, sottoponendoli ad un incremento progressivo di temperatura. Se l'amplificazione è specifica, la curva di dissociazione del DNA presenta un unico picco, corrispondente alla T_m (temperatura di *melting*) del gene amplificato.

12.1 Trascrizione inversa dell'RNA con *random* esameri

L'RNA totale estratto dalle cellule PBC è stato retrotrascritto in cDNA grazie all'enzima trascrittasi inversa utilizzando come *primer* una miscela di esanucleotidi. Per tale reazione è stato usato il kit " *ThermoScript*TM RT-PCR System" (Invitrogen). La reazione è stata allestita aggiungendo in un tubo 1 µl di *random* esameri (10 ng/µl), 2 µl di dNTPs *mix* (10 mM), e un volume di mRNA tale da contenere 1 µg di trascritto; infine è stata aggiunta acqua *RNase-free* fino a raggiungere un volume totale di 12 µl. Dopo incubazione a 65°C per 5 min per favorire la denaturazione dell'RNA, nel tubo sono stati aggiunti 4 µl di cDNA *Synthesis buffer* 5X, 1 µl di DDT (0,1 M), 1 µl di *RNase OUT*TM, 1 µl di *ThermoScript*TM e 1 µl di H₂O. La reazione è stata fatta avvenire nel termociclatore iCycler iQTM (Bio Rad) alle seguenti condizioni: 25°C 10 min (legame degli esameri all'RNA), 55°C 45 min (trascrizione inversa) e 85°C 5 min (inattivazione dell'enzima retrotrascrittasi). Infine è stato aggiunto 1 µl di RNasiH ed è stata eseguita un'incubazione a 37°C per 20 min; ciò è utile per degradare l'RNA rimasto. Dopo la trascrizione inversa, il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C.

12.2 Reazione di *Real-Time* PCR

I campioni di cDNA ottenuti dalla reazione di retrotrascrizione sono stati amplificati mediante gli oligonucleotidi elencati in Tabella 7 utilizzando HPRT (ipoxantina

fosforibosiltransferasi) come gene *calibrator* per la normalizzazione dei dati. Per la reazione di amplificazione è stato usato il kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), che prevede l'utilizzo di una SuperMix contenente Platinum[®] Taq DNA polimerasi, il colorante SYBR[®] Green I, Tris-HCl, KCl, 6 mM MgCl₂, 400 μM dGTP, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 800 μM dUTP, l'enzima uracil DNA glicosilasi (UDG), e dei reagenti stabilizzatori della reazione. La reazione è stata allestita aggiungendo in un tubo 12,5 μl di questa mix, 0,5 μl di *forward primer* (10 μM) e *reverse primer* (10 μM) 2 μl di cDNA e 9,5 μl di H₂O RNasi *free*. Le condizioni di amplificazione utilizzate sono state le seguenti: 50°C per 2 min (per permettere l'azione dell'enzima UDG), 95°C per 2 min, 40 cicli di denaturazione a 95°C per 30 sec, *annealing* a 50°C per 30 sec ed estensione a 72°C per 1 min. Al termine dell'amplificazione, le curve di *melting* sono state ottenute in un *range* di temperature tra 55 e 95°C, con l'incremento di un grado al secondo.

Per l'applicazione di questa metodica è stata usata la macchina DNA Engine Opticon[®] *Real-Time Thermal Cycler* (MJ Research), composta da un termociclatore con piastra da 96 pozzetti, da un rilevatore di fluorescenza, da una sorgente di luce (lampada LED) e dal *software* Opticon Monitor 3 per l'estrazione dei dati. Questo sistema di rilevamento offre una via per il monitoraggio dei prodotti di *Real-Time* PCR: durante ogni ciclo di PCR vengono raccolte le emissioni di fluorescenza da ogni provetta e alla fine della corsa di PCR i dati vengono rielaborati dal *software*.

Primers	Sigla	Sequenza (5'-3')	Sequenza di riferimento	Lunghezza
<i>Nanog homeobox</i>	NANOG	F- CGGACAAAGAGTTGGCTGTGCAAT	NM_024865.2	106 pb
		R- AGCTGGGTGGAAGAGAACACAGTT		
<i>POU class 5 homeobox</i>	OCT4	F- TATGCAAAGCAGAAACCCCTCGTGC	NM_002701.4	102 pb
		R- TTCGGGCACTGCAGGAACAAATTC		
<i>Zinc finger protein, omologo 42</i>	REX1	F- TGGAGGAATACCTGGCATTGACCT	NM_174900.3	105 pb
		R- AGCGATTGCGCTCAGACTGTCATA		
<i>Sex determining region Y box 2</i>	SOX2	F- CACATGAAGGAGCACCCGATTAT	NM_003106.3	191 pb
		R- GTTCATGTGCGCGTAACTGTCCAT		
Trascrittasi inversa della telomerasi	TERT	F- ACATGGAGAACAAGCTGTTTGCGG	NM_198253.2	66 pb
		R- TGAGGTGAGGTGTCACCAACAAGA		
<i>Kruppel-like factor 4</i>	KLF4	F- TGAAC TGACCAGGCACTACCGTAA	NM_004235.4	106 pb
		R- TCTTCATGTGTAAGGCGAGGTGGT		
Gene per la proteina p67 myc	c-Myc	F- ACAGCATACATCCTGTCCGTCCTCAA	D10493.1	79 pb
		R- TGTTCTCGTCGTTTCCGCAACAAG		
Segnale di traduzione e attivatore della trascrizione 3	STAT3	F- ATGGAAGAATCCAACAACGGCAGC	NM_213662.1	175 pb
		R- GGTCAATCTTGAGGCCTTGGTGA		
<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 9</i>	CXCL9	F- ACCAACCAAGGGACTATCCACCTA	NM_002416.1	178 pb
		R- TGGCTGACCTGTTTCTCCCACTTT		
<i>Indoleamina 2,3-diossigenasi 1</i>	IDO1	F- CACTTTGCTAAAGGCGCTGTTGGA	NM_002164.5	139 pb
		R- GGTTGCCTTTCCAGCCAGACAAAT		
<i>Cicloossigenasi 2</i>	COX2	F- CAAATCCTTGCTGTTCCCACCCAT	AY462100.1	172 pb
		R- GTGCACTGTGTTTGGAGTGGGTTT		
<i>Ipoxantina fosforibosiltransferasi 1</i>	HPRT1	F- ATGGACAGGACTGAACGTCTTGCT	NM_000194.2	79 pb
		R- TTGAGCACACAGAGGGCTACAATG		

Tabella 7. Primers per la reazione di *Real Time* PCR

RISULTATI

1. Colture cellulari e capacità proliferativa

Le sospensioni cellulari mononucleate hPBC e pPBC, ottenute mediante separazione su gradiente Ficoll, sono state seminate su piastre non condizionate di polistirene. Dopo 7-10 giorni dalla semina, l'analisi di microscopia ottica ha evidenziato la presenza di cellule aderenti di tipo fibroblastoide, organizzate in colonie CFU-F (Figura 22).

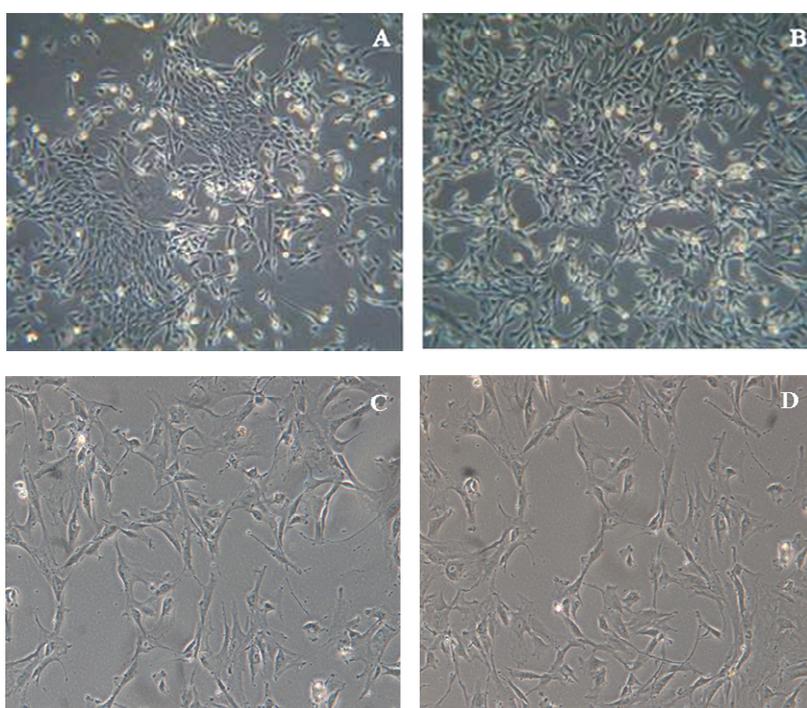


Figura 22. Analisi di microscopia ottica della coltura primaria pPBC (A, B) e hPBC (C, D) dopo 7 giorni dalla semina. Ingrandimento: (A, C, D) x100, (B) x200

La caratterizzazione morfologica mediante microscopia elettronica a scansione delle subcolture PBC ha messo in luce la presenza di cellule di grandezza variabile (20-40 μm) e caratterizzate da forma poliedrica o allungata. Le cellule pPBC sono risultate parzialmente sovrapposte tra di loro e caratterizzate da tipiche estroflessioni del tipo microvilli sulla membrana plasmatica (Figura 23 A, B, C). Le cellule hPBC, invece, hanno dimostrato una superficie liscia e tipiche espansioni di membrana in corrispondenza delle connessioni intercellulari (Figura 23 D, E, F).

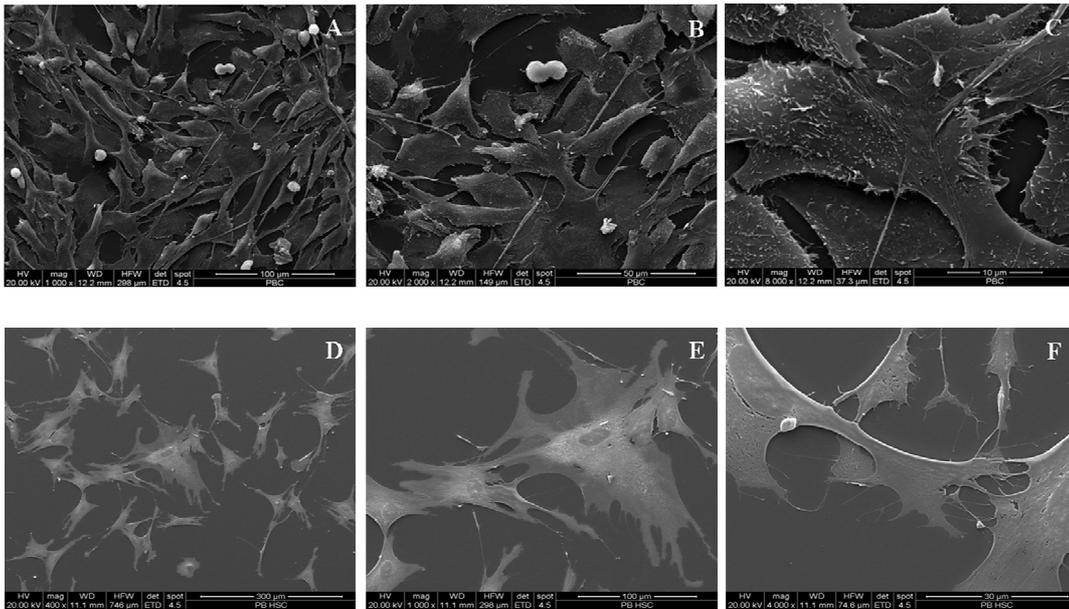


Figura 23. Microscopia elettronica a scansione della subcultura IV di cellule pPBC (A, B, C) e hPBC (D, E, F). Ingrandimento: (A) x1000, (B) x2000, (C) x8000, (D) x400, (E) x1000, (F) x4000

Le popolazioni PBC hanno dimostrato un elevato potenziale proliferativo che si è mantenuto costante durante la subcultura a lungo termine. Dopo 31 passaggi totali, all'analisi di microscopia ottica, non sono state rilevate significative alterazioni morfologiche e dimensionali (Figura 24).

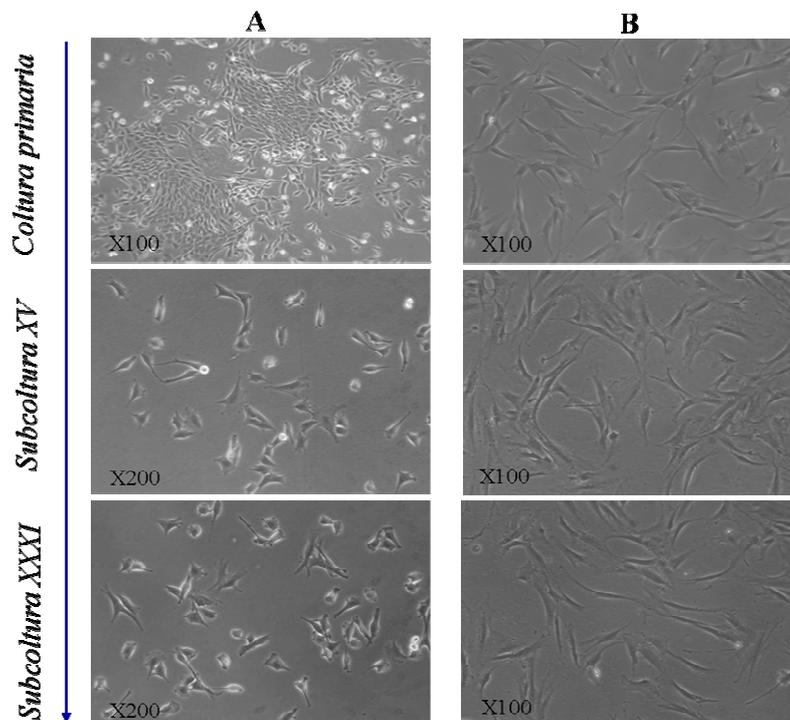


Figura 24. Analisi di microscopia ottica di cellule pPBC (A) e hPBC (B) durante la coltura pensiva *in vitro*

Lo studio della crescita a lungo termine è stato eseguito dalla generazione VII alla XXXI ed ha previsto la conta cellulare per ogni passaggio dopo 24 ore dalla semina (cellule pPBC: 5×10^3 cellule/cm²; cellule hPBC: 10^4 cellule/cm²). Ogni campione è stato preparato in triplicato e la media dei valori è stata utilizzata per l'identificazione del *doubling time* e del *doubling population*. Sia le cellule pPBC che le hPBC hanno mostrato una crescita esponenziale durante l'intero periodo di espansione a lungo termine, sebbene le cellule porcine abbiano rivelato un tasso di crescita più rapido. Infatti, le cellule pPBC hanno mostrato un tempo di replicazione di circa 16 h ed hanno eseguito circa 35 *population doubling* su 31 passaggi totali (Figura 25 A); la crescita delle cellule umane ha, invece, evidenziato un *doubling time* di 48 h e circa 5 *population doubling* su 31 passaggi in coltura (Figura 24B).

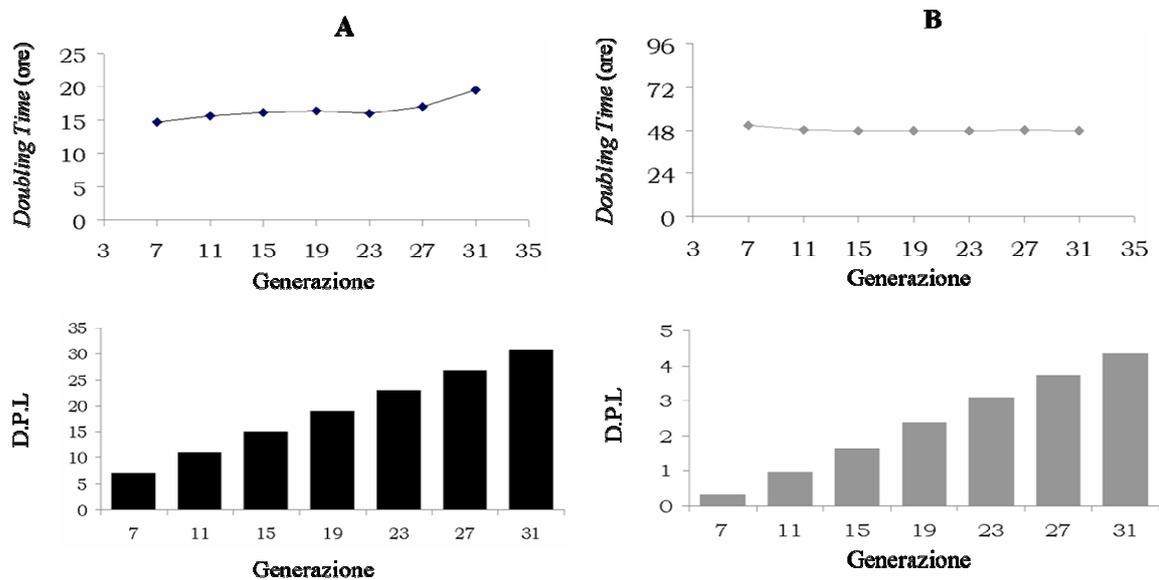


Figura 25. *Doubling time* e *Doubling Population* cumulativo (D.P.L.) delle popolazioni pPBC (A) e hPBC (B). Ogni valore riportato in grafico corrisponde alla media di tre diversi esperimenti

2. Studio di espressione genica nelle popolazioni PBC

2.1 Geni di pluripotenza

Lo studio di espressione genica mediante qPCR ha evidenziato che sia le cellule pPBC che le hPBC esprimono a livello di RNA messaggero i geni tipicamente associati al *self-renewal* e alla pluri- o multipotenza, come NANOG, REX1, SOX2, TERT, Klf4, c-Myc, NOTCH e STAT3. Negli istogrammi di Figura 26 i risultati della reazione di

amplificazione sono rappresentati come ΔCt , ovvero come differenza tra il Ct del gene *calibrator* (HPRT) e quello del gene *target*: il livello di espressione di ciascun gene di interesse, dunque, è definito in riferimento all'espressione del gene *housekeeping* HPRT.

L'analisi è stata effettuata su tre popolazioni cellulari e i risultati sono stati ottenuti calcolando la media dei dati ottenuti per ciascun gene *target*. Lo studio è stato ripetuto su su tre generazioni (VII, XV e XXXI) di ciascuna popolazione. Come mostrato nelle Figure 26 A e B, una minore espressione dei marcatori di pluripotenza è stata misurata nelle cellule pPBC (Figura 26 A) rispetto alle hPBC (Figura 26 B) soprattutto per geni c-Myc e Klf4. Inoltre, non è stata osservata la presenza di mRNA del gene umano e porcino TERT e del gene porcino OCT4 (Figura 26).

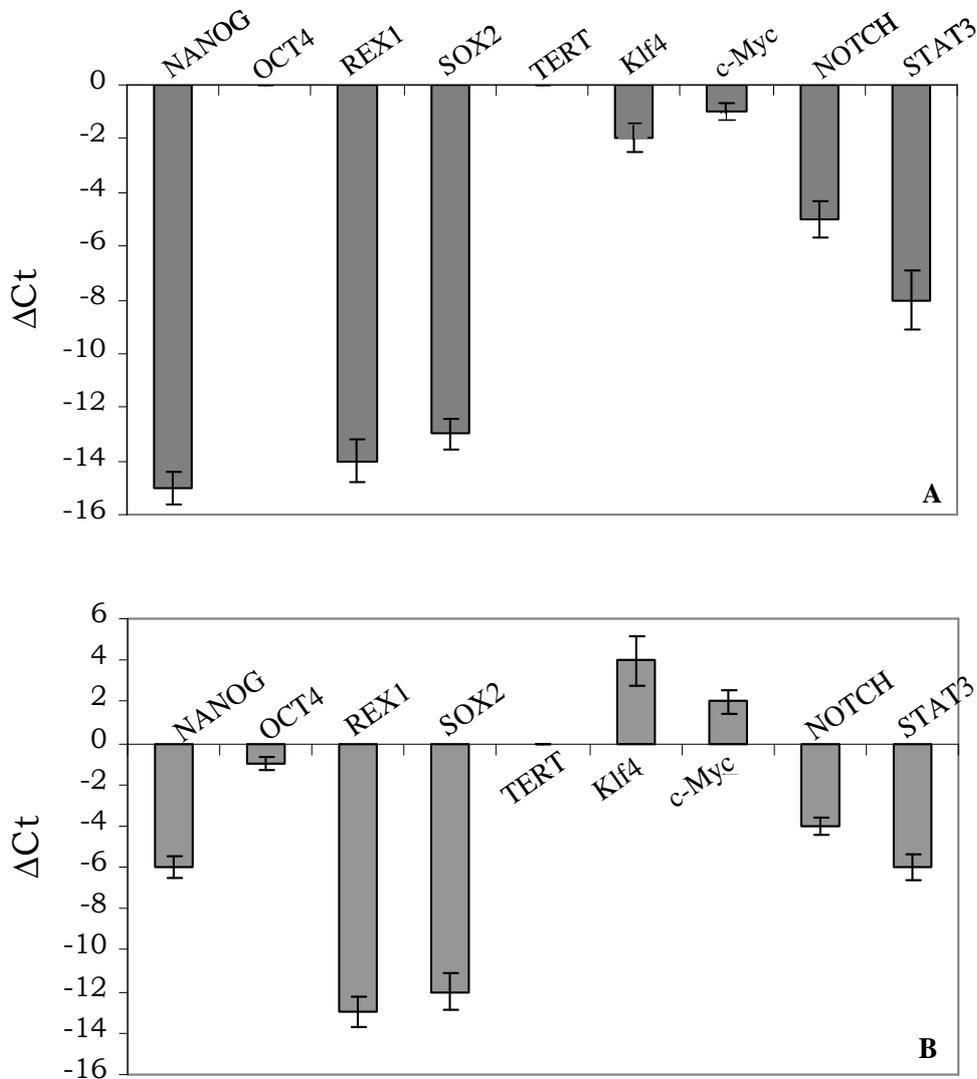


Figura 26. Studio di espressione mediante *Real-Time* PCR dei geni di pluripotenza in pPBC (A) e hPBC (B). I dati sono presentati come $\Delta Ct = Ct_{calibrator} - Ct_{target}$

2.2 Marcatori di matrice extracellulare

Per una migliore caratterizzazione delle popolazioni pPBC e hPBC, è stato effettuato uno studio di espressione delle proteine di matrice extracellulare. L'analisi di RT-PCR ha messo in evidenza l'espressione a livello di RNA messaggero della proteina metalloproteinasi 2 (MMP2) e della tenascina (TNC) nelle cellule porcine e della sola MMP2 nelle cellule umane (Figura 27).

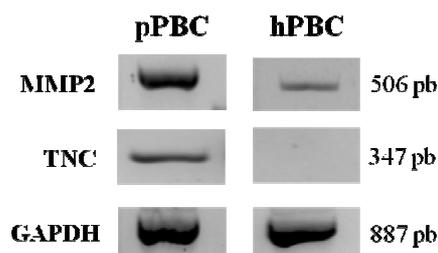


Figura 27. Espressione mediante RT-PCR di metalloproteinasi 2 e tenascina in cellule pPBC e hPBC. In parallelo, è stato caricato l'amplificato del gene *housekeeping* GAPDH. I prodotti di amplificazione sono stati caricati su un gel di agarosio al 2% preparato con GelRed

3. Caratterizzazione fenotipica delle cellule PBC

L'analisi citofluorimetrica dell'immunofenotipo ha dimostrato che le popolazioni PBC estratte presentano profili di espressione distintivi a seconda della specie di origine.

In particolare, le cellule pPBC sono risultate positive per i marcatori tipicamente espressi su cellule staminali mesenchimali porcine. Esse, infatti, sono risultate altamente positive per il CD44 (98,2%), per il CD106 (20,7%), per il CD34 (23,2%) e negative per l'espressione del CD45 (0%) e del CXCR4 (0,4%). È stata inoltre evidenziata una bassa espressione per il CD90 (8,5%) e lo SLA-DR (12,2%). Dopo la coltura espansiva, è stato osservato che l'espressione di CD90 e di CD34 tende a decrescere ($p < 0,01$) a valori corrispondenti al 3,7% e 9,4%. L'espressione del marcatore SLA-DR maggiore del 2% è dovuta probabilmente alla reattività cellulare indotta dall'alta concentrazione di FBS nel terreno di coltura (Figura 28 A).

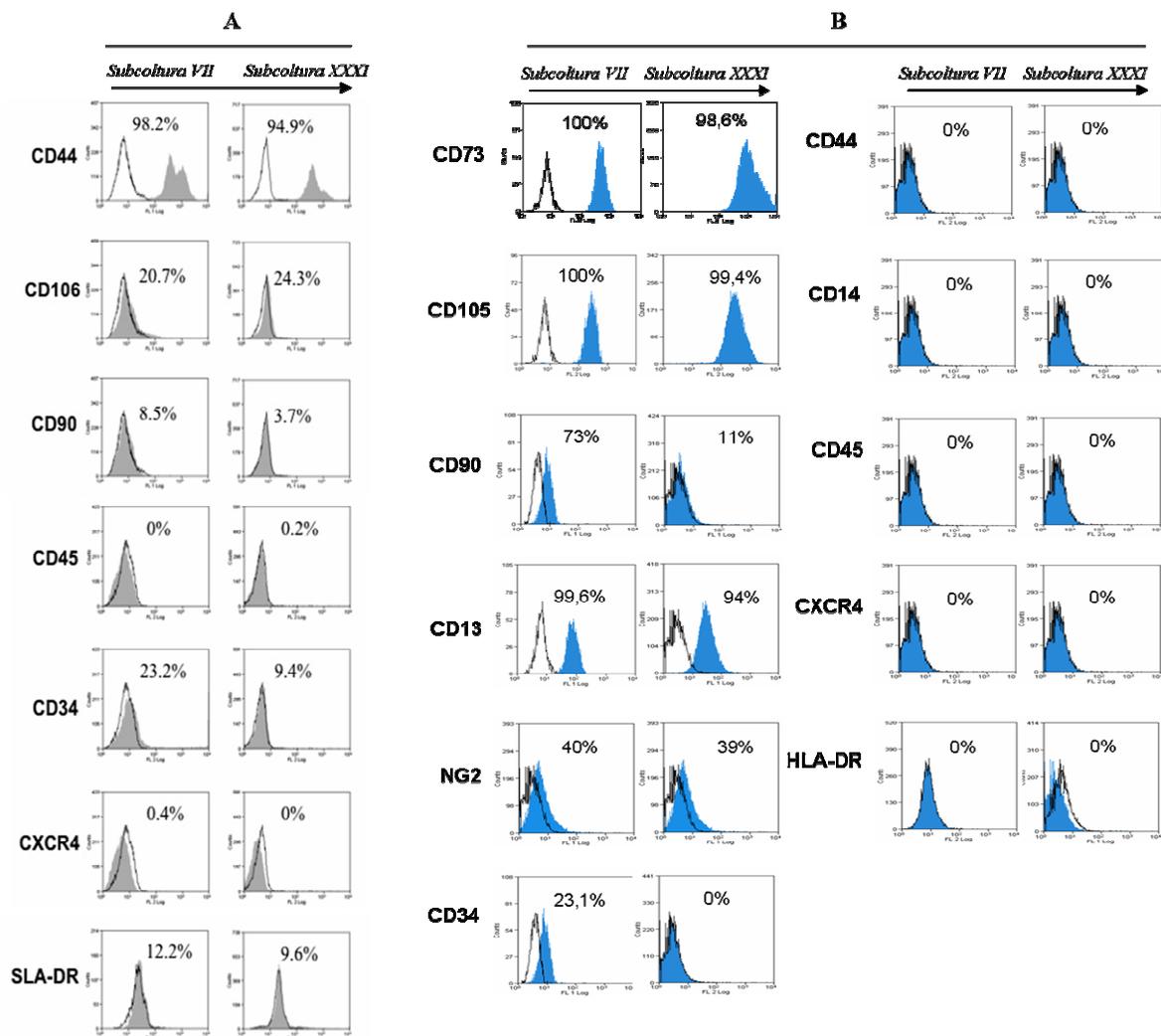


Figura 28. Caratterizzazione citometrica dell'immunofenotipo delle subculture VII e XXXI delle cellule pPBC (A) e hPBC (B). I valori di positività sono riportati come percentuale (%) rispetto al controllo di marcatura. (A) Profilo grigio: trattato; profilo nero: controllo (isotipico a anticorpo secondario coniugato). (B) Profilo blu: trattato; profilo nero: controllo (isotipico a anticorpo secondario coniugato)

Le cellule hPBC hanno mostrato un'alta positività ai marcatori della linea staminale mesenchimale, quali CD105 (100%), CD73 (100%) e CD90 (73%). Similmente alle cellule multipotenti isolate dalla nicchia perivascolare (Minasi, 2002), sono risultate positive al CD34 (23,1%) oltre che ai marcatori tipicamente espressi dai periciti (Corselli *et al.*, 2010; Traktuev *et al.*, 2008) quali CD13 (99,4%) e NG2 (40%). Infine, le popolazioni umane sono risultate negative per a) i marcatori della linea ematopoietica (CD45 e il CD14); b) il CD44 e il CXCR4, espressi tipicamente dalle cellule di origine midollare; c) le molecole MHC di classe II (HLA-DR). Come osservato nelle cellule porcine, i livelli di espressione del CD90 (11%) e del CD34 (0%) si sono ridotti durante la coltura espansiva delle hPBC (Figura 28 B).

4. Analisi del cariotipo

Durante la coltura espansiva, le cellule staminali possono accumulare mutazioni cromosomiche ed acquisire un fenotipo aneuploide (La Rocca *et al.*, 2009). Pertanto, lo studio della stabilità genotipica delle cellule hPBC è stato eseguito mediante l'analisi del cariotipo (30 metafasi) di tre diverse generazioni (VII, XV e XXXI). I risultati non hanno evidenziato mutazioni cromosomiche pertanto i cariotipi sono stati considerati normali (Figura 29).

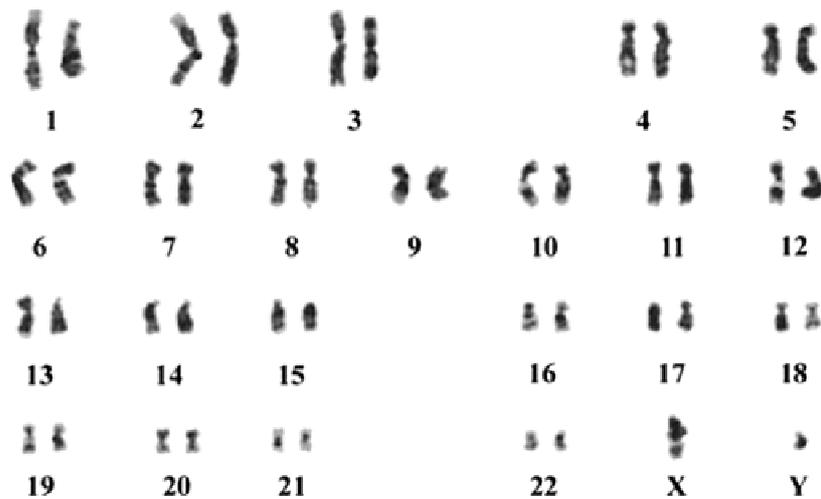


Figura 29. Cariotipizzazione di cellule hPBC

5. Caratterizzazione del potenziale multidifferenziativo delle cellule PBC

Il potenziale differenziativo delle subcolture porcine e umane a partire dalla generazione VII è stato testato mediante stimolazione con terreni specifici induttivi.

Le cellule pPBC hanno mostrato responsività agli stimoli differenziativi in senso adipogenico ed osteogenico, come dimostrato dall'acquisizione di caratteristiche tipiche delle cellule adipose mature, quale l'accumulo citoplasmatico di trigliceridi, e degli osteoblasti, quale la Inoltre, sebbene esprimano mRNA specifici di linea, non hanno mostrato una significativa potenzialità condrogenica.

Trattate con specifici terreni di coltura, le cellule hPBC evidenziano di essere responsive agli stimoli differenziativi miogenici e neurogenici.

5.1 Differenziamento adipogenico

Come dimostrato in Figura 30, nei campioni stimolati per 7 e 14 giorni con i fattori adipogenici (insulina, IBMX, DEX e indometacina), sono stati osservati, mediante colorazione Oil Red O, tipici accumuli citoplasmatici di trigliceridi (Figura 30 B, C, E ed F) rispetto al controllo non differenziato (Figura 30 A e D). Tale potenziale differenziativo si è mantenuto inalterato nella coltura espansiva fino alla generazione XXXI.

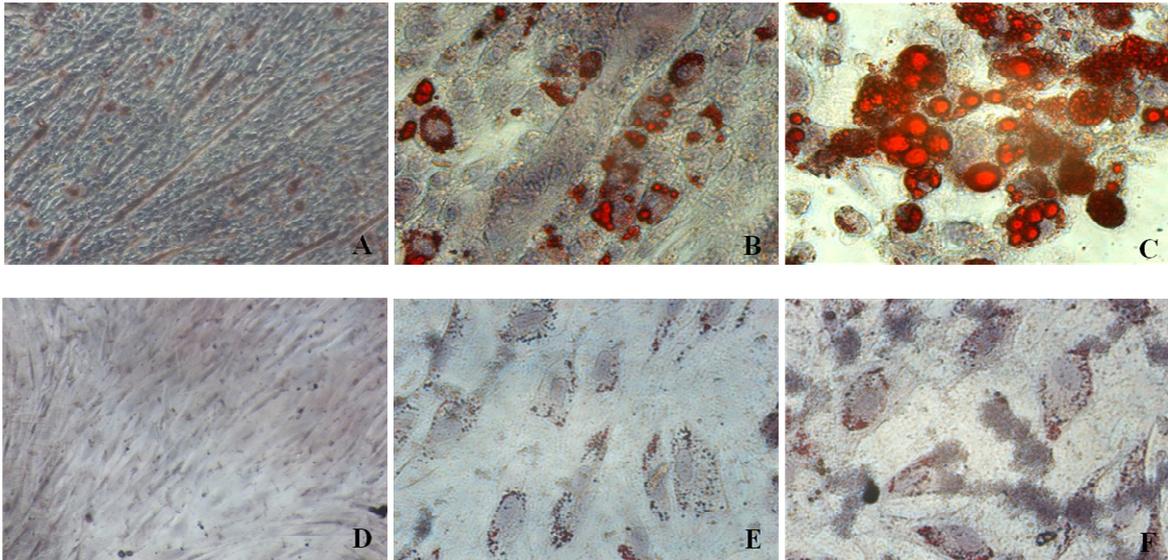


Figura 30. Colorazione Oil Red O su subcoltura VII di cellule pPBC (A, B, C) e hPBC (D, E, F) dopo 7 giorni (B, E) e 14 giorni (C, F) dall'induzione adipogenica. In A e D, è riportato il controllo indifferenziato. Ingrandimento: (A, D) 100X, (B, C, E, F) x200

5.2 Differenziamento osteogenico

Dopo stimolazione con i fattori induttivi osteogenici (desametasone, β -glicerofosfato e acido ascorbico), le cellule pPBC e hPBC hanno risposto al trattamento acquisendo la capacità di depositare sali di calcio, rilevati mediante la colorazione Von Kossa (Figura 31 B, C, E, F). Una simile produzione di matrice extracellulare mineralizzata non è stata, invece, osservata nei controlli indifferenziati (Figura 31 A, D).

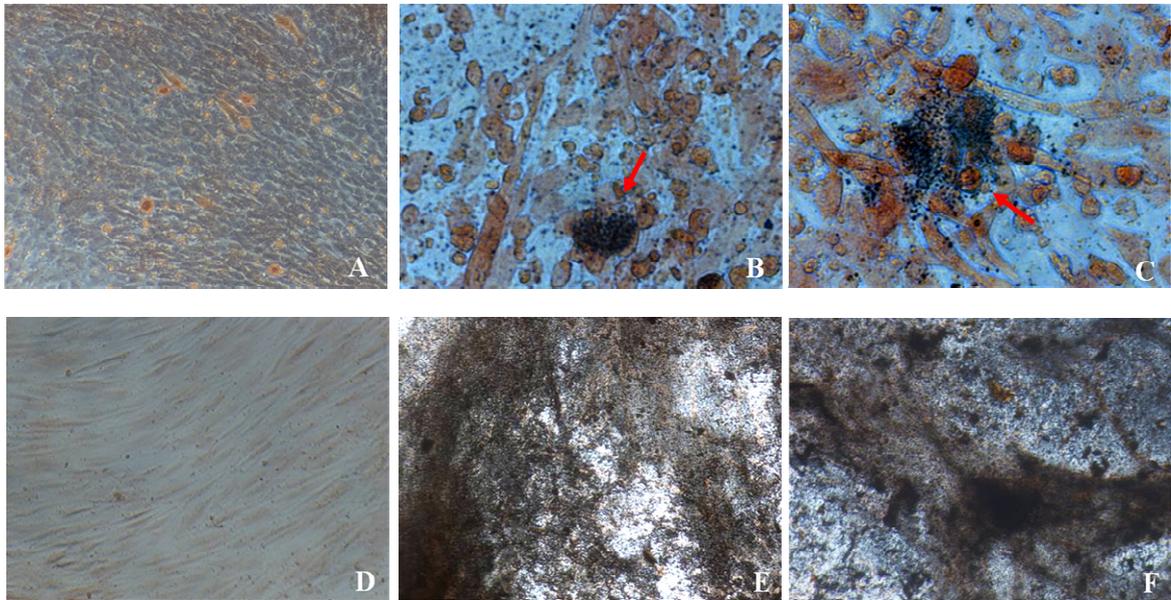


Figura 31. Colorazione Von Kossa su subcoltura VII di pPBC (A, B, C) e hPBC (D, E, F) dopo 7 e 14 giorni dall'induzione osteogenica: (A, D) controlli indifferenziati; (B, E) trattati per 7 gg; (C, F) trattati per 14 gg. Ingrandimento: (A, D) x100, (B, C, E, F) x200

5.3 Differenziamento condrogenico delle cellule pPBC

La colorazione Alcian blue sui campioni differenziati ed indifferenziati ha dimostrato che le cellule pPBC, indipendentemente dalla stimolazione condrogenica, sono caratterizzate dall'espressione di mucine acide a livello di membrana (Figura 32 A e B). E' riportato in letteratura che numerose popolazioni cellulari staminali presentano tale caratteristica (Reza *et al.*, 2011).

Come dimostrato nella Figura 32 C, la proteina SPARC risulta essere espressa come mRNA nelle popolazioni pPBC anche dopo la stimolazione condrogenica.

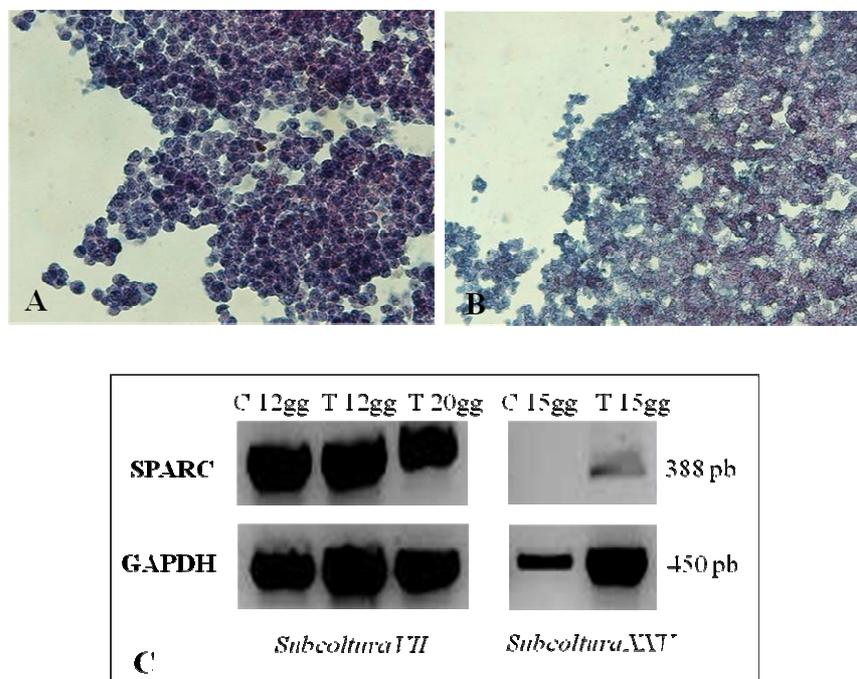


Figura 32. (A, B) Colorazione Alcian Blue su pPBC differenziate in senso condrogenico. (A) Controllo non trattato; (B) Trattato differenziato. I nuclei appaiono di colore rosso, il citoplasma di rosa pallido mentre le mucosostanze e le mucine acide di blue. Ingrandimento: x200. (C) Valutazione dell'espressione di mRNA per la proteina SPARC su colture pPBC stimulate con terreno condrogenico. In parallelo, il gene *housekeeping* GAPDH è risultato espresso in tutti i campioni di RNA presi in esame

5.4 Differenziamento miogenico e neurogenico di cellule hPBC

L'acquisizione di un fenotipo simil muscolare è stata verificata mediante analisi di immunofluorescenza (Figura 33 A). Dopo 14 gg di trattamento induttivo, è stata osservata l'espressione di marcatori quali la miogenina e la catena pesante della miosina (MHC). In parallelo, un'analisi di espressione genica ha evidenziato la presenza di mRNA per il MYF5 nei campioni di controllo e nei trattati mentre l'espressione di tropomiosina (TPM) è risultata solo nei campioni trattati per 14 gg con terreno induttivo (Figura 33 B).

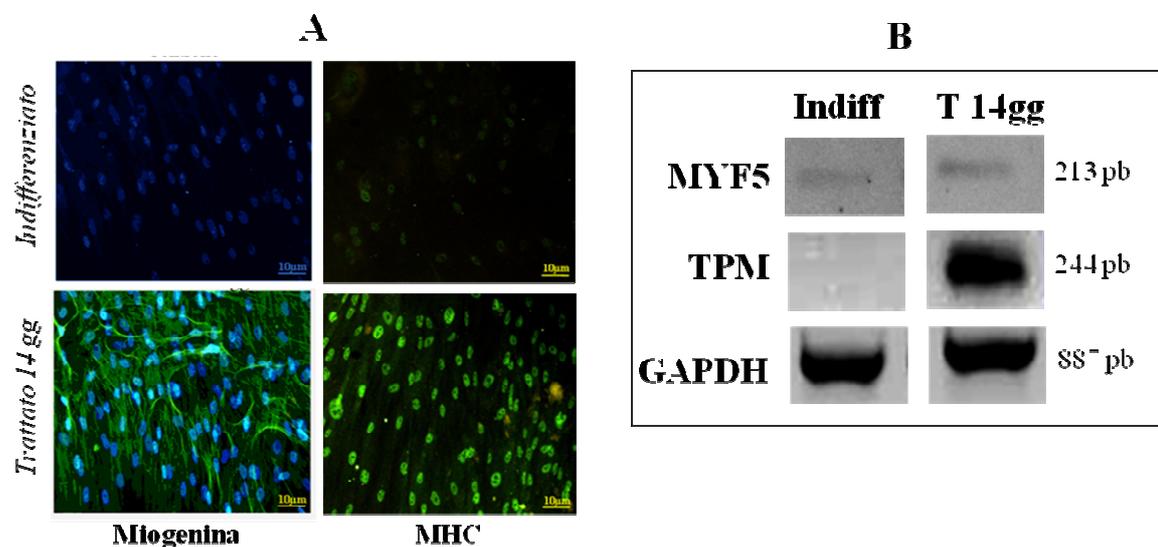


Figura 33. (A) Studio di marcatori della linea miogenica mediante immunofluorescenza su cellule hPBC trattate con terreno induttivo. L'analisi è stata eseguita mediante marcatura indiretta utilizzando gli anticorpi primari *mouse anti-human* miogenina e *mouse anti-human* MHC e l'anticorpo secondario *anti-mouse* coniugato al fluorocromo FITC (Ingrandimento: x100). (B) Analisi di espressione genica mediante RT-PCR per MYF5 e TPM su colture hPBC stimulate con terreno miogenico. In parallelo, il gene *housekeeping* GAPDH è risultato espresso in tutti i campioni analizzati

Le cellule hPBC si sono rivelate responsive anche a stimoli neurogenici, come dimostrato dallo studio di immunofluorescenza, che ha consentito di verificare l'acquisizione di caratteristiche simil neuronali mediante l'identificazione di proteine specifiche quali NeuN (*Neuronal nuclear antigen*) e NEFM (Neurofilamenti). La nestina, comunemente considerata un marcatore neuronale, è stata osservata nei campioni indifferenziati (Figura 34). Pertanto, la sua presenza è stata considerata indicativa del grado di staminalità della popolazione piuttosto che del grado differenziativo neuronale acquisito.

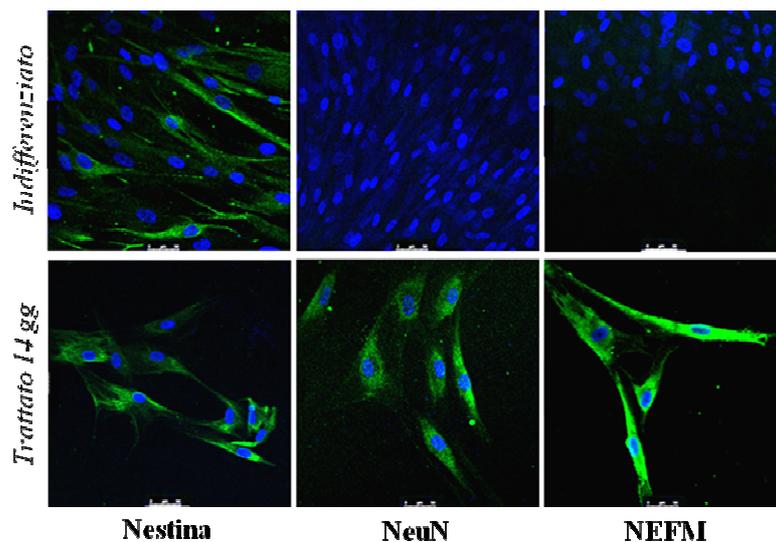


Figura 34. Studio di marcatori della linea neuronale mediante immunofluorescenza su cellule hPBC (subcultura XV) trattate con terreno induttivo (Ingrandimento: x100)

6. Studio delle potenzialità di impiego delle cellule PBC in medicina rigenerativa

Lo studio di caratterizzazione ha messo in evidenza il grado di staminalità e la plasticità differenziativa delle popolazioni pPBC e hPBC isolate. Successivamente, sono state oggetto di studio le loro potenzialità di impiego nell'ingegneria tissutale.

Cellule pPBC

E' stato verificato l'impiego delle popolazioni cellulari fibroblastoidi circolanti nel recupero di danni al miocardio e alle valvole cardiache. Avendo utilizzato come modello il *minipig*, per tali studi sono state utilizzate le cellule pPBC.

Cellule hPBC

L'identificazione di una sorgente autologa di cellule staminali in alternativa al midollo osseo suscita da anni un forte interesse nel campo medico. E' stato dimostrato che il trapianto di cellule mesenchimali in modelli animali di neurodegenerazione ha consentito il controllo dell'evoluzione della malattia e, in alcuni casi, la risoluzione del quadro patologico. Non avendo osservato un contributo diretto del trapianto staminale al processo di rigenerazione mediante integrazione nel tessuto neuronale e differenziamento in cellule tessuto-specifico, è stato ipotizzato che le cellule staminali possano facilitare o modulare la risposta del ricevente al danno mediante specifiche attività immunomodulatorie. Pertanto,

in questo studio, sono state verificate le proprietà immunogeniche delle cellule hPBC mediante test *in vitro* di co-coltura con linfociti umani.

6.1 Potenziale cardiomiogenico delle cellule pPBC

Come riportato in Figura 35, dopo 7 e 14 giorni dal trattamento con l'agente 5-AZA, nelle subcolture pPBC è stata osservata, mediante immunofluorescenza, l'espressione di specifici marcatori di linea cardiomiogenica, quali l' α -actina muscolo specifica (ACTC1) (Figura 35 B, C), la troponina cardiaca T (TNNT2) (Figura 35 E, F) e fosfolambano (PLN) (Figura 35 B, C). Nessun segnale di fluorescenza è stato osservato nei campioni di controllo indifferenziato (Figura 35 A, D; Figura 36 A).

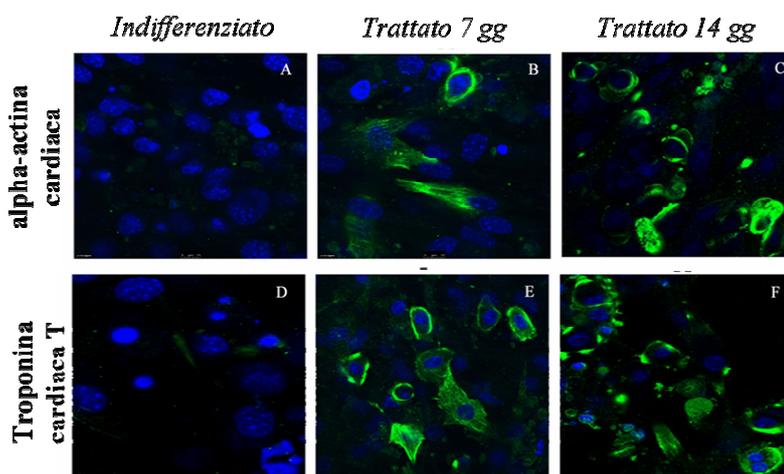


Figura 35. Caratterizzazione mediante immunofluorescenza dell'espressione di alfa-actina (A, B, C) e troponina cardiaca T (D, E, F) su subcoltura VII di pPBC dopo 7 (B, E) e 14 giorni (C, F) dall'induzione cardiomiogenica. In (A) e (D) sono rappresentati i controlli indifferenziati. Ingrandimento: x630

Per confermare il dato di immunofluorescenza ottenuto per il fosfolambano, è stato eseguito uno studio di espressione proteica. I lisati cellulari sono stati separati mediante SDS-PAGE e trasferiti su membrana di nitrocellulosa. Nei campioni trattati è stata osservata una banda di 25 KDa, corrispondente alla grandezza del fosfolambano nella forma pentamerica (Figura 36 D).

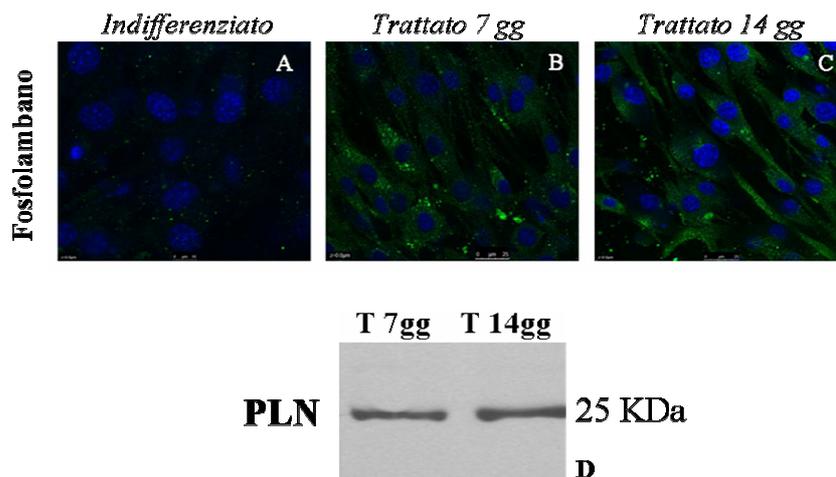


Figura 36. Caratterizzazione dell'espressione di fosfolambano mediante immunofluorescenza (A, B, C) e Western Blot (D) su subcoltura VII di pPBC dopo 7 (B, D) e 14 giorni (C, D) dall'induzione cardiomiogenica. In (A) è riportato il controllo indifferenziato. Ingrandimento: (A, B, C) x630

6.2 Ricostruzione di una valvola cardiaca *in vitro* mediante cellule pPBC e matrici acellulari

La crescita delle popolazioni PBC è stata eseguita su matrici porcine valvolari (aortiche e polmonari) decellularizzate (VDA, VDP). Le matrici valvolari sono state fornite dal gruppo di ricerca del Prof Spina (Dipartimento di Biologia "A. Vallisneri", Università di Padova).

6.2.2 Caratterizzazione delle matrici acellulari

Uno studio preliminare di microscopia elettronica a scansione sulle matrici VDA e VDP ha confermato l'assenza di corpi cellulari sulla superficie valvolare (Figura 37).

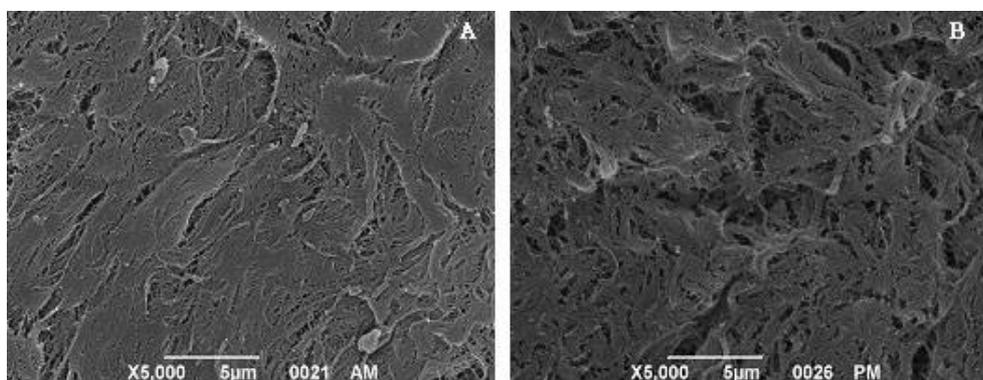


Figura 37. Analisi SEM delle valvole decellularizzate VDA (A) e VDP (B). Ingrandimento: (A, B) x5000.

Il procedimento detergente enzimatico TRICOL è un metodo di decellularizzazione efficace che non altera le caratteristiche strutturali coinvolte nell'adesione cellulare alla matrice ECM (Spina *et al.*, 2003). L'analisi di immunofluorescenza sulle matrici acellulari ha evidenziato la presenza di componenti di matrice extracellulare quali l'elastina (Figura 38 A), il collagene IV (Figura 38 B) e il collagene I (Figura 38 C).

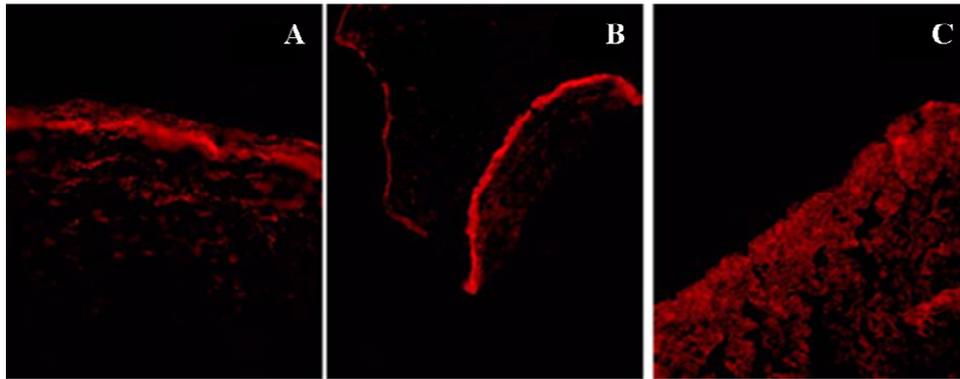


Figura 38. Analisi di immunofluorescenza di elastina (A), collagene IV (B) e collagene I (C) sulle matrici valvolari acellulari. Ingrandimento: x200.

6.2.3 Crescita delle pPBC su matrici valvolari decellularizzate

All'analisi SEM, dopo 7 e 14 giorni dalla semina, le cellule pPBC sono risultate adese ai supporti VD e organizzate in modo orientato sull'intera superficie ventricolare (Figura 39 A, B, C, D). Le cellule pPBC hanno conservato le caratteristiche estroflessioni della membrana cellulare dopo la semina su entrambi i tipi di matrici (Figura 39 a, b) ed il numero di microvilli sembra aumentare nel corso della coltura (Figura 39 c, d).

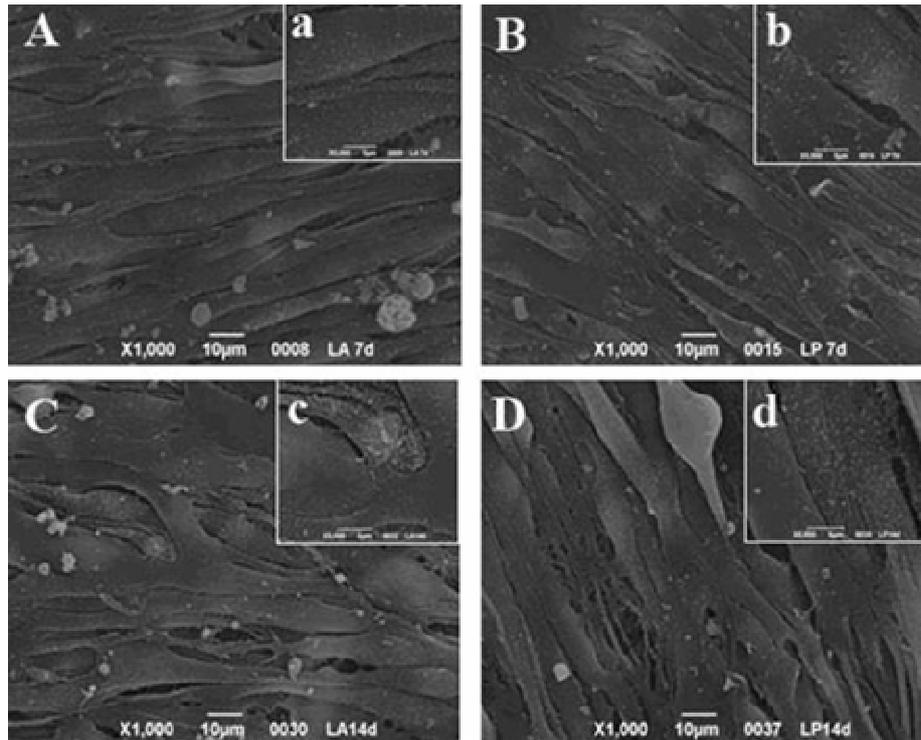


Figura 39. Analisi SEM delle cellule pPBC su matrici valvolari decellularizzate VDA (A, a, C, c) e VDP (B, b, D, d) dopo 7 (A, a, B, b) e 14 giorni (C, c, D, d) dalla semina. Ingrandimento: (A, B, C, D) x1000, (a, b, c, d) x5000

Dopo 28 giorni dalla semina è stata osservata una differenza morfologica tra le cellule seminate sulla valvola aortica e quelle seminate sulla matrice polmonare. Infatti, le cellule su VDA hanno mantenuto una morfologia nastriforme e una distribuzione ordinata e parallela (Figura 40 A). Al contrario, sui campioni preparati su VDP le cellule sono apparse significativamente di dimensioni maggiori e con forma poliedrica (Figura 40 B); tale diversificazione morfologica si è mantenuta anche dopo 35 giorni dalla semina (Figura 40 C, D). Inoltre, tra le cellule sono stati osservati numerosi legami intercellulari (Figura 40 a, b).

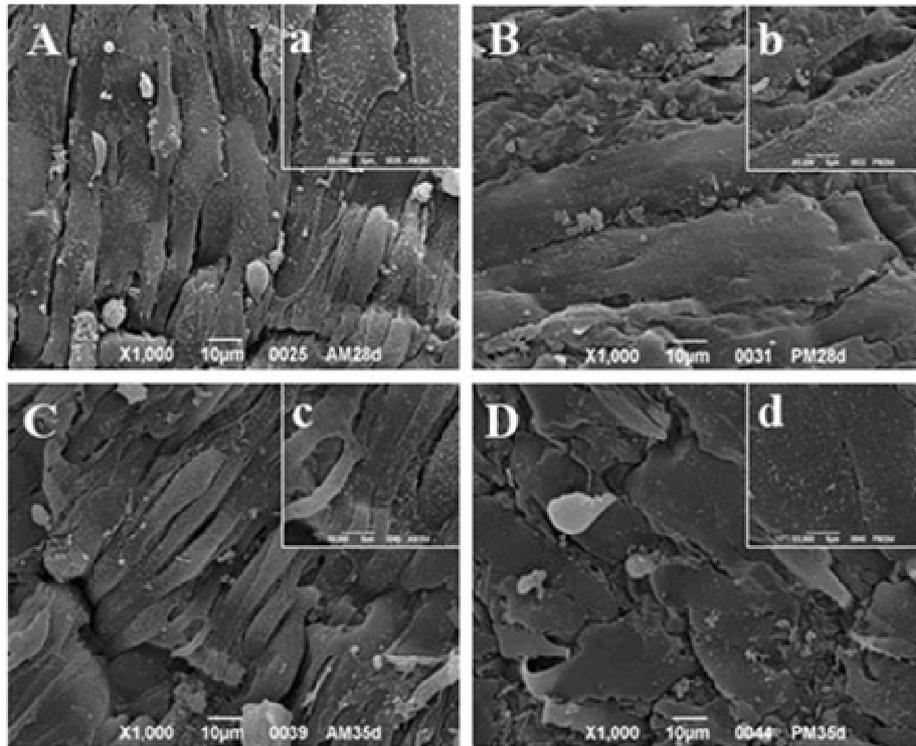


Figura 40. Analisi SEM delle cellule pPBC su matrici valvolari decellularizzate VDA (A, a, C, c) e VDP (B, b, D, d) dopo 28 (A, a, B, b) e 35 giorni (C, c, D, d) dalla semina. Ingrandimento: (A, B, C, D) x1000, (a, b, c, d) x5000

Il monostrato cellulare è risultato integro sulla superficie ventricolare di VDA (Figura 41 A, B) e VDP per tutta la durata della coltura *in vitro* (35 giorni). Solo sulle matrici VDA si è distribuito anche sulla superficie fibrosa (Figura 41 C, D).

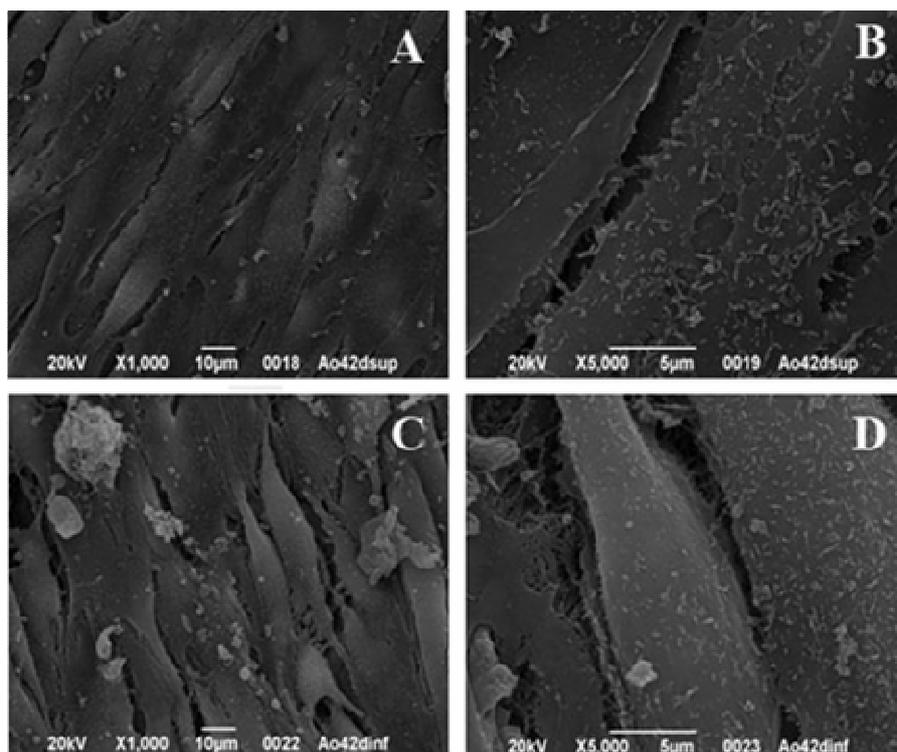


Figura 41. Analisi SEM delle cellule pPBC sulla superficie ventricolare (A, B) e fibrosa (C, D) di matrici valvolari VDA dopo 35 giorni dalla semina. Ingrandimento: (A, C) x1000, (B, D) x5000.

Non è stata osservata alcuna colonizzazione a tutto spessore delle matrici VD da parte delle cellule PBC (Figura 42), come dimostrato, a differenti intervalli di tempo dalla semina, su sezioni istologiche colorate con DAPI.

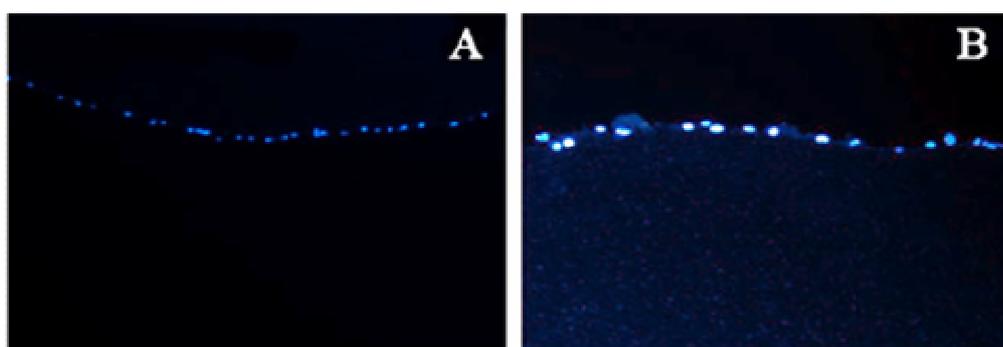


Figura 42. Valutazione della distribuzione delle cellule pPBC su matrici VDA (A) e VDP (B) mediante colorazione con DAPI. Ingrandimento: (A) x100, (B) x200.

Le popolazioni PBC hanno mantenuto l'espressione dell' α -actina dopo coltura a lungo termine sulle matrici VDA (Figura 43 A) e VDP (Figura 43 B). I siti specifici sono stati rivelati con il reagente DAB ed appaiono con una caratteristica colorazione marrone.

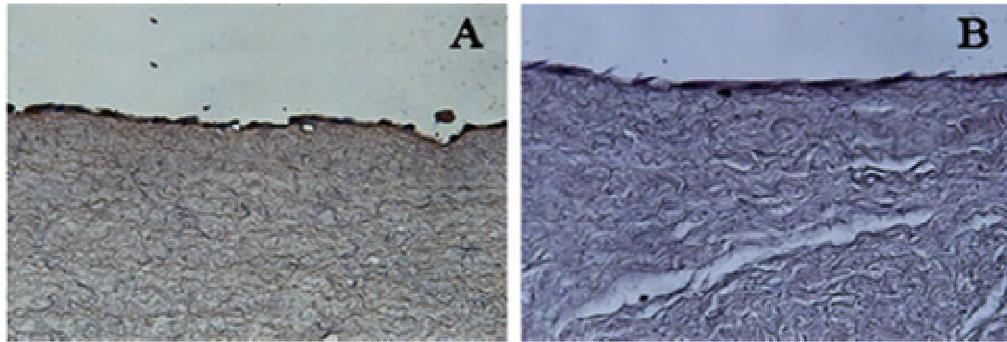


Figura 43. Valutazione dell'espressione di α -actina mediante immunistochimica su cellule pPBC coltivate per 35 giorni su matrici VDA (A) e VDP (B). Ingrandimento: x200.

Lo studio mediante RT-PCR ha dimostrato un caratteristico profilo di espressione delle popolazioni pPBC. Come indicato nella Figura 44, le cellule allo stato indifferenziato sono attive nell'espressione di mRNA per metalloproteinasi 2 (MMP2), fibrillina (FBN), Emilina (EMI), tenascina (TNC), collagene I (COLI), collagene III (COLIII) e caldesmone (CDM). Tale profilo di espressione è compatibile con un fenotipo di tipo miofibroblastico (Mendelson *et al.*, 2006). La crescita delle popolazioni pPBC sulle matrici acellulari aortica e polmonare ha indotto un drastico abbassamento della loro espressione genica come dimostrato a tempi precoci (7 gg) dall'assenza di specifici messaggeri (eccetto per il collagene III nelle matrici VDP). A 28 gg e 35 gg, è stata osservata la presenza di mRNA, rispettivamente, per MMP2 e MMP13 nei campioni allestiti con le matrici VDA mentre i messaggeri per EMI, FBN e CDM sono stati osservati a 35 gg nei costrutti preparati con le matrici VDP (Figura 44). In entrambe le matrici, le cellule pPBC hanno mostrato positività all'analisi di RT-PCR per la tenascina C (TNC), una glicoproteina di matrice extracellulare particolarmente espressa in prossimità dei vasi neoformati e coinvolta nel processo rigenerativo tessutale (Mackie *et al.*, 1988, Dalkowski *et al.*, 1999; Kaarteenaho-Wiik *et al.*, 2000). Un'espressione precoce (7 gg) e tardiva (35 gg) di collagene III è stata identificata rispettivamente sulle matrici VDP e VDA.

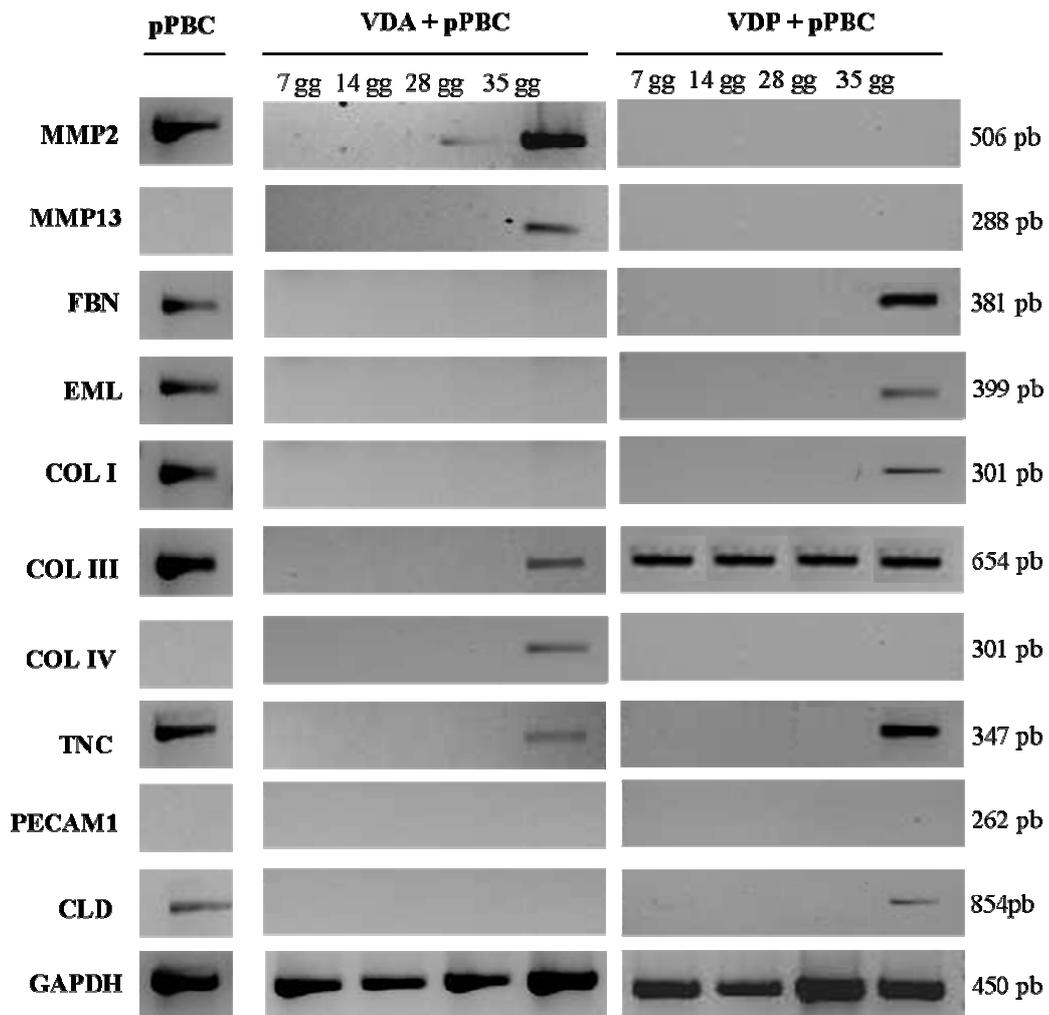


Figura 44. Valutazione dell'espressione di mRNA su pPBC allo stato indifferenziato e su pPBC seminate su VDA e VDP. In parallelo, il gene *housekeeping* GAPDH è risultato espresso in tutti i campioni di RNA presi in esame

6.3 Proprietà immunomodulatorie delle cellule hPBC

Lo studio delle proprietà immunomodulatorie delle cellule hPBC è stato eseguito *in vitro* utilizzando specifiche condizioni sperimentali per la simulazione di un contesto infiammatorio. La risposta cellulare all'infiammazione è stata studiata mediante valutazione della reattività al trattamento con la citochina pro-infiammatoria INF γ mentre l'attività immunomodulatoria è stata definita mediante co-coltura delle cellule hPBC con linfociti umani.

6.3.1 Trattamento con $\text{INF}\gamma$

Le cellule hPBC mantenute per 48 h in terreno proliferativo addizionato con 25 ng/ml (*low dose*) o 500 ng/ml (*high dose*) di $\text{INF}\gamma$ sono state analizzate mediante *Real-Time* PCR per l'espressione di geni tipicamente coinvolti nella risposta infiammatoria, quali CXCL9, IDO1 e COX2 (Figura 45). In parallelo, lo studio è stato eseguito su cellule non trattate.

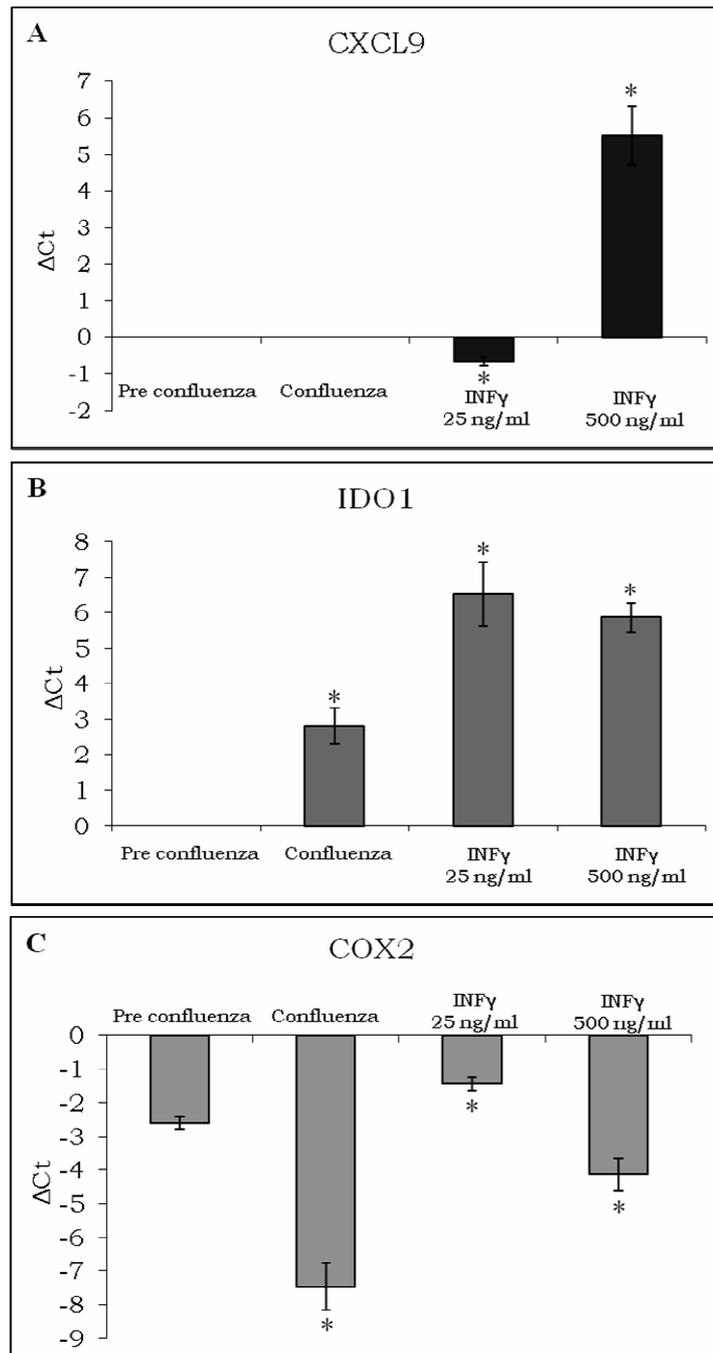


Figura 45. Analisi di espressione genica mediante *Real-Time* PCR di CXCL9 (A), IDO1 (B) e COX2 (C) in hPBC non stimulate in pre-confluenze e in confluenza, e trattate con $\text{INF}\gamma$. I risultati sono presentati come $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{calibrator}} - \text{Ct}_{\text{target}}$ (*: $p < 0,05$)

Come mostra la Figura 45 A, l'analisi di *Real-Time* PCR ha messo in evidenza che il trattamento con INF γ , sia a basse che ad alte concentrazioni, induce in modo significativo l'espressione di CXCL9, una chemochina che, attraverso l'interazione con il proprio ligando CXCR3 espresso dai linfociti T_{Reg}, ne stimola il reclutamento nel sito dell'infiammazione, mediando, così, un effetto immunosoppressivo della reazione infiammatoria (Saiman e Friedman, 2012).

Risulta significativamente *upregolata* dal trattamento con interferone anche l'espressione di IDO1 (Figura 45 B), un enzima coinvolto nella modulazione della risposta immunitaria, che viene prodotto dai macrofagi attivati e da altre cellule con funzione immunomodulatoria. Questo enzima, catalizzando la conversione dell'aminoacido essenziale triptofano in chinurenine, è in grado di inibire la risposta immunitaria dei linfociti T effettori, bloccandone la proliferazione tramite la deplezione dal microambiente di triptofano, o inducendone l'apoptosi mediante la produzione di metaboliti specifici (Munn *et al.*, 1998).

Infine, è stata osservata una regolazione dell'espressione di COX2, che aumenta significativamente in seguito alla stimolazione con una concentrazione minore di INF γ , per poi diminuire quando le cellule sono trattate con una concentrazione più alta della citochina (Figura 45 C), indicando che probabilmente l'enzima è attivo a basse dosi del trattamento. A differenza dell'isoforma 1 che è costitutiva, COX2 è un enzima inducibile la cui espressione nelle cellule immunitarie e dell'infiammazione aumenta significativamente in seguito alla stimolazione da parte di fattori di crescita, promotori tumorali, citochine e sostanze batteriche. Anche la cicloossigenasi 2, quindi, è nota svolgere un ruolo nell'immunoregolazione, essendo responsabile della sintesi delle prostaglandine che modulano l'attivazione e la proliferazione di diverse cellule immunitarie, tra cui soprattutto i macrofagi e i linfociti (Najar *et al.*, 2012).

Nei campioni non trattati, lo studio di qPCR ha dimostrato che l'espressione di mRNA per CXCL9 non è controllata dalle interazioni cellula-cellula ed è caratteristica della risposta cellulare al trattamento con INF γ . Al contrario, poiché IDO1 risulta essere espresso nei campioni in cui la confluenza raggiunta è pari al 100%, si ipotizza che possa essere essenziale nella regolazione della secrezione di citochine per il mantenimento di specifiche attività cellulari. La presenza di mRNA per COX2 nelle cellule in stato di subconfluenza è in linea con quanto riportato in letteratura sull'espressione basale di tale enzima nelle popolazioni staminali multipotenti.

Le cellule hPBC trattate con $\text{INF}\gamma$ sono state analizzate anche mediante citofluorimetria per l'espressione delle molecole di istocompatibilità (HLA-DR, HLA-DQ e HLA-ABC) e delle molecole co-stimolatorie (CD40, CD80 e CD86). Se in assenza di stimolazione le popolazioni hanno mantenuto il profilo di espressione caratteristico di cellule non immunogeniche durante tutto il periodo di espansione *in vitro* (Figura 46 A), il trattamento pro-infiammatorio ha indotto un aumento di espressione sia delle molecole HLA, sia di quelle co-stimolatorie (Figura 46 B). Questo risultato può essere indicativo non tanto dell'immunoreattività delle cellule hPBC, quanto piuttosto della loro funzione immunoregolatoria indotta dalle condizioni infiammatorie.

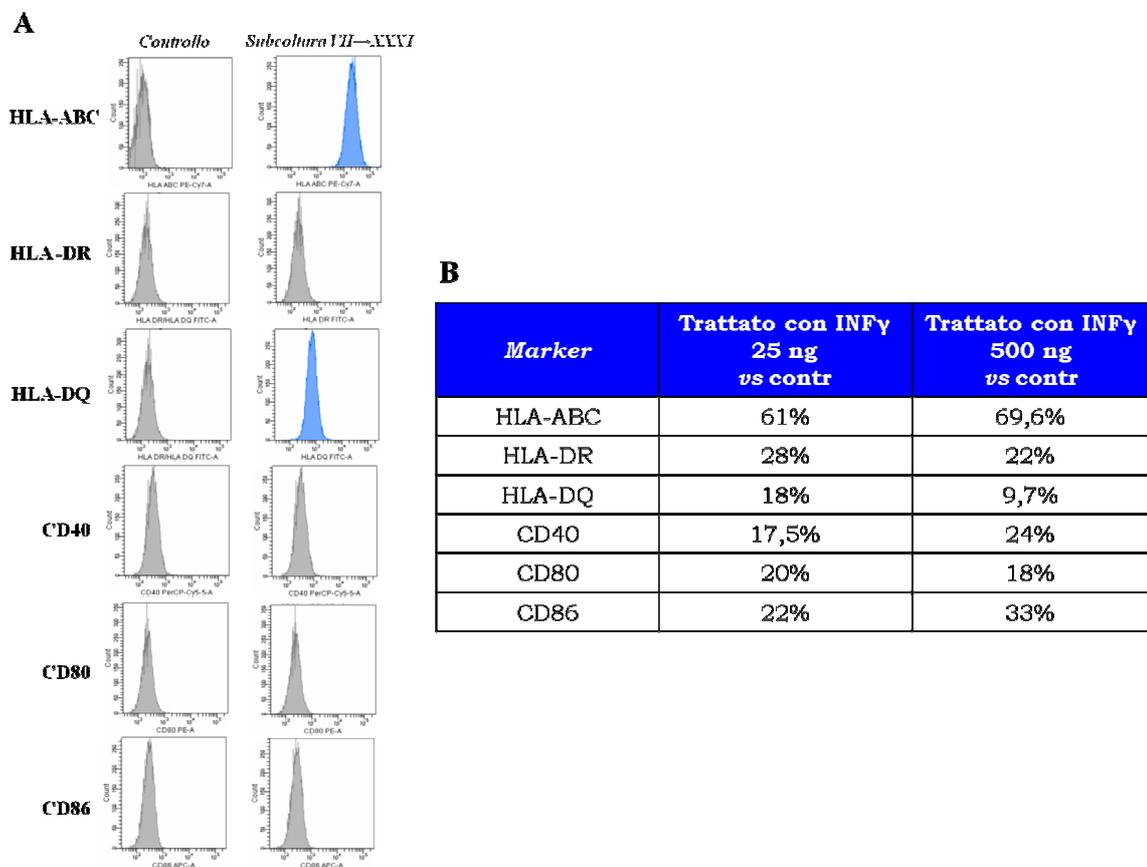


Figura 46. Analisi citofluorimetrica dell'espressione di molecole MHC e co-stimolatorie in hPBC non stimolate (A) e trattate con $\text{INF}\gamma$ (B). In A, gli istogrammi rappresentano l'intensità del segnale di fluorescenza rilevato in seguito alla marcatura con l'anticorpo primario specifico (*Subcoltura VII->XXXI*) in confronto all'intensità del segnale del controllo isotipico (*Controllo*). In B sono riportate le percentuali di aumento dell'intensità di fluorescenza nei campioni trattati rispetto ai controlli non trattati

6.3.2 Co-cultura con linfociti umani

L'analisi citofluorimetrica dei linfociti mantenuti in co-cultura con hPBC ha sottolineato l'azione modulatoria delle popolazioni umane sulle cellule CD4⁺ e CD8⁺. In condizioni non induttive, si distinguono i tre *subset* leucocitari (linfociti, monociti e granulociti), con una percentuale di cellule CD4⁺ pari al 32% e una percentuale di cellule CD8⁺ del 20% (Figura 47 A). Dopo 24 h di co-cultura con hPBC, è stato innanzitutto osservato un impoverimento della frazione monocitaria, con un aumento del 5% delle cellule CD4⁺ e del 4% di quelle CD8⁺ (Figura 47 B). A 5 gg dalla stimolazione, viene perso in coltura anche il *subset* di granulociti, e le cellule CD4⁺ aumentano del 5%. Non sono state osservate variazioni percentuali significative a carico della frazione di cellule CD8⁺ (Figura 47 C).

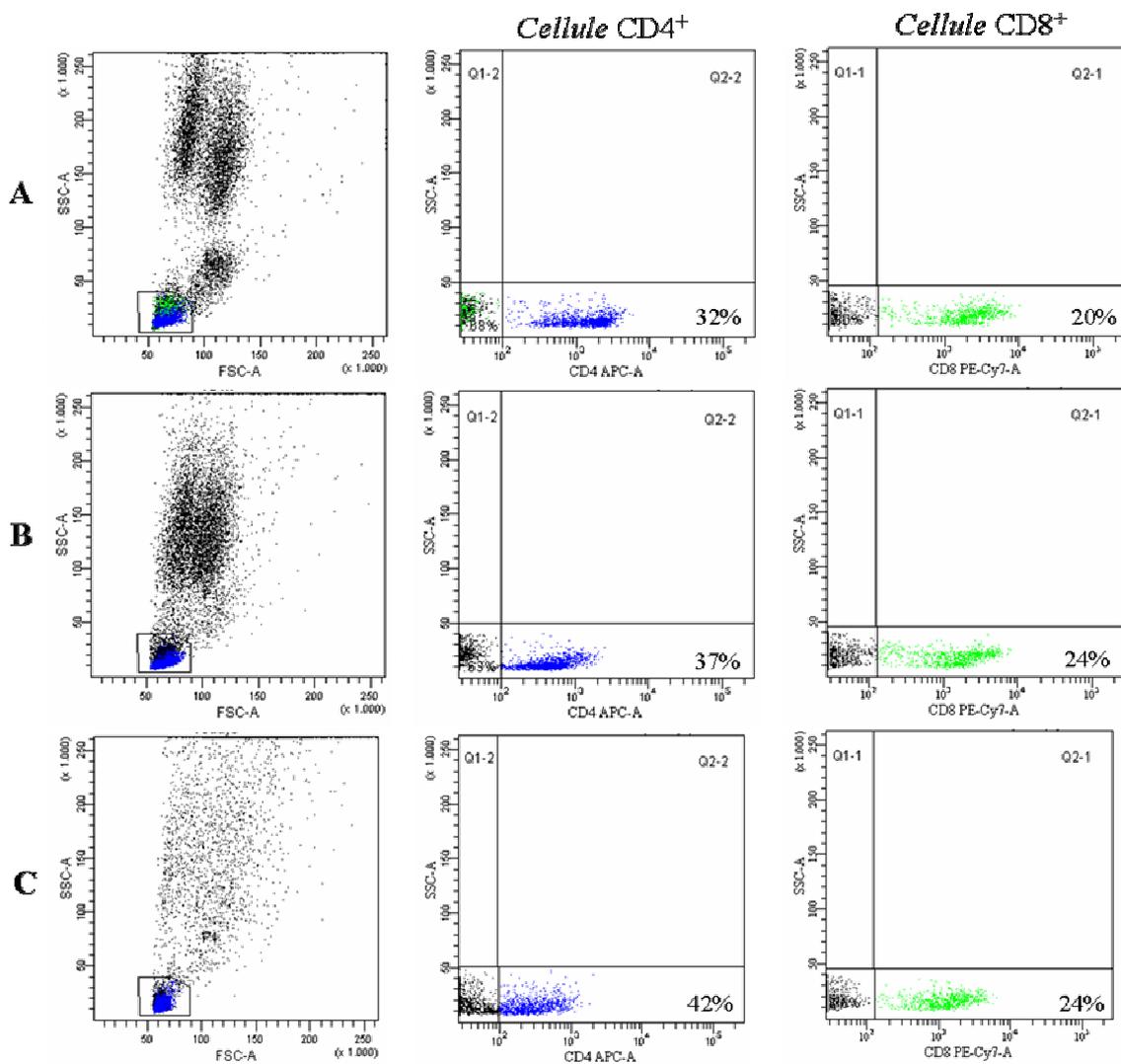


Figura 47. Analisi citofluorimetrica dell'espressione di CD4 e CD8 in linfociti dopo isolamento (controllo, A) e co-cultura con cellule hPBC per (B) 24 h e (C) 5 gg (trattato). I dati sono relativi a tre esperimenti diversi e il valore riportato di (B) e (C) è la percentuale di eventi positivi osservati rispetto ad (A)

La tipizzazione linfocitaria mediante identificazione del FoxP3 ha dimostrato che le cellule hPBC stimolano *in vitro* il differenziamento dei linfociti T_{Reg}. In particolare, la frazione di cellule positive a tale marcatore è aumentata di circa il 15% (Figura 48 B) e del 55% (Figura 48 C) rispettivamente dopo 24 h e 5 gg dalla messa in co-cultura con la popolazione staminale.

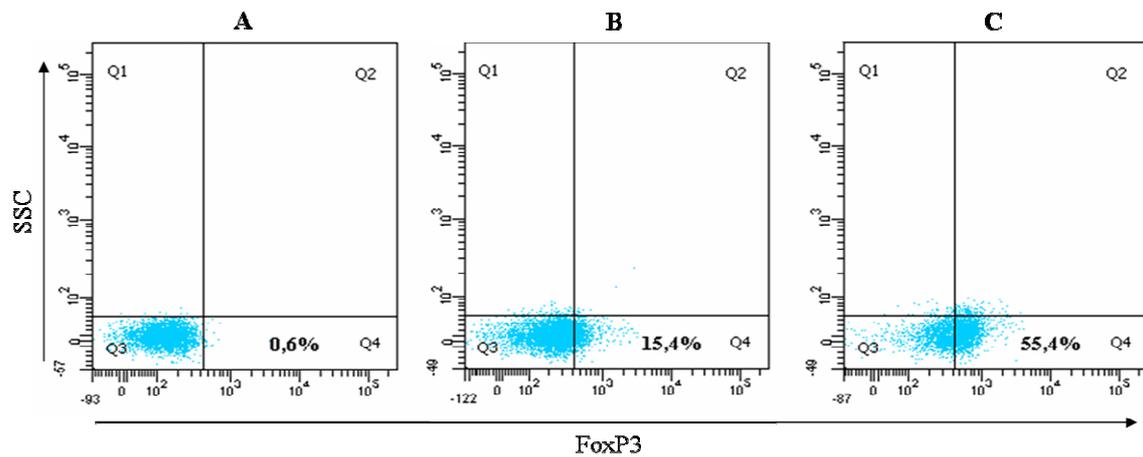


Figura 48. Analisi citofluorimetrica dell'espressione di FoxP3 in linfociti dopo isolamento (controllo, A) e co-cultura con cellule hPBC per (B) 24 h e (C) 5 gg (trattato). I dati sono relativi a tre esperimenti diversi e il valore riportato di (B) e (C) è la percentuale di eventi positivi osservati rispetto ad (A)

DISCUSSIONE

Nell'ultimo decennio, le cellule staminali multipotenti adulte hanno suscitato un grande interesse nella comunità scientifica, sia per le implicazioni che il loro studio comporta sul piano della ricerca di base sia per la potenzialità di impiego terapeutico che le contraddistingue (Pittenger et al., 1999). Attualmente, esse sono utilizzate con successo quale modello per lo studio di *pathway* coinvolti nel differenziamento cellulare, nella rigenerazione tissutale e nella risposta cellulare ai trattamenti farmacologici. Negli USA numerosi *trial* clinici sono stati avviati per la sperimentazione di popolazioni cellulari staminali adulte isolate da tessuto adiposo in soggetti affetti da scompenso cardiaco congestizio, patologia ostruttiva cronica polmonare, paralisi cerebrale o diabete di tipo I e II (<http://www.ascrnetwork.com>). In Italia, le cellule staminali mesenchimali midollari trovano applicazione nella riparazione/ricostruzione di difetti ossei o cartilaginei, nelle pseudoartrosi e difetti di consolidamento, malattie congenite dell'osso, difetti ossei maxillo-facciali e altre patologie dell'apparato muscoloscheletrico che non trovano beneficio in approcci terapeutici chirurgici convenzionali (<http://www.ior.it/RegMed/Web/Home.aspx>). Nel corso dell'ultimo decennio ha trovato un crescente sviluppo la linea di ricerca che definisce il sangue periferico quale possibile fonte elettiva di ASC. In particolare, Kuwana e collaboratori (2003) hanno identificato una popolazione cellulare umana, detta MOMC (*monocyte-derived multipotential cells*), positiva per il CD14, il CD45, il CD34 e responsiva agli stimoli differenziativi in senso osteogenico, miogenico, condrogenico ed adipogenico. Più recentemente, nel sangue periferico porcino sono state identificate cellule mutipotenti dotate di potenziale differenziativo per la linea osteogenica ed adipogenica (Wang e Moutsoglou, 2009) e caratterizzate da positività per i marcatori CD44 (92.83%), CD90 (94.13%), collagene di tipo I (97.49%), vimentina (96.50%) e negatività per il CD14 (4.29%) e l'antigene MHC di classe II (7.26%). Anche nel sangue periferico umano è stata rilevata la presenza di cellule fibroblastoidi multipotenti con capacità clonogenica e caratterizzate da un profilo immunofenotipico simile a quello delle cellule midollari stromali. Tali cellule sono attive nella produzione di collagene e di proteine di matrice extracellulare, esprimono bassi livelli di CD34, mentre sono negative per il CD14, il CD45 e le molecole MHC di classe II (He *et al.*, 2007). Gli studi di caratterizzazione immunofenotipica hanno evidenziato, inoltre, la

positività per i marcatori di staminalità quali CD90, CD73 e CD105 (Tondreau *et al.*, 2005; Kassis *et al.*, 2006).

Secondo l'*International Society for Cellular Therapy* (Dominici *et al.*, 2006), le cellule staminali multipotenti possono essere classificate come tali qualora la procedura di isolamento rispetchi criteri minimi, quali a) la semina della popolazione primaria su piastre non condizionate e in terreno povero di fattori di crescita; b) l'espressione di un definito immunofenotipo contraddistinto da alta espressione per il CD73, CD105, CD90 e negatività per i marcatori di linea ematopoietica, quali il CD34, CD45, CD14, CD79 α e, per concludere, c) plasticità *in vitro* verso almeno tre diverse linee differenziative quale quella adipogenica, osteogenica e condrogenica. Sulla base di quanto definito da Dominici e colleghi, in questo lavoro di tesi è stata standardizzata una procedura sperimentale per l'isolamento di cellule multipotenti circolanti da sangue periferico umano prelevato da soggetti di età pediatrica; in parallelo, campioni di sangue di maialino nano vietnamita (*minipig*) sono stati usati come controllo, per garantire la validità scientifica e la riproducibilità della tecnica. In accordo con le linee guida internazionali di terapia cellulare, le cellule PBC umane e porcine sono state separate mediante centrifugazione su Ficoll e selezionate per adesione alla plastica, in un terreno di coltura preparato con MEM-*alpha*, siero bovino fetale e soluzione antibiotica. Una volta isolate, le popolazioni PBC sono state caratterizzate per il mantenimento della morfologia e della capacità proliferativa *in vitro*, per l'immunofenotipo e per la plasticità differenziativa, con lo scopo di definirne il grado di staminalità e di multipotenza.

Le popolazioni umane e porcine isolate hanno dimostrato caratteristiche morfologiche e proliferative distintive, che si sono mantenute costanti durante l'espansione *in vitro* per più di 31 generazioni. Una significativa prova sperimentale a sostegno della natura staminale delle popolazioni PBC è l'espressione di geni tipicamente associati a caratteristiche di *self-renewal* e pluripotenza. Infatti, sia le pPBC che le hPBC esprimono il NANOG, che regola la pluripotenza e la differenziazione delle cellule staminali embrionali (Guillot *et al.*, 2007), il REX1, marcatore tipico dello stato cellulare indifferenziato (Guillot *et al.*, 2007), il SOX2, fattore di trascrizione coinvolto nel controllo dell'autorinnovamento e della pluripotenza delle ESC (Rizzino, 2009), il Klf4, proteina che previene il differenziamento cellulare attraverso la regolazione dell'espressione di NANOG (Zhang *et al.*, 2010) ed il NOTCH, proteina transmembrana che controlla il differenziamento delle cellule regolando le interazioni intercellulari e che è tipicamente espressa in popolazioni staminali multipotenti (Liu *et al.*, 2010). Il mantenimento del fenotipo indifferenziato delle

cellule embrionali è sotto il controllo del fattore di trascrizione STAT3 (Raz *et al.*, 1999), nella cui via di *signaling* è coinvolto c-Myc, gene che regola il mantenimento del *self-renewal* e della pluripotenza (Cartwright *et al.*, 2005). In questo studio, la presenza di RNA messaggeri per c-Myc e STAT3 ha suggerito un elevato grado di staminalità delle popolazioni PBC.

È noto che l'invecchiamento cellulare è associato alla progressiva riduzione delle estremità telomeriche. Tale meccanismo è regolato da una trascrittasi inversa detta TERT, che mantiene inalterata la lunghezza dei cromosomi aggiungendo, in corrispondenza delle regioni terminali, sequenze ripetute TTAGGG di DNA non codificante. Il ruolo di TERT nella regolazione dello stato indifferenziato delle cellule staminali non è ancora ben noto. L'assenza di RNA messaggero per TERT nelle colture umane e porcine è in linea con quanto riportato da Reza e colleghi (2001) in uno studio di caratterizzazione di una popolazione staminale cordonale. Similmente alle cellule ESC (Guillot *et al.*, 2007) le cellule hPBC sono risultate attive nell'espressione dell'OCT4, gene coinvolto nel mantenimento dello stato di pluripotenza. Nessuna espressione di tale gene è stata osservata nelle cellule pPBC, suggerendo un differente grado di staminalità delle popolazioni umane e porcine.

Alcuni studiosi ipotizzano che le cellule staminali multipotenti presenti nel sangue periferico possano derivare da un processo di mobilitazione dalla nicchia midollare oppure da una nicchia perivascolare in specifiche condizioni fisiologiche o in risposta a trattamenti farmacologici o danni tissutali (Ratajczak *et al.*, 2003).

La caratterizzazione immunofenotipica delle cellule PBC ha suggerito la derivazione da nicchie staminali differenti per le cellule umane e porcine. Le popolazioni isolate da sangue porcino esprimono alti livelli delle proteine di adesione CD44 e CD106, molecole tipicamente espresse nelle cellule staminali mesenchimali midollari (Kolf *et al.*, 2007). Tale evidenza definisce una possibile migrazione delle pPBC dal midollo al sangue, probabilmente in ragione della stimolazione indotta dal trattamento anestesiológico nell'animale donatore al momento del prelievo di sangue. L'espressione del CD34, in associazione con la negatività al CD45, esclude l'appartenenza delle colture pPBC alla linea ematopoietica. Tale risultato è in linea con quanto riportato da altri autori che hanno identificato la presenza del CD34 su popolazioni multipotenti (Minasi *et al.*, 2002; Cossu e Bianco, 2003)

L'assenza di espressione di CD44 nelle hPBC ha portato a considerare per tali cellule la derivazione da una nicchia staminale non midollare. La presenza dei marcatori pericitari

CD13 ed NG2 (Corselli *et al.*, 2010; Traktuev *et al.*, 2008), associata alla positività per i marcatori di staminalità CD73, CD105 e CD34 e alla negatività per CD45, potrebbe essere predittiva dell'origine delle hPBC dalla nicchia perivascolare. Tale popolazione presenta caratteristiche immunofenotipiche comuni alle cellule staminali mesenchimali e ai mesangioblasti multipotenti isolati dalla regione perivascolare.

Durante l'espansione *in vitro* delle popolazioni PBC l'espressione del CD90 e del CD34 tende a diminuire, similmente a quanto riportato in letteratura da altri gruppi di ricerca per cellule staminali isolate da tessuto adiposo (Suga *et al.*, 2009). Si ipotizza che l'espressione di tali marcatori sia regolata dal microambiente staminale e che venga persa nella coltura espansiva *ex vivo*, in ragione di differenti stimoli extracellulari.

Secondo Ratajczak e colleghi (2003), la presenza nel sangue di cellule staminali eprimenti il recettore CXCR4 è il risultato della loro mobilitazione dalla nicchia di origine in seguito all'attrazione chemotattica esercitata dal ligando SDF-1, in condizioni fisiologiche o di infiammazione. Le popolazioni PBC studiate in questo lavoro di tesi sono risultate negative a tale marcatore. Pertanto, la loro capacità migratoria potrebbe essere spiegata attraverso l'espressione di metalloproteinasi 2, per la quale sia le cellule umane che quelle porcine sono risultate positive. La metalloproteinasi 2 (MMP2) è un enzima coinvolto nella degradazione del collagene di tipo IV, componente costitutivo della membrana basale. Recentemente è stato dimostrato che tale enzima, unitamente ad altre metalloproteinasi, è tipicamente espresso nelle popolazioni cellulari staminali mesenchimali che, in seguito ad un danno tessutale, si muovono per chemotassi verso il sito di reclutamento (Ries *et al.*, 2007). In condizioni fisiologiche, l'attraversamento della membrana basale da parte delle cellule MSC è impedito per inibizione delle MMP da parte di specifici inibitori detti TIMP. A seguito di un danno tessutale, il rilascio di citochine infiammatorie quali TGF- β , IL-1 β e TNF- α , determina un aumento di espressione delle metalloproteinasi 2 e quindi la migrazione chemotattica e l'invasione cellulare attraverso la matrice extracellulare. L'ipotesi, dunque, è che le cellule pPBC e hPBC, derivando dal microambiente midollare stromale nel primo caso e dalla regione perivascolare nel secondo, siano stimulate da una condizione traumatica o patologica ad uscire dalla loro nicchia di origine e a migrare attraverso la matrice extracellulare, facendo *homing* nel sito del danno.

Un'ulteriore prova sperimentale della natura staminale delle cellule PBC è la loro plasticità differenziativa: sia la popolazione umana che quella porcina sono risultate responsive agli stimoli adipogenici e osteogenici. Testate per il loro potenziale miogenico e neurogenico, le cellule di origine umana hanno risposto all'induzione specifica esprimendo sia a livello

di mRNA che a livello proteico caratteristici marcatori di linea. Tale plasticità differenziativa, associata alla facile accessibilità della fonte cellulare, definisce un'importante applicazione delle cellule multipotenti circolanti nella terapia delle malattie degenerative del tessuto muscolare e nervoso.

Sebbene presentino mRNA caratteristici di marcatori di linea come la proteina SPARC, le cellule pPBC hanno un limitato potenziale differenziativo condrogenico, come dimostrato dalla mancata produzione di matrice tipica cartilaginea, ricca di mucopolisaccaridi. L'alta responsività alla stimolazione di tipo cardiomiogenico ha definito la potenzialità di impiego di popolazioni simil pPBC in applicazioni dell'ingegneria del tessuto miocardico.

Per l'elevata capacità proliferativa e il potenziale differenziativo, le cellule porcine sono state testate per l'ingegnerizzazione di valvole cardiache acellulari *in vitro*. Gli studi morfologici e biomolecolari condotti sulle popolazioni cellulari seminate sui supporti aortici (VDA) e polmonari (VDP) ne hanno dimostrato l'alta responsività agli stimoli induttivi specifici di ciascun tipo di matrice. L'analisi di espressione mediante RT-PCR ha dimostrato che le cellule pPBC sono attive nell'espressione di mRNA per MMP2, FBN, EMI, TNC, COLI, COLIII e CDM, che sono marcatori tipicamente espressi a livello vascolare e valvolare. Come già descritto in precedenza, la metalloproteinasi responsabile della degradazione della matrice durante il processo migratorio cellulare. La tenascina C è una glicoproteina di matrice extracellulare che, mediando l'interazione delle cellule con altri componenti di matrice, regola l'adesione, il *signaling* e il differenziamento cellulare (http://repository.upenn.edu/ime_papers/29). Tipicamente espressa durante lo sviluppo, si localizza nell'organismo adulto in siti tissutali definiti o in zone in fase attiva di rigenerazione. Sebbene attualmente il ruolo della tenascina C nell'omeostasi del tessuto valvolare non patologico non sia molto chiaro, alcune evidenze sperimentali provano che la sua espressione è regolata dalla biomeccanica tessutale e che di conseguenza essa giochi un ruolo essenziale nella rigenerazione e riparazione delle ferite, localizzandosi nei siti in cui sono attive stress meccanici. L'espressione di mRNA specifici per a) il caldesmone, proteina coinvolta nella contrazione delle cellule muscolari lisce e non muscolari, b) la fibrillina e l'emilina, proteine coinvolte nella produzione di fibre elastiche, ed infine c) il collagene I e il collagene III, espressi nella matrice extracellulare delle valvole cardiache, dimostra la potenzialità delle popolazioni PBC di differenziare in cellule simil interstiziali (VIC) del tessuto valvolare cardiaco. L'assenza di mRNA specifici per i marcatori endoteliali CD31 e VEGF non esclude la possibile evoluzione in senso endoteliale della popolazione PBC dopo specifica stimolazione. E' stato dimostrato che i sostituti tissutali

ingegnerizzati con cellule staminali da midollo o tessuto adiposo hanno un maggior grado di attecchimento in vivo e una più precoce integrazione dell'impianto. Matrici acellulari ottenute da condotti valvolari sono state sperimentate quali sostituti ideali nel recupero di danni a livello della valvola aortica e polmonare. In questo lavoro di tesi, è stata sperimentata la popolazione PBC per l'ingegnerizzazione di matrici valvolari aortiche (VDA) e polmonari (VDP), decellularizzate mediante il metodo TRICOL (Spina *et al.*, 2003). Come precedentemente dimostrato e pubblicato, tale trattamento decellularizzante, rimuovendo la componente cellulare e mantenendo inalterata la composizione e le proprietà meccaniche della matrice extracellulare (Spina *et al.*, 2003), consente di ottenere sostituti valvolari adatti a sostenere la crescita cellulare. E' noto che le popolazioni cellulari presenti nelle valvole cardiache aortica e polmonare comprendono cellule di rivestimento (VEC) e cellule interstiziali (VIC). Nel complesso, tali cellule rispondono allo stress di taglio indotto dal flusso sanguigno e alla forza tensiva attiva nella massa valvolare acquisendo una specifica morfologia ed un determinato orientamento. Come le cellule endoteliali presenti in altri siti dell'apparato circolatorio, le cellule VEC formano una superficie non trombogena all'interfaccia sangue-tessuto e regolano le reazioni immunitarie ed infiammatorie. Tuttavia, le cellule endoteliali isolate da diverse sorgenti vascolari e valvolari mostrano differenze nell'espressione genica e nella morfologia. Le cellule endoteliali vascolari presentano in vivo una forma allungata e si distribuiscono in modo che l'asse lungo sia parallelo alla direzione del flusso (Butcher e Nerem, 2007). Nei siti di biforcazione o nelle profonde curvature dell'albero vasale, le cellule endoteliali appaiono più larghe e più arrotondate. In vitro è stato dimostrato che la forma delle cellule endoteliali di siti arteriosi e venosi è dipendente dalla tipologia di stress di taglio imposto, e sotto l'azione di uno stress di taglio laminare, pulsato o stazionario, le cellule endoteliali risultano allungate ed orientate. In risposta allo stress meccanico, sulla superficie ventricolare le cellule endoteliali valvolari si allineano perpendicolarmente al flusso e presentano uno specifico profilo di espressione genica. Sul lato arteriale, le cellule endoteliali, sottoposte ad un minor carico pressorio, rimangono di forma cuboidale (<http://www.mate.tue.nl/mate/showabstract.php/5300>). Attualmente, non ci sono dati in vitro sulla risposta morfologica delle cellule endoteliali valvolari alla forza tensiva e alla composizione del substrato.

Le popolazioni PBC, coltivate sulle matrici VDA e VDP in condizioni statiche, hanno precocemente colonizzato la superficie di semina, distribuendosi in modo orientato ed acquisendo una morfologia allungata. Dopo 28 giorni dalla semina, le cellule sulla matrici

VDP hanno modificato la loro morfologia da allungata a poliedrica, suggerendo che la morfologia cellulare endoteliale è dipendente non solo dal flusso sanguigno ma anche dalla struttura peculiare delle matrici valvolari. L'interazione con la matrice VDA e VDP ha determinato una stimolazione nelle popolazioni PBC di marcatori tipicamente espressi nelle cellule VEC e VIC. Le cellule interstiziali rappresentano il tipo cellulare maggiormente espresso nel tessuto valvolare aortico e polmonare e sono attive nella produzione della ECM, enzimi di degradazione di matrice quali MMP e loro inibitori (TIMP). Comprendono una popolazione dinamica di cellule residenti quali fibroblasti, miofibroblasti e cellule muscolari lisce. L'identificazione di mRNA per MMP2, MMP13, TNC, COLIII, COLIV nei campioni allestiti utilizzando le matrici VDA porta a considerare che la matrice esercita uno stimolo per il differenziamento delle cellule PBC verso un fenotipo simil VEC e VIC, dal momento che le cellule endoteliali valvolari sono attive nell'espressione di MMP e di collagene di tipo IV (Butcher e Nerem, 2007) mentre le cellule interstiziali presenti nello strato ventricolare sono attive nella produzione di tenascina C e di collagene di tipo III (http://repository.upenn.edu/ime_papers/29). Diversamente, la matrice VDP, favorendo l'interazione delle cellule PBC con le regioni profonde della struttura perché probabilmente di natura più lassa rispetto alla VDA, stimola le cellule ad acquisire un fenotipo essenzialmente interstiziale, come suggerito dalla presenza di mRNA per FBN, EMI, COLI, COLIII, TNC e CDM. Le cellule VIC sono distribuite in tutto lo spessore della valvola e contribuiscono, nella forma di fibroblasti e miofibroblasti, alla produzione della componente fibrosa (fibre elastiche, collagene di tipo I e III) e, nella forma di cellule muscolari lisce e miofibroblasti, alla contrazione valvolare (espressione di caldesmone). Poiché l'analisi istologica con colorante nucleare DAPI non ha evidenziato una colonizzazione a tutto spessore della matrice da parte delle cellule PBC, si ipotizza che la diversa composizione strutturale delle matrici VDA e VDP a livello dello strato ventricolare sia di per sé il principale fattore coinvolto nel differenziamento in cellule simil interstiziali valvolari di tipo contrattile.

Molti studi sperimentali *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che l'uso di cellule staminali per la realizzazione di protesi biologiche ingegnerizzate è un valido approccio terapeutico per la ricostruzione di tessuti quali l'osso e la cartilagine. Accanto alle applicazioni di ingegneria tissutale, sta suscitando sempre maggiore interesse una strategia rigenerativa che si basa sulla terapia con sole cellule staminali per il recupero di danni tissutali di varia origine. Questa terapia staminale è attualmente limitata dalla mancanza di una fonte adatta di cellule da impiegare per il processo riparativo. Se da un lato le MSC isolate da midollo

osseo hanno dimostrato una certa efficacia in applicazioni di terapia cellulare, il loro utilizzo è limitato da una serie di problemi, primo tra tutti l'invasività del prelievo degli aspirati midollari, che causa non poche sofferenze al donatore. In questo lavoro di tesi, il sangue periferico è proposto come una fonte ideale di cellule per la terapia staminale, in quanto è accessibile ed inesauribile durante il corso della vita, non richiede procedure estrattive invasive, consente l'ottenimento di cellule per uso autologo e non richiede la crioconservazione del materiale di estrazione, perché l'ottenimento del trapianto cellulare è possibile in coincidenza della necessità del paziente. La possibilità di impiegare cellule isolate da sangue periferico per la rigenerazione tessutale è strettamente legata alla standardizzazione di una procedura di isolamento di tali cellule e alla dettagliata caratterizzazione del loro grado di staminalità e multipotenza. Una volta ottenute le prove sperimentali dello stato indifferenziato, della capacità multidifferenziativa e della stabilità cariotipica delle popolazioni hPBC isolate, la prospettiva di impiegarle per la terapia cellulare di disfunzioni tessutali ha reso necessario studiarne le proprietà immunomodulatorie. È noto infatti che le cellule staminali esplicano il loro potenziale rigenerativo non tanto in modo diretto, quanto indirettamente, attraverso la secrezione paracrina di fattori solubili che rendono il microambiente responsivo al processo riparativo (Bifari *et al.*, 2010). Questo effetto indiretto è stato osservato in seguito all'impianto *in vivo* di cellule staminali marcate con molecole fluoresecenti che ne hanno permesso il *tracking* nell'animale trattato. Ad esempio, studi sulla rigenerazione del miocardio infartuato hanno dimostrato che dopo l'iniezione di MSC, le cellule localizzate nel sito del danno portavano ad un significativo miglioramento funzionale del tessuto ischemico promuovendo la neovascolarizzazione, l'inibizione dei processi apoptotici e la regolazione delle reazioni infiammatorie, l'*homing* di cellule con funzioni terapeutiche e la proliferazione e il differenziamento dei componenti cellulari endogeni (Burdon *et al.*, 2011).

Inoltre, la modulazione ad azione paracrina delle cellule MSC viene sfruttata per contrastare la sindrome detta *Graft Versus Host Disease* (GVHD), una complicanza medica che può manifestarsi in seguito ad un trapianto allogenico di tessuti o organi, quando le cellule immunitarie del donatore diventano reattive nei confronti del sistema immunitario del ricevente immunosoppresso. Diversi studi hanno dimostrato che la somministrazione di MSC, anche stimulate dal trattamento con INF γ , è in grado di attenuare a livelli significativi lo sviluppo di GVHD aumentando la tolleranza immunologica al trapianto (Polchert *et al.*, 2008).

In condizioni che simulano uno stato infiammatorio (stimolazione con $\text{INF}\gamma$), le popolazioni hPBC hanno dimostrato la capacità di modulare l'intervento degli effettori immunitari sia esprimendo molecole fondamentali per l'immunoregolazione, sia esponendo in membrana degli antigeni specifici per l'interazione con cellule ad attività immunosoppressiva. In particolare, l'*up*regolazione di IDO1 e COX2 evidenzia l'azione inibitoria che le hPBC possono svolgere nei confronti delle cellule effettrici del sistema immunitario, quali i linfociti T e i macrofagi, rispettivamente (Semedo *et al.*, 2011). La regolazione del messaggero di CXCL9 in seguito al trattamento con $\text{INF}\gamma$ dimostra la possibile attività di reclutamento dei linfociti T regolatori che le cellule hPBC potrebbero svolgere *in vivo*. I T_{Reg} sono responsabili di una serie di meccanismi di regolazione finalizzati al mantenimento dell'omeostasi del sistema immunitario, alla prevenzione delle malattie autoimmuni come il diabete di tipo I e alla moderazione degli stati infiammatori (Vignali *et al.*, 2008). Richiamati nel sito dell'infiammazione per via chemotattica attraverso la stimolazione dell'asse CXCL9/CXCR3, contribuiscono al controllo del processo infiammatorio (Saiman e Friedman, 2012). L'aumento di espressione delle molecole di istocompatibilità HLA-ABC, HLA-DR e HLA-DQ e della molecola co-stimolatoria CD40 dopo il trattamento delle popolazioni hPBC con $\text{INF}\gamma$ conferma quanto riportato in letteratura sugli effetti della stimolazione pro-infiammatoria di cellule MSC (Deuse *et al.*, 2011; Najar *et al.*, 2012). L'espressione dei fattori CD80 e CD86, associata all'*up*regolazione di CXCL9, può essere interpretata come un'evidenza del ruolo modulatore delle hPBC nei confronti dei linfociti T_{Reg} . È noto, infatti, che una cellula immunomodulatrice può intervenire anche direttamente nel reclutamento di questa classe di linfociti, esponendo in membrana i ligandi CD80 e CD86 per l'interazione con il recettore linfocitario CTLA4. Questo legame stimola la produzione di IDO1 da parte della cellula stessa, che in questo modo inibisce la reazione immunitaria scatenata dalla presenza di una condizione infiammatoria (Vignali *et al.*, 2008).

L'attività immunomodulatrice delle cellule staminali si esplica in una specifica regolazione della proliferazione e del differenziamento delle cellule della risposta immunitaria, quali *Natural Killer*, cellule dendritiche, linfociti B e linfociti T (Rasmusson, 2006). In particolare, le cellule staminali multipotenti hanno dimostrato *in vitro* e *in vivo* di controllare la proliferazione dei linfociti T *helper* e *citotossici* attivati inducendone un blocco in fase G_0/G_1 del ciclo cellulare. Inoltre, esse estendono la sopravvivenza dei linfociti T non stimolati e, coltivate *in vitro* con le cellule mononucleate isolate da sangue, inducono l'espansione di linfociti $T_{\text{Reg}} \text{CD4}^+/\text{CD25}^{\text{high}}/\text{FoxP3}^+$ (Chen *et al.*, 2011). In linea

con quanto riportato in letteratura, le cellule hPBC hanno dimostrato un elevato potenziale immunomodulatorio. In co-coltura con leucociti umani, hanno preservato la vitalità delle popolazioni linfocitarie e stimolato la proliferazione delle cellule CD4⁺ e CD8⁺. La tipizzazione linfocitaria mediante identificazione del FoxP3 ha verificato l'attività stimolatoria delle cellule hPBC nei confronti dei linfociti T immunosoppressori.

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi, il sangue periferico viene proposto come una fonte autologa e facilmente accessibile di cellule multipotenti che presentano caratteristiche ideali per la terapia staminale di disfunzioni tessutali congenite o acquisite. Lo studio di caratterizzazione delle popolazioni PBC isolate da sangue umano e porcino ne ha, infatti, evidenziato delle caratteristiche peculiari di crescita e plasticità che ne consentirebbero l'impiego in applicazioni di medicina rigenerativa.

Le analisi morfologiche e biomolecolari condotte sulle cellule pPBC usate per l'ingegnerizzazione di valvole cardiache ne hanno dimostrato la risposta specifica al *commitment* cellulare indotto dalla matrice di supporto, suggerendo la potenzialità di impiego di cellule con tali caratteristiche per la preparazione di sostituti tessutali valvolari.

Lo studio *in vitro* delle proprietà immunomodulatorie delle popolazioni umane ne ha messo in luce la capacità di regolare la proliferazione e l'attivazione delle cellule immunitarie in condizioni infiammatorie, gettando le basi per il futuro allestimento di sperimentazioni *in vivo* in cui le cellule hPBC saranno impiantate in modelli animali patologici per la terapia staminale di disfunzioni muscolari, neuronali e cardiache.

BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005;105(4):1815-22.
- Behairy Y, Jasty M. Bone grafts and bone substitutes in hip and knee surgery. *Orthop Clin North Am*, 1999; 30(4): 661-71.
- Bianco P, Robey PG. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest*, 2000; 105: 1663–1668.
- Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*, 2001; 414: 118–121.
- Bifari F, Pacelli L, Krampera M. Immunological properties of embryonic and adult stem cells. *World J Stem Cells*, 2010; 2(3): 50–60.
- Björk VO. The history of the Björk-Shiley tilting disc valve. *Med Instrum*, 1977; 11: 80-81.
- Bonow RO, Carabello B, de Leon AC, Edmunds LH Jr, Fedderly BJ, Freed MD, Gaasch WH, McKay CR, Nishimura RA, O’Gara PT, O’Rourke RA, Rahimtoola SH, Ritchie JL, Cheitlin MD, Eagle KA, Gardner TJ, Garson A Jr, Gibbons RJ, Russell RO, Ryan TJ, Smith SC Jr. ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease. Executive Summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients With Valvular Heart Disease). *J Heart Valve Dis*, 1998; 7(6): 672-707.
- Bourke ME, Healey JS. Pacemakers, recent directions and developments. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2002; 15(6): 681-6.
- Braunwald E. Valvular heart disease. In Braunwald E. ‘Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine’ WB Saunders Co, Philadelphia, 1997; 1007-1076.
- Brindley, D.A., Reeve, B.C., Sahlman, W.A., Bonfiglio, G.A., Davie N.L., Culme-Seymour E.J. and Mason C., (2011). The impact of market volatility on the Cell Therapy Industry. *Cell Stem Cell*, 2011; 9(5), 397-401.
- Brody S, Pandit A. Approaches to heart valve tissue engineering scaffold design. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007; 83: 16-43.
- Burdon TJ, Paul A, Noiseux N, Prakash S, Shum-Tim D. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. *Bone Marrow Res*, 2011; 2011: 207326.
- Butcher JT, Nerem RM. Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology. *Phil. Trans. R. Soc*, 2007; 1445-1457.

- Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, 2005; 132(5): 885-96.
- Chen PM, Yen ML, Liu KJ, Sytwu HK, Yen BL. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 2011; 18: 18-49.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 2006; 107(1): 367-72.
- Corselli M, Chen CW, Crisan M, Lazzari L, Péault B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010; 30(6): 1104-9.
- Cossu G, Bianco P. Mesoangioblasts-vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr Opin Genet Dev*, 2003; 13: 537-542.
- Dalkowski A, Schuppan D, Orfanos CE, Zouboulis CC. Increased expression of tenascin C by keloids in vivo and in vitro. *Br J Dermatol*, 1999 Jul; 141(1): 50-6.
- Dare AJ, Veinot JP, Edwards WD, Tazelaar HD, Schaff HV. New observations on the etiology aortic valve disease: a surgical pathologic study of 236 cases from 1990. *Hum Pathol*, 1993; 24: 1330-1338.
- Deuse T, Stubbendorff M, Tang-Quan K, Phillips N, Kay MA, Eiermann T, Phan TT, Volk HD, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 2011; 20(5): 655-67.
- Diwan SB, Stevens LC. Development of teratomas from ectoderm of mouse egg cylinders. *J Natl Cancer Inst*, 1976; 57: 937-942.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006; 8(4): 315-7.
- Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 2001; 414(6859): 92-7.
- Dvorin EL, Wylie-Sears J, Kaushal S, Martin DP, Bischoff J. Quantitative evaluation of endothelial progenitors and cardiac valve endothelial cells: proliferation and differentiation on poly-glycolic acid/poly-4-hydroxybutyrate scaffold in response to vascular endothelial growth factor and transforming growth factor beta1. *Tissue Eng*, 2003; 9: 487-93.
- Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and

- applications. *Biomaterials* 2003; 24: 4337–4351.
- Emery RW, Mettler E, Nicoloff DM. A new cardiac prosthesis. The St. Jude Medical cardiac valve: in vivo results. *Circulation*, 1979; 60: 48-54.
- Estes BT, Gimble JM, Guilak F. Mechanical signals as regulators of stem cell fate. *Curr Top Dev Biol*, 2004; 60: 91-126.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981; 292: 154-156.
- Favaro G. Ricerche embriologiche ed anatomiche intorno al cuore dei vertebrati con particolare riguardo all'endocardio e alle formazioni endocardiche, 1914; Padua, Fratelli Ducher.
- Fayet C, Bendeck MP, Gotlieb AI. Cardiac valve interstitial cells secrete fibronectin and form fibrillar adhesions in response to injury, *Cardiovascular Pathology*, 2003; 16: 203-211.
- Filová E, Straka F, Mirejovsk T, Masin J, Bacakoval L. Center for Cardiovascular Research, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic, Tissue engineered heart valves, 2009.
- Fleg JL. Alterations in cardiovascular structure and function with advancing age. *Am J Cardiol*, 1986; 57: 33C-44C.
- Friedenstein AJ. Marrow stromal fibroblasts. *Calcif Tissue Int*, 1995; 56(suppl 1): S17.
- Friedenstein AJ. Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models. *Haematol Blood Transfus*, 1989; 32:159 –167.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 1970; 3: 393-403.
- Friedenstein AJ, Goskaja UF, Julagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976; 4: 267-274.
- Furth ME, Atala A, Van Dyke ME. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*, 2007; 28: 5068–5073.
- Giordano R. Iter di un protocollo clinico sperimentale di terapia cellulare somatica. *Giornale italiano di Farmacia clinica*, 21(3); 147-148.
- Goglia G. Anatomia umana-Citologia-Istologia-Embriologia-Organismi-Sistemi-Apparati. Piccin nuova Libreria, 1999, 8:331.

- Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, Van Munsteren CJ, Gittenbergerde, Groot AC, DeRuiter M.C. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2005; 27: 566-571.
- Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H, Fisk NM. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells*, 2007; 25(3): 646-54.
- He Q, Wan C, Li G. Concise Review: Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Blood. *Stem Cells*, 2007; 25:69–77.
- Hipp J, Atala A. Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev*, 2008; 4:3–11.
- Hoerstrup SP, Kadner A, Breymann C, Maurus CF, Guenter CI, Sodian R, Visjager JF, Zund G, Turina MI. Living, autologous pulmonary artery conduits tissue engineered from human umbilical cord cells. *Ann Thorac Surg*, 2002a; 74: 46–52.
- Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, Trojan A, Eid K, Tracy J, Sodian R, Visjager JF, Kolb SA, Grunenfelder J, Zund G, Turina MI. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation*, 2002b; 106: I-143–50.
- Hufnagel CA, Villegas PD, Nahas H. Experiences with new types of aortic valvular prostheses. *Ann Surg*, 1958; 147: 636-644.
- Huss R, Lange C, Weissinger EM, Kolb HJ, Thalmeier K. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells*, 2000; 18(4): 252-60.
- Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*, 2006; 3(10): 589-601.
- Iop L, Renier V, Naso F, Piccoli M, Bonetti A, Gandaglia A et al. The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds. *Biomaterials*, 2009; 30: 4104-4116.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. *Experimental Hematology*, 2002; 30, 896–904.
- Kaarteenaho-Wiik R, Lakari E, Soini Y, Pöllänen R, Kinnula VL, Pääkkö P. Tenascin expression and distribution in pleural inflammatory and fibrotic diseases. *J Histochem Cytochem*, 2000; 48(9): 1257-68.
- Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, Gorodetsky R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant*, 2006; 37: 967-976.

- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 2006; 24: 1294-1301.
- Ketchedjian A, Jones AL, Krueger P, Robinson E, Crouch K, Wolfenbarger L Jr, Hopkins R. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. *Ann Thorac Surg*, 2005; 79: 888-896.
- Kim KM, Valigorsky JM, Mergner WJ, Jones RT, Pendergrass RF, Trump BF. Aging changes in the human aortic valve in relation to dystrophic calcification. *Hum Pathol*, 1976; 7(1): 47-60.
- Knight RL, Wilcox HE, Korossis SA, Fisher J, Ingham E. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves. *Proc Inst Mech Eng H*, 2008; 222: 129-143.
- Knoblich JA. Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001; 2(1): 11-20.
- Kolf CM, Cho E, Tuan. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Research e Therapy*, 2007; 9: 204.
- Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*, 2003; 349(6): 570-82.
- Kronsteiner B, Peterbauer-Scherb A, Grillari-Voglauer R, Redl H, Gabriel C, van Griensven M, Wolbank S. Human mesenchymal stem cells and renal tubular epithelial cells differentially influence monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation. *Cell Immunol*, 2011; 267(1): 30-8.
- Kuçi S, Kuçi Z, Latifi-Pupovci H, Niethammer D, Handgretinger R, Schumm M, Bruchelt G, Bader P, Klingebiel T. Adult stem cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2009 May;4(2):107-17.
- Kucia M, Dawn B, Hunt G, Guo Y, Wysoczynski M, Majka M, Ratajczak J, Rezzoug F, Ildstad ST, Bolli R, Ratajczak MZ. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res*, 2004; 95(12): 1191-9.
- Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Bone marrow as a source of circulating CXCR4+ tissue-committed stem cells. *Biol Cell*, 2005; 97(2): 133-46.
- Kucia MJ, Wysoczynski M, Wu W, Zuba-Surma EK, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells*, 2008; 26(8): 2083-92.
- Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating

- skeletal stem cells. *J Cell Biol*, 2001; 153(5): 1133-40.
- La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, Di Stefano A, Giannuzzi P, Marasà L, Cappello F, Zummo G, Farina F. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol*. 2009; 131(2): 267-82.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*, 1993; 260(5110): 920-6.
- Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005; 11: 321-334.
- Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AF. Sensitivity and accuracy of real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal. Biochem.*, 2002; 307: 63-69.
- Li Y, Qu YH, Wu YF, Wang XP, Wei J, Huang WG, Zhou DH, Fang J, Huang K, Huang SL. Bone marrow mesenchymal stem cells reduce the antitumor activity of cytokine-induced killer/natural killer cells in K562 NOD/SCID mice. *Ann Hematol*, 2011; 90(8): 873-85.
- Lim JH, Kim JS, Yoon IH, Shin JS, Nam HY, Yang SH, Kim SJ, Park CG. Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node. *J Immunol*, 2010; 185(7): 4022-9.
- Liu J, Sato C, Cerletti M, Wagers A. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol*, 2010; 92: 367-409.
- Lloyd AW, Faragher RG, Denyer SP. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials*, 2001; 22(8): 769-85.
- Loges S, Fehse B, Brockmann MA et al. Identification of the adult human hemangioblast. *Stem Cells Dev*, 2004; 13: 229–242.
- Mackie EJ, Halfter W, Liverani D. Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol*, 1988; 107(6 Pt 2): 2757-67.
- Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, Costa H, Cañones C, Raiden S, Vermeulen M, Geffner JR. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*, 2010; 5(2): e9252.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981; 78: 7634-7638.

- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*, 1999; 18: 4261-4269.
- Maximow AA. Culture of blood leucocytes: from lymphocyte and monocyte to connective tissues. *Arch Exp Zellforsch*, 1928; 5: 169 –268.
- McBrearty, B. A., L. D. Clark, X-M, Zhang, E. P. Blankenhorn, and E. Heber-Katz. Genetic analysis of a mammalian woundhealing trait. *Proc Natl Aca. Sci USA*, 1998; 95:11792–11797.
- Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng*. 2006; 34(12): 1799-819.
- Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, Caprioli A, Sirabella D, Baiocchi M, De Maria R, Boratto R, Jaffredo T, Broccoli V, Bianco P, Cossu G. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*, 2002; 129(11): 2773-83.
- Moffatt-Bruce SD, Jamieson WR. Long-term performance of prostheses in mitral valve replacement. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2004; 45(5): 427-47.
- Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem*, 2001; 82: 583-590.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 1998 ; 281(5380): 1191-3.
- Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem Cell Rev*, 2012; 8(4): 1188-98.
- Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 2007; 110(10): 3499-506.
- Neuenschwander S, Hoerstrup SP. Heart valve tissue engineering. *Transpl Immunol*, 2004; 12: 359-365.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 1998; 95: 379-391.
- Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE. Number of osteoprogenitor

- cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab*, 1999; 17: 171-177.
- Olson LJ, Subramanian R, Edwards WD. Surgical pathology of pure aortic insufficiency: a study of 225 cases. *Majo Clin Proc*, 1984; 59: 835-841.
- Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*, 2003; 112(4): 535-48.
- Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*, 2002; 3(7): 687-94.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284(5411): 143-7.
- Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater*, 2009; 8: 457-470.
- Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, Genrich K, Mehrotra S, Setty S, Smith B, Bartholomew A. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*, 2008; 38(6): 1745-55.
- Prell K, Zink N, Wolf E. Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anat Histol Embryol*, 2002; 31(3): 169-86.
- Presnell SC, Petersen B, Heidarman M. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2002; 13, 369-376.
- Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 2006; 312(12): 2169-79.
- Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia*, 2004; 18: 29-40.
- Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M, Drukala J, Pietrzakowski Z, Peiper S, Janowska-Wieczorek A. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells*, 2003; 21(3): 363-71.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Wan W, Ratajczak J, Wojakowski W, Kucia M. Hunt for pluripotent stem cell -- regenerative medicine search for almighty

- cell. *J Autoimmun*, 2008; 30(3): 151-62.
- Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, d'Eustachio P, Levy DE. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96(6): 2846-51.
- Reza HM, Ng BY, Phan TT, Tan DT, Beuerman RW, Ang LP. Characterization of a novel umbilical cord lining cell with CD227 positivity and unique pattern of P63 expression and function. *Stem Cell Rev*, 2011; 7(3): 624-38.
- Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, Weigel G. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004; 127: 399-405.
- Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP2, MT1-MMP, and TIMP2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*, 2007; 109(9): 4055-63.
- Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2009; 1(2): 228-36.
- Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*, 1993; 81: 1679-1690.
- Saiman Y, Friedman SL. The role of chemokines in acute liver injury. *Front Physiol*, 2012; 3: 213.
- Schmidt D, Hoerstrup SP. Tissue engineered heart valves based on human cells. *Swiss Med Wkly*, 2007; 137 Suppl 155: 80S-85S.
- Schofield R. The relationship between the spleen colonyforming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 1978; 4: 7-25.
- Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):212-22.
- Semedo P, Burgos-Silva M, Donizetti-Oliveira C, Olsen Saraiva Camara N. How do Mesenchymal Stem Cells Repair?, *Stem Cells in Clinic and Research*, Dr. Ali Gholamrezanezhad (Ed.), 2011; ISBN: 978-953-307-797-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/stem-cells-in-clinicand-research/how-do-mesenchymal-stem-cells-repairwww>.
- Seta N, Kuwana M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J Med*, 2007; 56(2): 41-7.

- Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*, 2003; 18(4): 696-704.
- Shieh SJ, Vacanti JP. State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery*, 2005; 137(1):1-7.
- Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve synergraft in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003; 23: 1002-1006.
- Sng J, Lufkin T. Emerging stem cell therapies: treatment, safety, and biology. *Stem Cells Int*. 2012; 2012: 521343.
- Solter D, Skreb N, Damjanov I. Extrauterine growth of mouse egg cylinders results in malignant teratoma. *Nature*, 1970; 227: 503-504.
- Spina M, Ortolani F, El Messlemani A, Gandaglia A, Bujan J, Garcia- Honduvilla N et al. Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart-valve bioprostheses: extracellular matrix structure, prevention from calcification, and cell repopulation features. *J Biomed Mater Res A*, 2003; 67: 1338-1350.
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*, 2001; 414, 98–104.
- Stein D, Kloster FE. Valvular heart disease in osteogenesis imperfecta. *Am Heart J*, 1977; 94: 637-641.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 2003; 33(6): 919-26.
- Stevens A, Lowe J. *Human Histology, Second Edition*. Casa Editrice Ambrosiana, 1997, 147-160.
- Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Yoshimura K. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 2009; 18(8): 1201-10.
- Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*, 2007; 128: 747-762.
- Swanson WM, Clark RE. Dimensions and geometric relationships of the human aortic valves as a function of pressure. *Circ Res*, 1974, 25: 871-8
- Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003; 35(2): 113-8.

- Tabata Y. Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng*, 2003; 9 Suppl 1: S5-15.
- Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, Mortier C, Bron D, Lagneaux L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells*, 2005; 23:1105–1112.
- Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res*, 2008; 102(1): 77-85.
- Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*, 2003; 5(1): 2-45.
- Vesely I. Heart valve tissue engineering. *Circ Res*, 2005; 97: 743-755.
- Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 2008; 8(7): 523-32.
- Waller BF, Zoltick JM, Rosen JH et al. Severe aortic regurgitation from systemic hypertension (without aortic dissection) requiring aortic valve replacement: analysis of four patients. *Am J Cardiol*, 1982; 49: 473-477.
- Wan C, He Q, Li G. Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical sized bone defect model. *J Orthop Res*, 2006; 24: 610–618.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 2004; 22: 1330–7.
- Wang X, Moutsoglou D. Osteogenic and adipogenic differentiation potential of an immortalized fibroblast-like cell line derived from porcine peripheral blood. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2009; 45(10): 584-91.
- Wassenaar C, Bax WA, Suylen RJ, Vuzeski VD, Bos E. Effects of cryopreservation on contractile properties of porcine isolated aortic valve leaflets and aortic wall. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1997; 113: 165-72.
- Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: Stem cells and their niches. *Science*, 2000; 287:1427–1430.
- Weber B, Emmert MY, Hoerstrup SP. Stem cells for heart valve regeneration. *Swiss Med Wkly*, 2012; 142:w13622.

- Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Valve Dis*, 2005; 14: 228-236
- Williams DF. To engineer is to create: the link between engineering and regeneration. *Trends Biotechnol*, 2006; 24(1): 4-8.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 1988; 336(6200): 684-7.
- Wong VW, Rustad KC, Longaker MT, Gurtner GC. Tissue engineering in plastic surgery: a review. *Plast Reconstr Surg*, 2010; 126(3): 858-68.
- Wu GD, Nolta JA, Jin YS et al. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation*, 2003; 75: 679–685.
- Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, Lee JE, Kim YJ, Yang SK, Jung HL, Sung KW, Kim CW, Koo HH. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol*, 2009; 259(2): 150-6.
- Zhang P, Andrianakos R, Yang Y, Liu C, Lu W. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J Biol Chem*, 2010; 285(12): 9180-9.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002; 13(12): 4279-95.
- Zünd G, Hoerstrup SP, Schoeberlein A, Lachat M, Uhlschmid G, Vogt PR, Turina M. Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery: Seeding of human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1998; 13(2): 160-4.

Siti internet consultati:

<http://www.ascrnetwork.com>

<http://www.ior.it/RegMed/Web/Home.aspx>

http://repository.upenn.edu/ime_papers/29

<http://www.mate.tue.nl/mate/showabstract.php/5300>