

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

Scuola di Dottorato di Ricerca in
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
Indirizzo: SCIENZE EPATOLOGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

CICLO XXIV

**Estrazione di cellule staminali da cordone ombelicale e loro
differenziamento in colangiociti**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giacomo Carlo Sturniolo

Supervisore: Ch.mo Prof. Annarosa Floreani

Dottorando: Silvia Simoni

INDICE

RIASSUNTO	pag.1
ABSTRACT	pag.3
INTRODUZIONE	pag.5
1. Vie biliari	pag.5
2. L'epitelio biliare: caratteristiche strutturali e funzionali	pag.6
3. La secrezione biliare	pag.7
4. Il trasporto di membrana nell'epitelio biliare	pag.10
5. Regolazione della secrezione biliare	pag.12
6. I canali Cl ⁻	pag.12
7. I canali dell'acqua	pag.13
8. Le colangiopatie	pag.13
9. La Medicina rigenerativa nella cura delle malattie epatiche	pag.16
9.1 Le cellule staminali	pag.17
SCOPO	pag.20
MATERIALI E METODI	pag.21
1. Isolamento di cellule multipotenti da gelatina di Wharton	pag.21
2. Studio dell'immunofenotipo	pag.21
2.1 Citofluorimetria (CFM): basi teoriche	pag.21
2.2 Principio di funzionamento della CFM	pag.22
2.3 Analisi CFM dei campioni CCO	pag.24
3. Studio della potenzialità cellulare multidifferenziativa	pag.24
3.1 Colorazione Oil Red O	pag.25
3.2 Immunofluorescenza e microscopia confocale	pag.25
4. Induzione differenziativa in senso colangiocitario	pag.26
4.1 Immunofluorescenza e analisi di espressione di CK19 e GGT-1 mediante citofluorimetria su colture CCO differenziate	pag.26
5. Ottimizzazione <i>in vitro</i> dello stimolo induttivo colangiocitario	pag.26
5.1 Coltura 3D	pag.27
5.2 Coltura <i>coating</i>	pag.28

5.3 RT-PCR e analisi di espressione genica sulle colture differenziate su matrice MATCO	pag.28
5.3.1 Estrazione di mRNA	pag.28
5.3.2 Quantificazione spettrofotometrica di RNA mediante NANODROP	pag.29
5.3.3 RT-PCR	pag.29
5.3.4 Elettroforesi su gel di agarosio	pag.32
RISULTATI	pag.33
1. Colture cellulari	pag.33
2. Caratterizzazione fenotipica delle cellule CCO mediante citometria	pag.33
3. Studio della capacità multidifferenziativa delle cellule CCO	pag.33
4. Risposta delle cellule CCO all'induzione colangiocitaria	pag.34
4.1 Studio di morfogenesi	pag.34
4.2 Immunofluorescenza	pag.34
4.3 Citofluorimetria	pag.34
5. Espressione genica delle cellule CCO coltivate in sistemi ottimizzati di matrice MATCO e differenziate in senso colangiocitario	pag.34
5.1 Coltura 3D	pag.34
5.2 Coltura coating	pag.35
DISCUSSIONE	pag.44
CONCLUSIONI	pag.48
BIBLIOGRAFIA	pag.49

RIASSUNTO

Le malattie colestatiche croniche congenite o acquisite (*cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante, atresia pediatrica delle vie biliari*) rappresentano nel loro insieme una delle principali indicazioni al trapianto di fegato. Nell'ultimo ventennio, nuove ed innovative strategie terapeutiche basate sull'impiego di cellule staminali adulte, ovvero cellule staminali multipotenti identificate in tessuti diversi dell'organismo in età postnatale, sono state caratterizzate e proposte in chirurgia epatica.

Tale ricerca si inserisce in un programma di studio che in campo epatologico mira all'identificazione di popolazioni cellulari staminali adulte (CCO), che, isolate da una fonte di facile accesso ed eticamente approvata quale la gelatina di Wharton., possono rappresentare candidati ideali per la terapia cellulare delle colangiopatie. In tale prospettiva, le popolazioni cellulari CCO sono state stimulate *in vitro* con fattori induttivi per testare la loro capacità di differenziare in cellule simil colangiociti.

All'analisi di citofluorimetria, le popolazioni fibroblastoidi ottenute hanno mostrato positività all'espressione di marcatori di staminalità quali CD105, CD90, CD133 e negatività alla presenza di CD45, cKit, CD44 e HLA-DR. Sebbene l'immunofenotipo si sia mantenuto stabile nel corso delle subcolture, è stato osservato, dopo 15 passaggi, un significativo aumento percentuale di cellule positive per i marcatori CD133, CD44 e cKit. Similmente alle popolazioni cellulari staminali definite "migranti", le popolazioni CCO presentano mRNA specifici per le metalloproteinasi di matrice quali MMP2 e MMP3 e rispondono agli stimoli differenziativi in senso adipogenico, osteogenico e condrogenico fino alla subcoltura XV, come dimostrato dai tipici accumuli lipidici citoplasmatici e dall'espressione di specifici marcatori quali il perlecano, Runx-2, osteocalcina ed osteopontina.

Per valutare il grado di potenzialità differenziativa colangiocitaria sono stati allestiti a) un sistema di coltura bidimensionale per semina su piastre di polistirene non condizionate, b) un sistema di coltura tridimensionale per lo studio della tubulogenesi *in vitro* mediante incapsulazione delle cellule in una matrice di collagene 1 e Matrigel (MATCO), c) un sistema di coltura su *coating* di matrice MATCO. Dopo 7 giorni di stimolazione, le cellule coltivate nel sistema bidimensionale hanno dimostrato, all'analisi di immunofluorescenza e di citofluorimetria, l'espressione di marcatori tipici di linea colangiocitaria quali CK19 e GGT-1. La matrice MATCO si è dimostrata adatta a sostenere il differenziamento delle cellule CCO in senso simil-colangiocitario solo

nella forma di substrato. Infatti, all'analisi d'espressione mediante RT-PCR le cellule incapsulate in MATCO hanno dimostrato dopo trattamento induttivo la sola espressione di RNA messaggero per il marcatore GGT-1 e, all'analisi di morfogenesi, non hanno evidenziato alcuna organizzazione simil tubulare. Le cellule CCO differenziate su *coating* MATCO hanno acquisito caratteristiche simili a quelle dei colangiociti come dimostrato dall'espressione di mRNA per i marcatori GGT-1, CK19, MMP1, MMP2 e acquaporina 1. Non è stata osservata l'espressione di marcatori quali ALB, INT β 4 e fattore HNF1B.

Dal presente studio è quindi emerso che, mediante una procedura standardizzata, è possibile isolare da gelatina di Wharton una popolazione cellulare staminale multipotente, dotata di caratteristiche immunofenotipiche stabili, potenziale di crescita a lungo termine *in vitro* e capace di rispondere allo stimolo differenziativo colangiocitario su piastre di polistirene condizionate o meno con una matrice di collagene 1 e matrigel. L'impianto *in vivo* in un modello animale di danno biliare consentirà la valutazione del reale potenziale differenziativo delle popolazioni CCO.

ABSTRACT

All acquired or congenital cholestatic diseases (*primary biliary cirrhosis, sclerosing cholangitis, pediatric biliary atresia*) represent one of major indications for liver transplantation. In the last 20 years new and innovative cell-based therapeutic strategies using post-natal multipotent stem cells have been characterised and proposed for hepatic surgery.

This work develops a research program aimed to identify and isolate adult stem cells from an easy and ethic approved source like Wharton jelly (CCO) for liver applications in particular for cholangiopathies. In perspective, CCO cells have been *in vitro* stimulated with specific inducers in order to test their ability to differentiate into cholangiocyte-like cells.

By cytometrical analysis, the isolated fibroblastic populations have showed to be positive for stem cell markers like CD105, CD90, CD133 and negative for CD45, cKit, CD44 and HLA-DR. Although cell immunophenotype revealed to keep stable all over subculturing, after 15 passages a significative percentage increase of CD133, CD44 and cKit positive cells has been observed. Similarly to stem cells defined as “migrating”, CCO populations expressed mRNAs for matrix metalloproteinases such as MMP2, MMP3. Moreover, they showed to respond to differentiative adipogenic, osteogenic and chondrogenic stimula until XV culture passage, as demonstrated by cytoplasmic lipid droplets and expression of specific markers as perlecan, Runx-2, osteocalcin and osteopontin.

In order to evaluate the cholangiocyte differentiative potential of CCOs, it has been set on: a) 2D culture system based on unconditionated plates; b) 3D culture system for studying the *in vitro* tubulogenesis using a scaffold constituted of collagen type 1 and MatrigelTM (MATCO); c) MATCO coating-based culture system. After 7 days of stimulation, by immunofluorescence and cytometrical analysis, cells cultured in 2D system demonstrated the expression of typical cholangiocyte markers as CK19 and GGT-1. The MATCO matrix prepared as a coating layer showed to sustain the differentiation of CCOs into cholangiocyte-like cells. Indeed, by RT-PCR study, the encapsulated cells into MATCO demonstrated to express only GGT-1 marker and, by morphogenesis study, resulted not to be organized into tubular like structures. When induced and cultured on MATCO *coating*, CCOs showed similarities to cholangiocytes

as demonstrated by the expression of mRNAs for GGT-1, CK19, MMP1, MMP2 and aquaporin 1. No expression of ALB, INT β 4, HNF1B.

So, the present work demonstrated that, using a standardized procedure, it is possible to isolate from Wharton jelly a multipotent stem cell population, characterized by stable immunophenotype, long-term growth and responsiveness to cholangiocyte differentiative stimulus on unconditioned plates or on matrix prepared with collagen type 1 and MatrigelTM. The *in vivo* study using a biliary damage model will permit to evaluate the real differentiative potential of CCO populations.

INTRODUZIONE

I colangiociti (Lazaridis *et al.*, 2004) sono le cellule epiteliali specializzate che rivestono la complessa rete tridimensionale di dotti biliari (Nathanson *et al.*, 1991) ovvero i condotti che trasportano dalle sedi intraepatiche fino alla cistifellea e all'intestino tenue la bile prodotta dagli epatociti (Yokoyama *et al.*, 1953). Attraverso un sistema coordinato di secrezione e di riassorbimento di acqua e di elettroliti; modificano la composizione della bile primaria rispondendo ad una specifica regolazione ormonale (Kanno *et al.*, 2001). Benchè i colangiociti costituiscano solo il 3–5% di tutta la popolazione cellulare del fegato (Alpini *et al.*, 1994), essi secernono il 10% della bile totale nei ratti ed il 30% nell'uomo (Alpini *et al.*, 1989; Nathanson e Boyer, 1991).

1. Vie biliari

Le vie biliari umane vengono distinte anatomicamente in due porzioni: le vie biliari intraepatiche e le vie biliari extraepatiche. Le vie biliari intra-epatiche originano come canalicoli biliari o colangioli (Nathanson *et al.*, 1991) ovvero canali sprovvisti di parete propria perché delimitati dalle membrane citoplasmatiche di due epatociti adiacenti. Essi si continuano con i duttuli biliari di Hering composti in parte da epatociti e in parte da colangiociti e prevalentemente situati nella parte più periferica del lobulo. che poi terminano in un sistema di dotti che, in base al diametro, vengono distinti in interlobulari, settali, areali, segmentali ed epatici (Tabella 1).

Dotti larghi	Dotto epatico	>800 μm
	Dotto segmentale	400-800 μm
	Dotto areali	300-400 μm
Dotti piccoli	Dotto settale	100-300 μm
	Dotto interlobulare	15-100 μm
	Duttuli (colangioli)	<15 μm

Tabella 1: Classificazione dei canali biliari umani in base al diametro secondo Ludwig (1987).

Le vie biliari extraepatiche iniziano a livello dell'ilo del fegato dove i due dotti epatici destro e sinistro vanno a formare il dotto epatico comune. Questo, dopo un tratto di circa 3 cm, riceve il dotto cistico dalla cistifellea e come dotto coledoco penetra la parete duodenale a livello della papilla maggiore di Vater assieme al dotto pancreatico maggiore (Jones *et al.*, 1980).

2. L'epitelio biliare: caratteristiche strutturali e funzionali

L'albero biliare è una struttura eterogenea da un punto di vista strutturale e funzionale. I dotti piccoli sono infatti rivestiti da 4-5 colangiociti presentanti forma cuboidale, numerose giunzioni serrate (Glaser *et al.*, 2006) sulla membrana basolaterale e microvilli sul lato apicale. Nei dotti larghi, invece, i colangiociti si presentano più numerosi (10-12), colonnari (Benedetti *et al.*, 1996) e di dimensioni maggiori (Schaffner *et al.*, 1961). Entrambi i tipi di colangiociti presentano un nucleo multilobulato, numerose vescicole nella regione subapicale, un apparato del Golgi ben sviluppato tra il nucleo e la membrana apicale, lisosomi e pochi mitocondri (Benedetti *et al.*, 1996). La membrana basale ed apicale sono attive nei processi di endocitosi come dimostrato dalla presenza di caratteristiche cavità rivestite del tipo *caveolae* (Ishii *et al.*, 1990). La presenza di un largo nucleo ed un citoplasma meno sviluppato nei piccoli colangiociti suggerisce che tali cellule possano essere cellule primordiali scarsamente differenziate, mentre i larghi colangiociti che presentano un'area di citoplasma più grande rappresentano sistemi cellulari più differenziati come dimostrato da un reticolo endoplasmatico rugoso maggiormente sviluppato (Benedetti *et al.*, 1996).

La diversità morfologica cellulare è associata ad una specializzazione funzionale dell'albero biliare, come dimostrato dal diverso corredo enzimatico e sistemi di trasporto di membrana: nell'uomo, ad esempio, i dotti epatici larghi e segmentali esprimono gli enzimi pancreatici quali la lipasi, l' α -amilasi pancreatica e la tripsina. Gli antigeni di Lewis sialilati caratterizzano i soli dotti settali (Tabella 2).

Markers	Bile Duct Location
Lipase	Expressed by human intrahepatic large ducts, septal ducts, and peribiliary glands
Pancreatic α -amylase	Expressed by human intrahepatic large ducts, septal ducts, and peribiliary glands
Trypsin	Expressed by human intrahepatic large ducts, septal ducts, and peribiliary glands
Sialylated Lewis ^x	Expressed by septal bile ducts
Bcl-2	Expressed by small ductules
Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ exchanger	Expressed by small ducts and larger ducts

Tabella 2: Espressione differenziale di enzimi e proteine nei dotti biliari di uomo (da Kanno *et al.*, 2000).

Nell'albero biliare, le funzioni secretorie sono svolte principalmente dai colangiociti che rivestono i dotti interlobulari, settali e grandi, poiché hanno un trasporto ionico adeguato ed i recettori per la secretina (Strazzabosco *et al.*, 2000). Altre proprietà biologiche sembrano essere limitate ai colangioli terminali ed ai duttuli di Hering, quali a) la **plasticità** ovvero la capacità di subire cambiamenti fenotipici; b) la **reattività** ovvero la capacità di partecipare ad una reazione infiammatoria in caso di danno epatico; c) la **staminalità** in quanto cellule progenitrici del fegato (Sell, 2001).

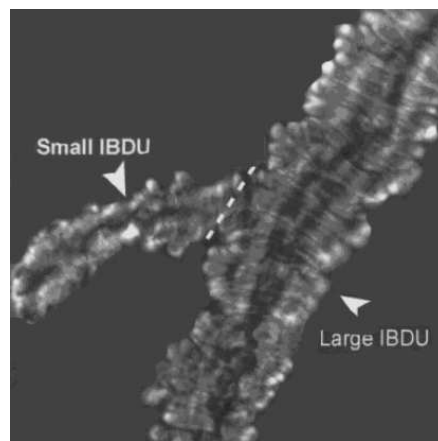


Figura 1: Immagine di microscopia elettronica a scansione di dotti biliari intraepatici larghi (large IBDU) e piccoli (small IBDU). (Ingrandimento: x2100).

3. La secrezione biliare

La formazione della bile richiede la funzione coordinata degli epatociti e dei colangiociti. In particolare, i primi producono la bile canalicolare e secernono la maggior parte degli osmoliti e dei costituenti biliari (acidi biliari, lipidi, glutazione, cationi e anioni organici, xenobiotici, proteine ed elettroliti) mentre i colangiociti determinano la fluidità e l'alcalinità della bile epatocellulare mediante a) la secrezione di fluidi, bicarbonato, cloruri ed immunoglobulina A e b) il riassorbimento di glucosio, acidi biliari, amminoacidi ed elettroliti. Le proprietà funzionali dell'albero biliare intraepatico sono confinate in specifici segmenti la cui caratterizzazione è stata possibile mediante l'analisi dei quadri patologici (Figura 2): per esempio, i dotti interlobulari, che sono coinvolti nella *Cirrosi Primaria Biliare*, rappresentano i siti in cui è più attiva la secrezione secretina-dipendente, mentre la duttopenia indotta da farmaco, che interessa i colangioli, ha suggerito l'esistenza di sostanziali differenze funzionali tra i dotti larghi e i colangioli in termini di trasporto di xenobiotici e metabolismo.

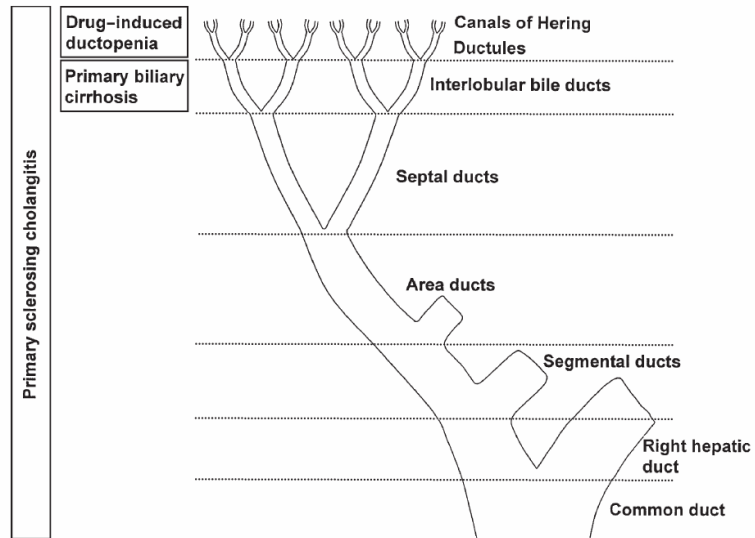


Figura 2: Correlazione tra patologie biliari e segmenti dell'albero biliare (da Strazzabosco *et al.*, 2000)

La secrezione dei dotti (Tabella 3) è modulata in modo coordinato da ormoni gastrointestinali (secretina, gastrina, insulina, somatostatina, bombesina, *vasoactive intestinal peptide*/VIP (Glaser *et al.*, 1997), peptidi vascolari (endotelina-1/ET-1) (Caligiuri *et al.*, 1998), enzimi (fosfatasi alcalina) (Alvaro *et al.*, 2000), acidi biliari (taurocolato, taurolitocolato, tauroiodioxicolato, tauroursodesossicolato, ursodesossicolato e tauroursodeoxilato) ed antagonisti dei recettori colinergici (LeSage *et al.*, 1999), adrenergici (Francis *et al.*, 2003), serotoninergici (Marzioni *et al.*, 2005) e dopaminergici (Glaser *et al.*, 2003).

Ormoni/Peptidi	Recettore	Secondo messaggero	Effetto
Secretina	Recettore della secretina	cAMP ↑	Induce una coleresi in ratti BDL
Somatostatina	SSTR ₂	cAMP ↓	Inibizione della coleresi basale e secretina-indotta in ratti BDL
Gastrina	Gastrina/CCK B	-IP ₃ , [Ca ²⁺] _i , PKC ↑ -Nessun effetto su cAMP basale - Inibisce la sintesi di cAMP secretina-indotta	-Nessun effetto sul flusso biliare basale -Inibisce la coleresi secretina-indotta in ratti BDL
Bombesina	-Simile -Localizzazione da definire	-Nessun effetto su cAMP, cGMP o [Ca ²⁺] _i -Da definire	Aumenta il flusso di bile attraverso la stimolazione dello scambiatore Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻
Sostanza P	-	-	Nessun effetto sulla secrezione di fluidi da parte dei dotti
VIP	-Simile -Localizzazione da definire	cAMP -	Aumenta il flusso della bile attraverso la stimolazione dello scambiatore Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻
Insulina	Recettore dell'insulina	-Nessun effetto sul cAMP basale -Inibisce la sintesi di cAMP secretina-indotta	-Nessun effetto sulla secrezione biliare basale -Inibisce la coleresi secretina-indotta
Endotelina	ET-A, ET-B	-IP ₃ , [Ca ²⁺] _{intracellulare} -Nessun effetto sul cAMP basale - Inibisce la sintesi secretina-indotta di cAMP	-Nessun effetto sul flusso biliare basale -Inibisce la coleresi secretina indotta
Acetilcolina	M3 ACh	-IP ₃ , [Ca ²⁺] _i - <i>Cross talking</i> tra [Ca ²⁺] _i e cAMP. -Aumenta la sintesi di cAMP secretina-dipendente	Aumenta la secrezione basale di bicarbonato secretina-dipendente
Modulazione purinergica	Recettore purinergico	-[Ca ²⁺] _i -Indipendente dal <i>pathway</i> di CFTR	Secrezione [Ca ²⁺] _i -dipendente di Cl ⁻ nella bile

Tabella 3: Regolazione dell'epitelio biliare (da Baiocchi *et al.*, 1999). BDL: legatura del coledoco; - : nessun dato pubblicato.

La secretina è un peptide di 27 amminoacidi prodotto dalle cellule S della mucosa della parte prossimale dell'intestino tenue nella fase post-prandiale (Chang *et al.*, 1998). Le sue funzioni fisiologiche durante la digestione comprendono la stimolazione della secrezione pancreaticata arricchita di bicarbonato e l'inibizione del rilascio di HCl nei succhi gastrici (Walsh, 1993). La secretina svolge un ruolo chiave nella regolazione del processo secretorio dell'epitelio biliare intraepatico attraverso i canali del cloro (Cl^-) a bassa conduttanza quale il recettore transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) (Fitz *et al.*, 1993), funzionalmente accoppiato allo scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, (LeSage *et al.*, 1996), Na^+ -indipendente.

In risposta alla secretina, l'epitelio biliare intraepatico incrementa l'idratazione e l'alcalinità della bile epatocellulare e tale azione è mediata dallo scambio di Cl^- e HCO_3^- a livello della membrana apicale dei colangiociti (*idrocoleresi secretina dipendente*) (Tavoloni, 1987). La secrezione di HCO_3^- è funzionale non solo al processo digestivo ma anche alla regolazione del pH biliare ed all'assorbimento di acidi organici poco liofili (Strazzabosco *et al.*, 1997).

4. Il trasporto di membrana nell'epitelio biliare

La membrana plasmatica dei colangiociti è caratterizzata da un alto grado di polarizzazione funzionale (Figura 3).

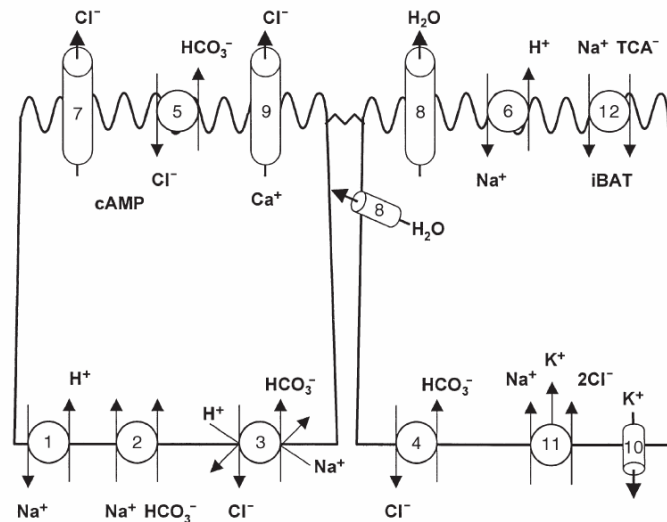


Figura 3: Trasporto elettrolitico nei colangiociti

L'influsso di HCO_3^- nelle cellule duttali umane è dovuto allo scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Na^+ -dipendente presente sulla membrana basale (Strazzabosco *et al.*, 1997). Il gradiente di Na^+ richiesto per il trasporto acido/base è mantenuto grazie all'ATPase Na^+/K^+ localizzato sulla membrana basale. L'accumulo intracellulare di HCO_3^- si realizza anche grazie all'idratazione catalizzata di CO_2 seguita dal trasporto protonico mediato dallo scambiatore Na^+/H^+ o dalla pompa H^+ . In seguito, HCO_3^- è poi secreto nel lume biliare mediante lo scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ cAMP-dipendente (Martinez-Anso *et al.*, 1994). Il recettore della secretina, accoppiato all'enzima adenilciclastasi, è presente a livello della membrana basale (Figura 4).

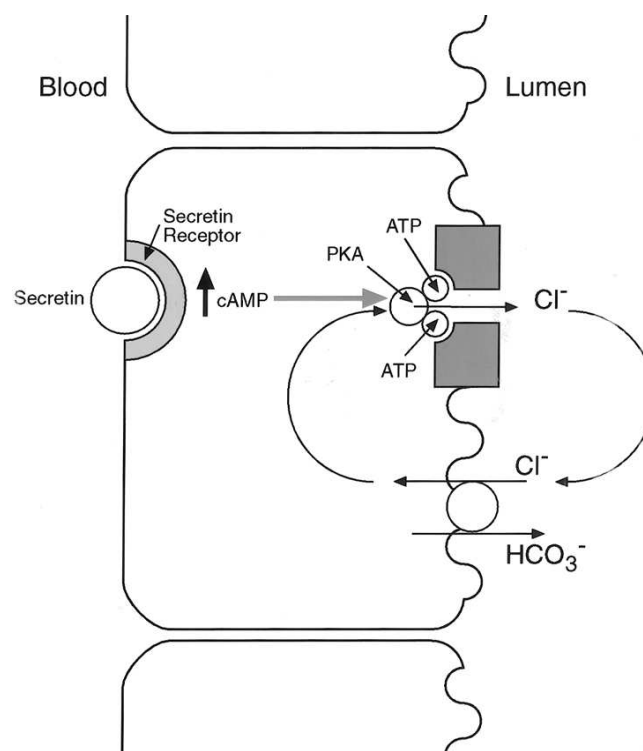


Figura 4: Rappresentazione schematica degli effetti della secretina sulla secrezione dei colangiociti. La secretina interagisce con i recettori basolaterali ed aumenta la sintesi di cAMP intracellulare, che, a sua volta, agisce attraverso PKA per fosforilare ed attivare il CFTR (Alvaro *et al.*, 1997 b).

L'interazione della secretina col suo recettore determina un aumento intracellulare dei livelli di cAMP (Glaser *et al.*, 2003), la fosforilazione della protein chinasi A (PKA) (Alvaro *et al.*, 1997 b), l'apertura del canale regolatore CFTR (Alpini *et al.*, 1997) e conseguentemente la secrezione del bicarbonato nel lume biliare (LeSage *et al.*, 1996). Il recettore della secretina è considerato un utile marcatore per la valutazione dell'eterogenicità secretoria, proliferativa ed apoptotica dell'epitelio biliare intraepatico.

in risposta ad agonisti, danni epatici o tossine (Kanno *et al.*, 2000). Nel fegato di ratto è stato dimostrato che è espresso a livello basale (Alpini *et al.*, 1994) e va incontro ad una *up regolazione* nelle condizioni patologiche che implicano un'aumentata crescita cellulare quale la legatura dei dotti biliari (BDL) (Alpini *et al.*, 1998) oppure una *down regolazione* in seguito a danno indotto con CCl₄ (LeSage *et al.*, 1999). Nell'uomo, il CFTR o lo scambiatore Cl⁻/HCO₃⁻ risulterebbero essere accumulati in vescicole citoplasmatiche e, dopo specifica stimolazione, sarebbero esposti in membrana (Strazzabosco *et al.*, 1991).

5. Regolazione della secrezione biliare

I principali siti anatomici della secrezione regolata dalla secretina e dalla somatostatina sono i larghi dotti biliari. I piccoli dotti, dove mancano i trasportatori Cl⁻/HCO₃⁻ e CFTR, le funzioni secretorie suggeriscono che questa porzione dell'albero biliare svolge un ruolo passivo nel trasporto della bile canalicolare fino al sito distale interlobulare dove la bile viene modificata mediante i processi di assorbimento e secrezione biliare. Si ipotizza che i piccoli dotti biliari possano essere coinvolti solo nell'assorbimento massivo di molecole liofile quali i sali biliari non coniugati, gli acidi deboli e la bilirubina non coniugata. Inoltre, la scarsa presenza del plesso peribiliare a tale livello è in linea con il concetto secondo cui i piccoli dotti sono meno attivi da un punto di vista funzionale. In particolare, essi secernono osmoliti quali Cl⁻ e HCO₃⁻ che sono responsabili della formazione di un potenziale transepiteliale e di un gradiente osmotico che determina il passaggio nel lume di Na⁺ ed acqua mediante, rispettivamente, la via paracellulare ed i canali selettivi (Nielsen *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 1994).

6. I canali Cl⁻

Come precedentemente riportato, l'attivazione dei canali Cl⁻ nei colangiociti è del tipo secretina dipendente ed è conseguente ad un aumento intracellulare di cAMP, all'attivazione dell'enzima PKA e alla fosforilazione del canale CFTR (Alvaro *et al.*, 1997 a). Due ulteriori canali Cl⁻ indipendenti da cAMP (Zeng *et al.*, 1997) sono stati identificati. Uno è intracellulare, Ca²⁺- dipendente, è caratterizzato dalla conduttanza al K⁺ ed è inibito dal 4,4-diisotiocianatostibene- 2,2- acido disulfonico (DIDS) (Zeng *et al.*, 1997). L'altro canale è insensibile al Ca²⁺ ed è inibito dalla tossina della pertosse (Clarke *et al.*, 1994). Il ruolo supplementare dei canali Cl⁻ del tipo non-CFTR nella secrezione duttale è avvalorato dalla scoperta che la presenza di canali Cl⁻ attivati da

Ca²⁺ nei topi knockout per il CFTR previene le lesioni ai dotti biliari causate dalla fibrosi cistica (Clarke *et al.*, 1994).

E' stato dimostrato che l'attivazione dei canali Cl⁻ Ca²⁺ sensibili è conseguente alla stimolazione ATP-dipendente dei recettori purinergici P_{2u} presenti sulla membrana apicale dei colangiociti (Zsembery *et al.*, 1998), che mobilitano le riserve di [Ca²⁺] intracellulare (Zsembery *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 1997). Tali evidenze sono in linea con l'ipotesi secondo cui l'ATP secreto dagli epatociti nella bile possa controllare i canali Cl⁻ Ca²⁺ dipendenti e la secrezione biliare duttale attraverso i recettori P_{2u} (Baiocchi *et al.*, 1999).

7. I canali dell'acqua

Il trasporto di membrana nei dotti biliari coinvolge specifici canali dell'acqua detti acquaporine (Marinelli *et al.*, 1997), quale l'acquaporina-1 (AQP1) e 4 (AQP4) (Marinelli *et al.*, 1999; Marinelli *et al.*, 2000). Nell'epitelio della cistifellea, l'attività dei canali dell'acqua è regolata dalla vasopressina (Verkman *et al.*, 1989). Nell'epitelio biliare, la secretina stimola la localizzazione e l'attività dell'acquaporina sulla membrana apicale dei colangiociti (Marinelli *et al.*, 1999).

8. Le colangiopatie

Le colangiopatie rappresentano un ampio gruppo di patologie che colpiscono l'albero biliare intraepatico che, in base alla loro eziologia, possono essere classificate come: genetiche ed ereditarie, immuno-mediate, infettive, indotte da tossicità da farmaci, ischemiche, idiopatiche o di origine tumorale (Tabella 4). Sebbene siano patologie rare, la loro incidenza è piuttosto variabile e l'età di insorgenza può andare dall'età pediatrica (come l'*atresia delle vie biliari*) all'età adulta (come il *colangiocarcinoma*). Sono caratterizzate da un'inflammation portale più o meno intensa e tendono a formare setti fibrotici all'interno del parenchima epatico ovvero cirrosi (Lazaridis *et al.*, 2004; Strazzabosco, 2005).

Genetiche ed ereditarie
Sindrome di Alagille, fibrosi cistica, deficienza di MDR3, rene policistico autosomico dominante (ADPKD), rene policistico autosomico recessivo (ARPKD), fegato policistico autosomico dominante (ADPLD), malattia di Caroli, fibrosi epatica congenita (CHF), assenza congenita della vena porta (CAPV)
Immunomediate
Cirrosi biliare primitiva (PBC), colangite autoimmune (AIH), colangite sclerosante primitiva (PSC), rigetto acuto, rigetto cronico, graft vs host disease
Infettive
Batterica, parassitaria, fungina, virale
Ischemiche
Stenosi dell'arteria epatica post-trapianto, infusione di chemoterapici dall'arteria epatica, vasculite sistemica
Indotte da farmaci
Acido clavulanico, anti-infiammatori non steroidei, statine
Idiopatiche
Atresia biliare intraepatica, atresia biliare extraepatica, duttopenia idiomatica dell'adulto
Tumorali
Colangiocarcinoma

Tabella 4: Classificazione delle colangiopatie.

Il **colangiocarcinoma** (CCA) è un tumore aggressivo, caratterizzato da una forte reazione desmoplastica e da una forte invasività. Il trattamento più utilizzato è quello chirurgico, ma i risultati sono scarsi perché la maggior parte dei CCA, al momento della diagnosi, presentano già metastasi nei linfonodi locali. La prognosi è quindi estremamente infausta (Kanno *et al.*, 2000).

L'**atresia delle vie biliari** (AVB) è un processo necroinfiammatorio progressivo, che coinvolge parzialmente o totalmente l'albero biliare extraepatico. La AVB è la causa più comune di ittero colestatico neonatale con una prevalenza di 1 ogni 10.000-15.000 nati vivi, cioè circa 700 neonati affetti ogni anno in Europa. La malattia esordisce nei primi giorni di vita ed in genere evolve verso l'obliterazione dei dotti biliari extraepatici e l'interruzione del flusso biliare. Se non trattata, la patologia conduce a morte entro i primi due anni di vita (Caccia *et al.*, 2004).

La **colangite sclerosante primitiva** (CSP) è invece una malattia cronica del fegato caratterizzata da ricorrenti episodi di infiammazione dei dotti biliari che progressivamente possono giungere a uno stadio di sclerosi e determinare

successivamente cirrosi epatica con varie complicanze quali ascite, ittero, encefalopatia ed emorragia digestiva (Lazaridis *et al.*, 2004).

Le colangiopatie si caratterizzano quali processi localizzati e non diffusi. La *Cirrosi Biliare Primaria* (PBC) colpisce ad esempio in maniera selettiva i dotti interlobulari mentre la *Colangite Primaria Sclerosante* (PSC) interessa tutti i dotti piccoli e, nella sua forma classica detta *Colangite Primaria Sclerosante dei dotti grandi* colpisce i dotti extraepatici ed i principali dotti intraepatici.

Tutte le colangiopatie presentano oltre che un diverso grado di fibrosi portale ed infiammazione, anche un reperto istopatologico comune rappresentato da un accumulo di strutture biliari nella zona periportale chiamato *reazione duttulare* (Popper, 1990), fenomeno riparativo/rigenerativo epatico che coinvolge tre distinti tipi cellulari epiteliali: le *Reactive Ductular Cells* (RDC), le *Intermediate Hepato-Biliary Cells* (IHBC) e le *Hepatic Progenitor Cells* (HPC) (Desmet, 1998). I progenitori epatici (HPC) si caratterizzano per la forma ovoidale o fusiforme, il grosso nucleo tondeggiante e lo scarso citoplasma. Note in passato come cellule ovali, le HPC si localizzano in forma isolata oppure in piccoli gruppi nel parenchima epatico oppure all'interfaccia con lo spazio portale (Roskams *et al.*, 2004) ed esprimono marcatori sia epatocitari che colangiocitari come albumina, Chrom-A, Hepar-1, CK7, CK8, CK18, CK19, HEA-125, NCAM, OV-6 (Ruck *et al.*, 1997; Van Den Heuvel *et al.*, 2001; Roskams *et al.*, 2003) oltre che marcatori di staminalità come CD34 e c-Kit (Baumann *et al.*, 1999; Crosby *et al.*, 2001). Sono cellule staminali bipotenti che possono differenziare sia verso la linea biliare (RDC) che epatocitaria (IHBC) (Sell, 2001; Roskams, 2004). In corso di patologia epatica umana, i tre fenotipi possono essere identificati e la loro percentuale di espressione è strettamente dipendente dal tipo di danno e grado di colestasi. Le RDC si presentano come duttuli dismorfici, anastomizzati tra loro e con lume poco definito od assente e positivi all'espressione di a) marcatori biliari quali CK7, CK8, CK18, CK19 (Libbrecht e Roskams, 2002; Roskams *et al.*, 2003), HEA-125 (Fabris *et al.*, 2000), OV6 (Van Den Heuvel *et al.*, 2001), b) marcatori neurali, come Cromogranina-A/Chrom-A (Roskams *et al.*, 1990) e Neural Cell Adhesion molecole/NCAM (Roskams *et al.*, 1990; Fabris *et al.*, 2000; Libbrecht *et al.*, 2001), c) di marcatori di staminalità, come c-Kit (Baumann *et al.*, 1999). Le IHBC si localizzano nel parenchima epatico e sono caratterizzate da un fenotipo intermedio tra quello dei colangiociti e degli epatociti; come dimostrato dalla forma poligonale tipica degli epatociti e

dall'espressione di marcatori prettamente epatocitari come CK8, CK18, albumina, α 1-antitripsina e Hepar-1 (Gerber *et al.*, 1983), e marcatori biliari specifici come CK7, CK19, HEA-125 ed OV6 (Fabris *et al.*, 2000; Roskams *et al.*, 2003). Le malattie colestatiche croniche congenite o acquisite rappresentano nel loro insieme una delle principali indicazioni al trapianto di fegato, laddove i meccanismi riparatori fisiopatologici non sono sufficienti a garantire una rigenerazione endogena ed una funzionalità epatica compatibile con la vita.

In particolare, la sindrome di Alagille (AGS) è una malattia genetica autosomica dominante caratterizzata da colestasi cronica, disfunzione cardiaca congenita, facies peculiare, vertebre a farfalla, ed embriotaxon posteriore. La sindrome di Alagille si manifesta solitamente attraverso una disfunzione epatica, e può essere necessario un trapianto di fegato. Esistono due tipi di malattia: il tipo 1 (94% dei casi) è dovuto alle mutazioni del gene JAG1 (20p12) che codifica per un ligando della via di segnale Notch (Alagille *et al.*, 1987); il tipo 2 è dovuto a mutazioni del gene Notch 2 (1p12) (McDaniell *et al.*, 2006). La malattia è caratterizzata principalmente dalla scarsità di dotti epatici nel fegato, ma comprende anche una serie di anomalie cardiache, scheletriche, renali, vascolari e oculari (Li *et al.*, 1997). Benché le mutazioni di JAG1 producano effetti pleiotropici, le alterazioni iniziali, sia a livello cellulare che molecolare, responsabili dell'ampio spettro di fenotipi AGS non sono ancora state definite chiaramente (Lemaigre, 2003). Probabilmente il sintomo iniziale di AGS è da ricercare durante le prime fasi di sviluppo. La scarsità di dotti biliari e le caratteristiche istologiche della AGS possono essere dovute ad una serie di meccanismi quali il blocco del differenziamento delle cellule precursori in colangiociti, la scarsa proliferazione cellulare o l'aumento dell'apoptosi cellulare (Lazaridis *et al.*, 2004).

9. La Medicina rigenerativa nella cura delle malattie epatiche

Il trapianto di fegato da donatore è considerato il trattamento elettivo per numerose patologie epatiche (Merion *et al.*, 2006), nonostante siano numerose le complicazioni che esso comporta a livello delle vie biliari (D'Alessandro *et al.*, 2000). Tali complicazioni comprendono le lesioni anastomiche/non anastomiche e le perdite dell'albero biliare. Le lesioni anastomiche sono piuttosto rare ed hanno una incidenza dell'1% dopo l'anastomosi dotto-dotto e del 3% dopo la ricostruzione dei dotti (Colonna *et al.*, 1992). Le lesioni non anastomiche sono molto spesso associate alla trombosi arteriosa epatica (HAT) (Tung *et al.*, 1999) oppure al trapianto di fegato

(Sanchez–Urdazpal *et al.*, 1993). Le perdite hanno un tasso del 10%-40% e seguono ad una coledocostomia come conseguenza di errori tecnici, eccessiva pressione o necrosi ischemica (Grief *et al.*, 1994).

In ragione dell'elevato tasso di mortalità per malattie epatiche e della limitata disponibilità di donazioni di fegato, oggi la Medicina Rigenerativa rappresenta un approccio innovativo per la cura di patologie complesse quali i disordini epatici e la terapia cellulare è considerata una strategia alternativa al trapianto nella cura del danno epatico (Vosough *et al.*, 2011).

9.1 Le cellule staminali

Una cellula staminale viene definita come una cellula non specializzata che a) ha la capacità di moltiplicarsi indefinitamente mediante divisioni cellulari e b) in condizioni fisiologiche o sperimentali è in grado di differenziarsi in cellule mature con specifiche funzioni (Ratajczak *et al.*, 2008). Il compartimento staminale a livello tissutale viene conservato nel tempo grazie alla tipica divisione mitotica staminale. Tale mitosi è definita “asimmetrica” o differenziativa perchè dà origine a due cellule figlie, di cui una procede al differenziamento in una specifica linea cellulare matura (*commitment*), mentre l'altra preserva le caratteristiche di staminalità ed assicura il cosiddetto “*self-renewal*” o autorinnovamento della cellula madre (Ratajczak *et al.*, 2008). Questa proprietà consente l'omeostasi tissutale, assicura il corretto *turnover* cellulare in tutti i tessuti dell'organismo e, in occasione di danno, assicura la rigenerazione della struttura. Il diverso grado di potenzialità differenziativa delle cellule staminali porta a distinguere tipologie diverse di staminalità (Ratajczak *et al.*, 2008) quali:

1. la totipotenza (caratteristica dello zigote e dei blastomeri derivati dalle prime due divisioni), definisce la potenzialità di una cellula di generare tutti i tessuti e gli annessi embrionali;
2. la pluripotenza (tipica delle cellule staminali embrionali), è la capacità di generare le cellule dei tre foglietti embrionali;
3. la multipotenza (osservata nelle cellule staminali adulte), è la proprietà di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule;
4. l'unipotenza (propria delle cellule staminali tessuto-specifiche), è la potenzialità di differenziare in un unico tipo cellulare.

L'interesse che la comunità scientifica ha sviluppato nel corso dell'ultimo decennio nei confronti delle cellule staminali nasce dalla considerazione della loro potenziale

capacità di sostenere un processo rigenerativo *in vivo*. Numerosi studi hanno sperimentato in modelli animali la potenzialità terapeutica di popolazioni staminali isolate da sorgenti diverse nel recuperare gravi danni tessutali oppure patologie quali il *morbo di Alzheimer e di Parkinson*, la *distrofia muscolare*, l'*insufficienza cardiaca*, la *sclerosi multipla* e il *diabete*.

Per le possibilità immediate di impiego in campo clinico, un particolare interesse è rivolto oggi alle cellule staminali adulte, cioè cellule “multipotenti” identificate in numerosi distretti tessutali in età post-natale, quali il midollo osseo, la cute, il cordone ombelicale e il tessuto adiposo (Seta e Kuwana, 2007). Indicate con l’acronimo ASC (*Adult Stem Cells*), rappresentano una popolazione rara localizzata in specifici microambienti, detti *nicchie staminali* (Perez-Moreno *et al.*, 2003). La loro funzione principale è quella di mantenere l’omeostasi del tessuto al quale appartengono, rimpiazzando le cellule che muoiono a causa di un danno o al sopraggiungere di una malattia.

Numerosi studi hanno dimostrato che le ASC hanno un elevato potenziale differenziativo: in seguito a specifica stimolazione, differenziano *in vitro* in cellule tipiche dei a) tessuti mesodermici, quali muscolo scheletrico (Ferrari *et al.*, 1998) e muscolo cardiaco (Orlic *et al.*, 2001), b) tessuti endodermici, quale il tessuto epatico (Alison *et al.*, 2000), c) tessuti ectodermici, quale il tessuto neurale (Mezey *et al.*, 2000). La prima popolazione staminale adulta è stata isolata ed identificata nel midollo osseo (Friedenstein *et al.*, 1970; Friedenstein *et al.*, 1976). Tale popolazione comprende cellule stromali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSC), il cui utilizzo trova oggi impiego nella pratica clinica per il recupero di danni a livello dei tessuti osseo e cartilagineo (Friedenstein *et al.*, 1970; Friedenstein *et al.*, 1976). In seguito alle scoperte di Friedenstein, sono state identificate differenti popolazioni stromali mesenchimali con caratteristiche simili ma non identiche a quelle delle cellule staminali adulte midollari. Le ASC pur essendo meno numerose e meno plastiche rispetto alle cellule staminali embrionali (ESC) presentano l’indubbio vantaggio di poter essere prelevate, espanse e reintrodotte nel paziente stesso evitando reazioni immunitarie e tutti i possibili problemi connessi ad una terapia immunosoppressiva. Inoltre, data la loro origine, non sollevano problemi di natura etica.

Cellule Staminali Mesenchimali (MSC)

Le MSC sono popolazioni eterogenee di cellule indifferenziate e multipotenti. In coltura *ex vivo*, aderiscono alla plastica e formano piccole colonie di cellule fibroblastoidi (CFU-F, *Colony Forming Units-Fibroblastic*). Come definito dalla *Società Internazionale per la Terapia Cellulare (ICT)* (Dominici *et al.*, 2006), presentano una elevata espressione ($\geq 95\%$) dei marcatori CD105, CD73, CD90 e bassa espressione ($\leq 2\%$) degli antigeni CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 e HLA-DR.

Esse sono in grado di autorinnovarsi e presentano capacità differenziativa in senso osteogenico, adipogenico e cartilagineo. Studi *in vitro* ed *in vivo* hanno inoltre dimostrato che sono dotate di *proprietà immunomodulatorie* (Le Blanc e Ringden, 2005; Nauta e Fibbe, 2007): agiscono infatti mediante a) la soppressione dell'attivazione e della proliferazione delle cellule T; b) l'inibizione del differenziamento, della maturazione e della funzionalità delle cellule dendritiche; c) il controllo del differenziamento e dell'attivazione delle cellule B; d) la soppressione della proliferazione delle cellule *natural killer* (NK). Gli effetti immunomodulatori delle MSC sono mediati da fattori, quali HGF (*hepatocyte growth factor*), IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*), PGE2 (*prostaglandin E2*), TGF- β (*transforming growth factor β*) e IFN- γ (*interferon γ*).

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 (Rubistein *et al.*, 1993), la placenta (Kern *et al.*, 2006), il tessuto adiposo (Zuk *et al.*, 2002) ed il sangue periferico (He *et al.*, 2007).

Sebbene sia stato dimostrato il potenziale rigenerativo in senso epatocitario di cellule staminali isolate da tessuto adiposo (Al Battah *et al.*, 2011), cordone ombelicale (Liang *et al.*, 2012), midollo osseo, pelle e placenta (Snykers *et al.*, 2011), attualmente, in letteratura, non sono riportati dati relativi allo studio di differenziamento di popolazioni staminali cordonali in senso colangiocitario.

SCOPO

Nell'ultimo decennio, la presenza di cellule staminali multipotenti da cordone ombelicale è stata oggetto di un grande interesse da parte della comunità scientifica. In termini di applicazione clinica, il cordone ombelicale rappresenta una fonte ideale perché è di facile accesso, non richiede procedure estrattive invasive per il paziente, consente l'ottenimento di cellule per uso autologo ed il suo utilizzo non comporta alcun problema di tipo etico. In letteratura, numerose pubblicazioni scientifiche riportano l'identificazione di cellule di tipo fibroblastoide nella gelatina di Wharton, caratterizzate da crescita e plasticità differenziativa estremamente eterogenee. Attualmente, poiché non sono stati ancora ben definiti l'esistenza, l'immunofenotipo e la capacità espansiva *in vitro* di popolazioni cellulari cordonali dotate di potenzialità differenziativa in senso colangiocitario, una più profonda comprensione delle popolazioni cellulari multipotenti cordonali e l'identificazione di un procedimento estrattivo standardizzato consentirebbero lo sviluppo di approcci terapeutici alternativi al trapianto di fegato nella cura delle colangiopatie.

Pertanto, nel presente lavoro di tesi, in accordo con le linee guida definite dalla *International Society for Cellular Therapy* (Dominici *et al.*, 2006), è stato oggetto di studio il potenziale differenziativo colangiocitario di popolazioni cellulari fibroblastoidi isolate da gelatina di Wharton dopo caratterizzazione dell'immunofenotipo, della capacità espansiva *in vitro* e delle proprietà multidifferenziative.

Per valutare il grado di potenzialità differenziativa colangiocitaria sono stati allestiti a) un sistema di coltura bidimensionale per semina su piastre di polistirene non condizionate, b) un sistema di coltura tridimensionale per lo studio della tubulogenesi *in vitro* mediante incapsulazione delle cellule in una matrice di collagene di tipo 1 e MatrigelTM (MATCO) ed infine c) un sistema di coltura su *coating* di matrice MATCO.

MATERIALI E METODI

1. Isolamento di cellule multipotenti da gelatina di Wharton

Dopo lavaggio in betadine, il cordone è stato risciacquato in PBS e successivamente sottoposto allo sminuzzamento dello stroma cordonale, dopo allontanamento della vena ombelicale e delle arterie. I frammenti così ottenuti sono stati digeriti mediante collagenasi IV (Sigma) allo 0,1% a 37°C per 15 minuti e successivamente i campioni sono stati filtrati utilizzando un *cell strainer* (BD), ovvero una membrana di nylon con porosità 40 µm. Dopo centrifugazione a 1200 rpm per 5 minuti ed eliminazione del surnatante, le cellule sono state seminate in piastra P100 (BD) non condizionata, in terreno di proliferazione costituito da alfa MEM *without nucleosides* (Gibco), siero bovino fetale (FBS) al 16,5% (Gibco), soluzione antibiotica (APS) all'1% (Sigma) e glutamax all'1% (Gibco). Alla comparsa di elementi cellulari con morfologia fibroblastoide, sono stati eseguiti ripetuti lavaggi della piastra. Il cambio di terreno è stato eseguito a giorni alterni fino al raggiungimento della confluenza cellulare del 90%. Le colture primarie sono state distaccate mediante trattamento con una soluzione di EDTA-tripsina (Sigma). Le subcolture sono state preparate utilizzando una densità di semina di 5×10^3 cellule/cm².

2. Studio dell'immunofenotipo

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

2.1 Citofluorimetria (CFM): basi teoriche

La nascita della citofluorimetria a flusso (CFM) avviene intorno agli anni '70 e determina un veloce ed intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche. Inizialmente limitata alla misura di 1-2 parametri (uno per le misure fisiche e l'altro per la fluorescenza), la CFM porta subito un grande impulso allo studio del sistema immunitario, mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con isotiocianato di fluoresceina (FITC).

Lo sviluppo ulteriore della citofluorimetria è stato poi dettato dall'incremento di produzione di a) anticorpi monoclonali e policlonali; b) fluorocromi da impiegare nella coniugazione agli anticorpi; c) citofluorimetri a flusso multiparametrici.

Un punto di svolta nella CFM fu lo sviluppo di coloranti come le ficobiliproteine,

fluorocromi naturali solubili in acqua, fluorescenti a pH neutro, facilmente coniugabili con anticorpi monoclonali, con elevate rese quantiche (Figura 5). Le ficobiliproteine sono caratterizzate da un tetrapirrolo lineare coniugato a proteine, che, in seguito ad una transizione elettronica, origina una banda spettrale.

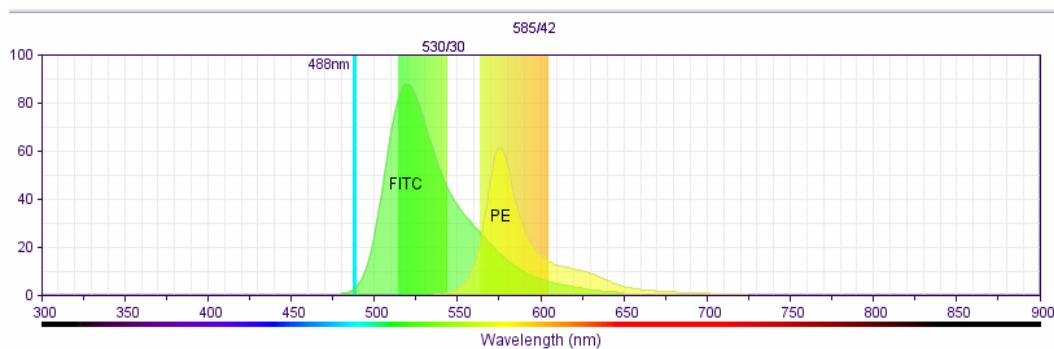


Figura 5: Spettro di emissione dei fluorocromi FITC e PE.

L'analisi citofluorimetrica permette di misurare caratteristiche fisiche e chimiche delle cellule o di altre particelle biologiche 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 viene eseguita su proprietà singole o multiple e procede ad una velocità (eventi/sec) molto rapida (300-500 eventi/sec).

2.2 Principio di funzionamento della CFM

La tecnica prevede a) la preparazione del campione nella forma di una sospensione cellulare monodispersa, b) la marcatura con anticorpo/anticorpi fluorescenti specifici, c) il caricamento in un sistema fluidico di trasporto o *sheath fluid*, d) l'eccitazione del campione nella camera di flusso mediante un fascio di luce laser focalizzata di alcune decine di micron (Figura 6) ed infine e) l'analisi dei dati. Il diametro del flusso di trasporto è dipendente dal *nozzle tip*, ovvero un piccolo orifizio cilindro-conico in ceramica essenziale per la focalizzazione idrodinamica delle particelle ed il suo diametro può variare a seconda delle dimensioni delle particelle da separare (70-100 μm).

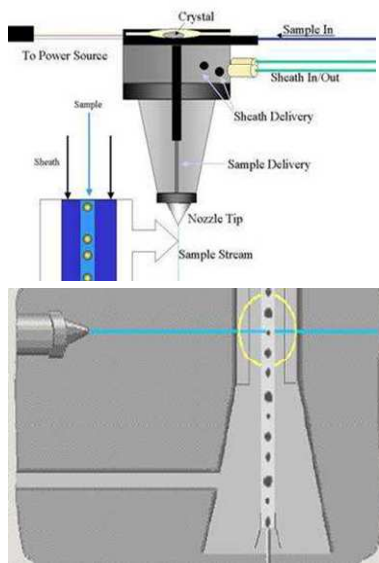


Figura 6. Camera di flusso e punto in cui il laser intercetta le cellule.

Quando il raggio di luce intercetta il flusso cellulare (*stream*), ogni singola cellula o particella, dopo marcatura con uno o più anticorpi fluorescenti, eccitata genera segnali relativi alle sue proprietà fisiche (*diametro, rapporto nucleo/citoplasma, 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 diecrici 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 digitalizzati (Figura 7).

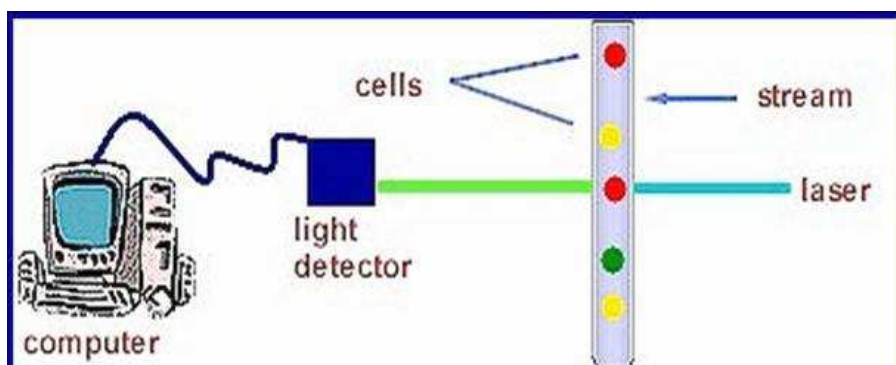


Figura 7 . Elementi costitutivi di un citofluorimetro.

2.3 Analisi CFM dei campioni CCO

Dopo coltura espansiva, le subcolture IV sono state distaccate dalla piastra mediante trattamento con EDTA/tripsina, centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti e risospese in PBS allo 0,2% di albumina sierica bovina (BSA) (Sigma). Ogni campione è stato allestito trattando, a temperatura ambiente, per 15 minuti, 2×10^5 cellule con 5 μ l di anticorpo primario anti-CD90 coniugato FITC (Santa Cruz), -CD105 coniugato PE (Santa Cruz), -cKit coniugato PE (Santa Cruz), -CD45 coniugato PE (Santa Cruz), -CD44 coniugato PE (Santa Cruz), HLA-DR coniugato PE (Santa Cruz), -CD133 coniugato PE (Bioscience) in 100 μ l di tampone fosfato. Dopo un lavaggio in PBS, i campioni sono stati poi caricati sul citofluorimetro MoFlo High Speed Cell Sorter (Beckman Coulter) e i dati relativi a 10^4 cellule totali sono stati acquisiti mediante il programma Summit 4.3 nel range di lunghezza d'onda di 530 ± 40 (FITC) e 580 ± 30 nm (PE). In parallelo, un campione negativo è stato preparato mediante marcatura con l'anticorpo isotipico coniugato FITC e PE. I dati sono espressi come percentuale di cellule positive rispetto al controllo negativo e sono ottenuti applicando la funzione statistica Substraction del programma di analisi Summit 4.3. L'analisi citometrica è stata ripetuta sulle subcolture IV, VII, X e XV per verificare la stabilità fenotipica cellulare *in vitro*.

3. Studio della potenzialità cellulare multidifferenziativa

E' stata valutata la risposta delle popolazioni cellulari a specifici stimoli differenziativi trattando subcolture di diversa generazione (IV, VII, X e XV) con terreni specifici induttivi di tipo adipogenico [DMEM LG (Gibco), FBS al 10% (Sigma), APS all'1% (Sigma), insulina 10 μ g/ml (Sigma), IBMX 0,5mM (Sigma), desametasone 1 μ M (Sigma), indometacina 60 μ M (Sigma)], condrogenico [DMEM LG (Gibco), Fetal Calf Serum (FCS) all'1% (Sigma), insulina 0,5 μ g/ml (Sigma), ACIDO ASCORBICO 50 μ M (Sigma), TGF β 1 10ng/ml (Sigma)] ed osteogenico [MEM (Gibco), FBS al 10% (Sigma), APS all'1% (Sigma), desametasone 100 nM (Sigma), β -glicerofosfato 10mM (Sigma), acido ascorbico 0,05mM (Sigma)]. A definiti intervalli di tempo (7 e 14 giorni), è stata studiata l'espressione di specifici marcatori di differenziamento adipogenico (accumulo citoplasmatico di trigliceridi) ed osteogenico [Runx2, osteocalcina ed osteopontina], condrogenico [perlecano] mediante colorazione citochimica OIL RED O ed immunofluorescenza/microscopia confocale.

3.1 Colorazione Oil Red O

E' stata preparata una soluzione di Oil Red O (Sigma) alla concentrazione di 5mg/ml in isopropanolo (Sigma). 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 2 lavaggi veloci in acqua distillata e 1 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).

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

3.2 Immunofluorescenza e microscopia confocale

I campioni sono stati lavati in PBS 1X e fissati in para-formaldeide al 4% in PBS 1X per 10 minuti e a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio in PBS 1X, è stata eseguita la saturazione dei siti aspecifici incubando le cellule con una soluzione al 10% di *Horse Serum* (HS) (Sigma) in PBS 1X per 3 ore e mezzo e a temperatura ambiente.

Successivamente, è stata eseguita l'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi primari *goat anti-RUNX2*, *rabbit anti-osteocalcina*, *rabbit anti-osteopontina* e *goat anti-perlecano*. Tutti gli anticorpi sono stati acquistati dalla ditta Santa Cruz e sono stati preparati in una soluzione di PBS 1X con HS al 3%, alla diluizione 1:100.

Dopo 3 lavaggi di 10 minuti in PBS 1X 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 minuti a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi di 3 minuti in PBS 1X, le cellule sono state trattate per 10 minuti 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 minuti 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).

4. Induzione differenziativa in senso colangiocitario

I campioni sono stati seminati su piastre non condizionate P100 e P24 e poi coltivati in terreno di proliferazione fino al raggiungimento della massima confluenza. L'induzione differenziativa ha previsto il trattamento dei campioni con terreno differenziativo composto da DMEM/F12 (1:1) (Gibco), FBS al 10% (Sigma), APS all'1% (Sigma), DEX 100 nM (Sigma), EGF 5ng/ml (Sigma), HGF 5ng/ml (Sigma), ITS 1X (Sigma). In parallelo, i campioni di controllo sono stati allestiti mantenendo le colture in terreno preparato con DMEM/F12 (1:1), FBS al 10%, APS all'1%. Ad intervalli di tempo di 7 e 14 giorni i campioni sono stati sottoposti all'analisi dei marcatori di linea colangiocitaria quali la citocheratina 19 (CK19) e il gamma glutamil transferasi 1 (GGT-1) mediante immunofluorescenza e citofluorimetria.

4.1 Immunofluorescenza e analisi di espressione di CK19 e GGT-1 mediante citofluorimetria su colture CCO differenziate

I campioni differenziati sono stati preparati per l'analisi di immunofluorescenza e citometria utilizzando le procedure descritte rispettivamente nelle sezioni 3.2 e 2.3. Per lo studio di espressione del CK19, la marcatura è stata preceduta dalla permeabilizzazione cellulare con una soluzione di Triton allo 0,1% in PBS 1X per 15 minuti per l'analisi di immunofluorescenza e per 1 min per lo studio di citofluorimetria. In questo studio gli anticorpi primari *mouse* anti-GGT-1 e *mouse* anti-CK19 sono stati acquistati dalla ditta Sigma e sono stati utilizzati alla diluizione 1:1250 per lo studio di immunofluorescenza e alla concentrazione di $5\mu\text{l}/60 \times 10^3$ cellule per l'analisi di citofluorimetria. Dopo marcatura con l'anticorpo primario, i campioni sono stati lavati con PBS addizionato con BSA allo 0,2% e poi incubati con 5 μl dell'anticorpo secondario Alexa 488 anti-mouse (Gibco) per 15 minuti, al buio. In parallelo, un campione di controllo è stato preparato mediante marcatura con l'anticorpo secondario.

5. Ottimizzazione *in vitro* dello stimolo induttivo colangiocitario

I tradizionali sistemi di coltura bidimensionali basati sulla crescita cellulare in monostrato sono attualmente considerati limitati in quanto non ricreano quel complesso gioco di interazioni cellula-cellula e cellula-matrice che *in vivo* sono essenziali per la regolazione dei processi proliferativi e differenziativi.

E' noto che il microambiente cellulare, ovvero quel complesso di fattori strutturali che costituiscono la matrice extracellulare, gioca un ruolo essenziale nella traduzione a

livello intracellulare dei segnali esterni induttivi. Le proteine della matrice extracellulare (ECM) modulano la differenziazione cellulare, regolando un adeguato scambio diffusivo dei segnali solubili differenziativi. Modelli tridimensionali allestiti utilizzando matrigel, ovvero un estratto di matrice extracellulare di sarcoma di ratto, e collagene 1 sono stati impiegati con successo per lo studio del differenziamento in senso colangiocitario di progenitori cellulari epatici (Tanimizu *et al.*, 2007). Allo scopo di migliorare la risposta differenziativa delle cellule CCO al trattamento induttivo, la matrice preparata con matrigel e collagene di tipo 1 è stata utilizzata per l'ottenimento di sistemi di coltura tridimensionali (coltura 3D) o di supporti di crescita (coltura *coating*).

5.1 Coltura 3D

Una adatta matrice tridimensionale può ricreare *in vitro* un ambiente simil nativo e stimolare le cellule ad organizzarsi in specifiche strutture tubulari simili (Tanimizu *et al.*, 2007). Nel presente lavoro di tesi, le cellule CCO sono state incapsulate in una matrice tridimensionale adatta allo studio della tubulogenesi *in vitro* e preparata con Matrigel (BD) al 40% e gel di collagene di tipo 1 (Sigma) alla concentrazione finale di 1,2 mg/ml (MATCO). L'incapsulazione cellulare ha previsto la semina di 4×10^4 cellule per ml di gel stimulate direttamente con terreno differenziativo composto da DMEM/F12 (1:1) (Gibco), FBS al 10% (Sigma), APS all'1% (Sigma), DEX 100 nM (Sigma), EGF 5ng/ml (Sigma), HGF 5ng/ml (Sigma), ITS 1X (Sigma). I campioni di controllo sono stati allestiti in terreno preparato con DMEM/F12 (1:1), FBS al 10%, APS all'1%. Per ottenere un assemblaggio ottimale, le colture tridimensionali sono state preparate in piastre insert Millicell con membrana di politetrafluoroetilene (PTFE) (0,4 μ m) e la gelificazione è stata eseguita a 37° C per 2h. Tutti i campioni sono stati mantenuti in coltura per una settimana e poi sono stati raccolti per l'analisi di espressione mediante RT-PCR dei marcatori di linea GGT-1 e CK19.

In parallelo, alcune colture cellulari, dopo fissaggio con PFA al 4%, sono state sottoposte allo studio di morfogenesi in strutture simil tubulari mediante microscopia ottica e microscopia confocale dopo colorazione con il tracciante nucleare DAPI diluito 1:5 in PBS.

5.2 Coltura *coating*

Il *coating* di matrice MATCO è stato preparato su piastre multiwell da 24 pozzetti utilizzando 440µl di gel e mantenendo la piastra a 37°C fino a completa polimerizzazione. Le cellule sono state quindi seminate ad una densità di $10 \times 10^3/\text{cm}^2$ in terreno completo DMEM/F12 addizionato con fattori colangiocitari induttivi. In parallelo, il campione di controllo di differenziamento è stato preparato in terreno completo DMEM/F12. Dopo 7 giorni dalla semina, i campioni sono stati raccolti per lo studio dell'espressione di mRNA specifici per GGT-1 e CK19 mediante RT-PCR. In ragione di una maggiore resa di estrazione di RNA, l'analisi di espressione è stata estesa ad altri marcatori quali integrina beta 4 (INTβ4), albumina (ALB), metalloproteinasi di matrice 1, 2, 3 (MMP1, MMP2, MMP3), *hepatocyte nuclear factor 1B* (HNF1B) e acquaporina 1 (AQP1).

5.3 RT-PCR e analisi di espressione genica sulle colture differenziate su matrice MATCO

5.3.1 Estrazione di mRNA

Per eseguire la procedura di estrazione di mRNA è stato utilizzato il Trizol (Gibco), soluzione monobasica di fenolo e guanidina isotiocianato. Dopo 7 giorni di trattamento, le cellule sono state distaccate meccanicamente mediante l'uso di un puntale, raccolte in tubi da 1,5 ml e centrifugate a 12000 rpm per 5 minuti. Dopo aver rimosso il terreno, il pellet cellulare è stato risciacquato in PBS 1X e centrifugato nuovamente a 12000 rpm per 5 minuti. Dopo eliminazione del surnatante, il pellet è stato conservato a - 80°C in RNA later (Sigma). Al momento dell'estrazione, il pellet è stato incubato con la soluzione di Trizol (Sigma) nella misura di 1 ml per $5-10 \times 10^6$ cellule, per 5 minuti, a temperatura ambiente. In seguito all'aggiunta di soluzione di cloroformio (Sigma) (0,2 ml per 1 ml di Trizol), i campioni sono stati agitati manualmente per 15 secondi ed incubati per 3 minuti a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione a 12000 g per 15 minuti a 4°C, la fase superiore acquosa è stata prelevata e trasferita in un tubo da 1,5 ml. Successivamente è stata eseguita la precipitazione dell'RNA dalla fase acquosa mediante aggiunta di una soluzione di isopropanolo (Fluka) (0,5 ml per 1 ml di Trizol impiegato) ed incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati poi centrifugati a 12000 g per 10 minuti a 4°C e i pellet sono stati lavati in etanolo al 75% (1 ml per 1 ml di Trizol impiegato), sottoposti ad agitazione e poi centrifugati a

7500 g per 5 minuti a 4°C. Dopo rimozione del surnatante, il pellet è stato lasciato asciugare all'aria per 10 minuti e successivamente risospeso in una soluzione acquosa contenente l'inibitore delle RNase cellulari, DEPC (dietilpirocarbonato), allo 0,1% (Gibco). L'RNA risospeso è stato trasferito in tubi da 0,2 ml RNase-free e incubato per 10 minuti a 60°C. Dopo quantificazione spettrofotometrica, è stato infine trasferito a – 80°C.

5.3.2 Quantificazione spettrofotometrica di RNA mediante NANODROP

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata mediante lo spettrofotometro NANODROP 2000 (Thermo Scientific).

Utilizzando 1 µl di campione, lo strumento è in grado di determinare automaticamente la lettura del campione a 260, 280 e 230 nm di lunghezza d'onda, la concentrazione ed i relativi rapporti per determinare il grado di purezza del campione analizzato.

5.3.3 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:

1. Omniscript e Sensiscript Reverse Transcriptases (*retrotrascrizione*)
2. 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 (25µl) è stata preparata in ghiaccio utilizzando 30 ng di RNA, 2,5 µl *forward primer* (5 µM), 2,5 µl *reverse primer* (5 µM), 1 µl dNTP mix (10mM), 1 µl *Qiagen One Step RT-PCR Enzyme Mix*, 5 µl 5X buffer e acqua RNase *free*.

La One Step RT-PCR è stata effettuata con il termociclatore PTC-220 DNA Engyne Dyad (MJ Research) ed alle condizioni riportate nella Tabella 5.

FASI	TEMPO	TEMPERATURE
Retrotrascrizione	30 min	50°C
Step iniziale di attivazione	15 min	95°C
Denaturazione	0.5-1 min	94°C
Annealing	0.5-1 min	50-56°C
Estensione	0.5-1 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* Gliceraldeide3FosfatoDeidrogenasi (GAPDH).

Primers	Sigla	Sequenza (5'-3')	Sequenza di riferimento	Lunghezza
Citocheratina 19	CK19	F- A CCA GCC GGA CTG AAG AAT TGA R- AGA GGA CCT TGG AGG CAG ACA AAT	NM_002276.4	389 pb
Gamma-glutamyltransferasi 1	GGT-1	F- AGC CTG TCT TGT GTG AGG TGT TCT R- TCA GCT CAG CAC GGT AGT TGT TCA	NM_001032365.2	218 pb
Integrina beta 4	INTβ4	F- TAC ACA AGC TCC AGC AGA CCA AGT R- AGA ACT CAG GCT GCT CAA AGG ACA	BC143738.1	416 pb
Albumina	ALB	F- ACA AGA GTG AGG TTG CTC ATC GGT R- CAC TTC GGC AAT GCA GTG GGA TTT	NM_000477.5	871 pb
Metalloproteinasi 1	MMP1	F- AGT GAC TGG GAA ACC AGA TGC TGA R- AGT CCA AGA GAA TGG CCG AGT TCA	NM_001145938.1	455 pb
Metalloproteinasi 2	MMP2	F- ACA TCC TAT GAC AGC TGC ACC ACT R- AGA GCT CCT GAA TGC CCT TGA TGT	NM_004530.4	435 pb
Metalloproteinasi 3	MMP3	F- AGG TGT GGA GTT CCT GAT GTT GGT R- TGT TGG CTG AGT GAA AGA GAC CCA	NM_002422.3	423 pb
Fattore nucleare epatocitario 1B	HNF1B	F- ACC TGG TAC GTC AGA AAG CAA CGA R- GGA GGT GTT GAG GCT TTG TGC AAT	NM_001165923.1	767 pb
Acquaporina 1	AQP1	F- ATG ACC TGG CTG ATG GTG TGA ACT R- CCA GTG GTT GCT GAA GTT GTG TGT	NG_007475.1	250 pb
Gliceraldeide 3Fosfato Deidrogenasi	GAPDH	F- ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC R- TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	Liu <i>et al.</i> , 2004	450 pb

Tabella 6: Coppie di primer forward e reverse utilizzate per l'analisi di espressione mediante RT-PCR su colture cellulari CCO stimulate con terreno induttivo colangiocitario.

5.3.4 Elettroforesi su gel di agarosio

L'analisi elettroforetica dei prodotti di reazione PCR è stata eseguita su gel di agarosio (Sigma) preparato al 2% in soluzione tampone TBE 1X (0,04 mM tris-Borato, 0,001 M EDTA, pH 8) (Sigma) ed utilizzando Gel Red (0,1 µl/ml) (Biotium). Per il caricamento su gel, sono stati utilizzati 8 µl di DNA amplificato di ciascun campione addizionati di 2 µl di soluzione colorante Gel Loading Buffer (Sigma). Come marcatore di riferimento per i pesi molecolari tra 50 e 2000 pb è stato utilizzato il prodotto PCR Marker (Sigma). 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).

RISULTATI

1. Colture cellulari

Dopo 7 giorni dalla semina, l'analisi di microscopia ottica ha evidenziato la presenza di cellule fibroblastoidi, organizzate in colonie CFU-F (Fig 8A). La crescita delle subcolture fino alla XV è stata caratterizzata mediante microscopia ottica e conta cellulare ad intervalli di 48h dalla semina (5×10^3 cellule/cm²). Nella coltura espansiva, non è stata osservata nessuna alterazione morfologica e la capacità proliferativa si è mantenuta costante con un tempo di raddoppiamento di circa 24h.

2. Caratterizzazione fenotipica delle cellule CCO mediante citometria

L'analisi dell'immunofenotipo mediante citometria ha dimostrato che le popolazioni estratte sono positive per i marcatori tipicamente espressi da cellule staminali mesenchimali quali il CD105 (89.2%), il CD90 (82.4%) e negative all'espressione del marcatore di linea ematopoietica CD45 e dell'antigene di istocompatibilità HLA-DR. Tale profilo di espressione si è mantenuto costante fino alla XV generazione. Come si osserva in Fig 9, la positività per i marcatori quali CD133, CD44 e cKIT è aumentata in modo significativo nel corso della subcultura. Si ipotizza che tale incremento sia dovuto alla selezione ed espansione di una definita sottopopolazione.

3. Studio della capacità multidifferenziativa delle cellule CCO

Per testare il potenziale differenziativo delle popolazioni estratte, le subcolture di generazione IV, VII, X e XV sono state coltivate in terreni specifici induttivi. Tutti i campioni hanno mostrato di rispondere agli stimoli differenziativi in senso adipogenico, osteogenico e condrogenico e tale potenziale si è mantenuto inalterato nella coltura espansiva fino alla generazione XV. Come dimostrato in Fig 10, nei campioni stimolati con IBMX, insulina e DEX sono stati osservati tipici accumuli citoplasmatici di trigliceridi (Fig 10B) rispetto al controllo non differenziato (Fig 10A). L'espressione di specifici marcatori di linea condrogenica quali il perlecano (Fig 10D) e di linea osteogenica quali il Runx-2 (Fig 10E), osteocalcina (Fig 10F), ed osteopontina (Fig 10G) è stata osservata nelle subcolture stimulate con fattori induttivi condrogenici ed osteogenici rispetto al controllo indifferenziato (Fig 10C).

4. Risposta delle cellule CCO all'induzione colangiocitaria

All'analisi di microscopia ottica, le cellule CCO indotte hanno mostrato un cambiamento della loro morfologia acquisendo una forma poliedrica rispetto al controllo in cui gli elementi cellulari per tutto il tempo della coltura hanno mantenuto una forma tipicamente allungata (Fig 11).

4.1 Studio di morfogenesi

Dopo 7 giorni dall'incapsulazione in matrice MATCO e stimolazione differenziativa, le cellule CCO hanno formato piccoli aggregati irregolari in cui non è stata osservata alcuna forma di polarizzazione cellulare e/o definizione di strutture tubulari simili (Fig 12A, B).

4.2 Immunofluorescenza

Come riportato in Fig 13 e Fig 14, dopo 7 e 14 giorni dal trattamento con fattori induttivi colangiocitari, nelle subcolture CCO è stata osservata, mediante immunofluorescenza, l'espressione di specifici marcatori, quali CK19 (Figura 13B, D) e GGT-1 (Figura 14B, C). Nessun segnale di fluorescenza è stato osservato nei campioni di controllo indifferenziato (Figura 13A, 13C, 14A).

4.3 Citofluorimetria

L'analisi citofluorimetrica è stata condotta su campioni seminati su piastre non condizionate. Rispetto al controllo indifferenziato, è stato osservato un significativo aumento percentuale della popolazione positiva all'espressione del CK19 (52,8%) e di GGT-1 (57,7%) (Fig 15).

5. Espressione genica delle cellule CCO coltivate in sistemi ottimizzati di matrice MATCO e differenziate in senso colangiocitario

5.1 Coltura 3D

L'incapsulazione in matrice MATCO ha limitato la risposta cellulare allo stimolo differenziativo. Infatti, all'analisi mediante RT-PCR sui campioni trattati (Fig 16A), è stata osservata, rispetto al controllo, una debole espressione di mRNA per GGT-1. Nessuna amplificazione relativa al CK19 è stata visualizzata. L'espressione del gene *house keeping* GAPDH ha dimostrato che la reazione di RT-PCR si è realizzata con

successo. Alla luce di tali risultati, non si è proceduti all'analisi di espressione genica di altri marcatori di linea colangiocitaria.

5.2 Coltura *coating*

La crescita sulla matrice preparata con collagene di tipo 1 e Matrigel™ si è rivelata efficace nel sostenere l'espressione specifica di mRNA per CK19, GGT-1, AQP1 e MMP1 nelle cellule CCO trattate rispetto al controllo (Fig 16B). Un differente profilo di espressione è stato osservato per MMP2 e MMP3 (Fig 16B). Infatti, MMP2 è risultato espresso sia nel controllo che nel trattato suggerendo che la sua espressione potrebbe essere legata alla “staminalità” della popolazione piuttosto che al trattamento induttivo (Fig 16B). Al contrario, la presenza di mRNA per MMP3 è stata osservata solo nel campione di controllo, un risultato che suggerisce un possibile controllo indotto dalla stimolazione differenziativa sull'espressione genica. Pertanto, i marcatori MMP2 e MMP3 sono da considerarsi quali fattori caratterizzanti la popolazione CCO allo stato indifferenziato. Nessuna espressione basale o indotta di ALB, INTβ4 e HNF1B è stata osservata nei campioni trattati e di controllo. La mancata espressione di albumina lascia pensare ad un specifico differenziamento delle cellule CCO verso la linea colangiocitaria.

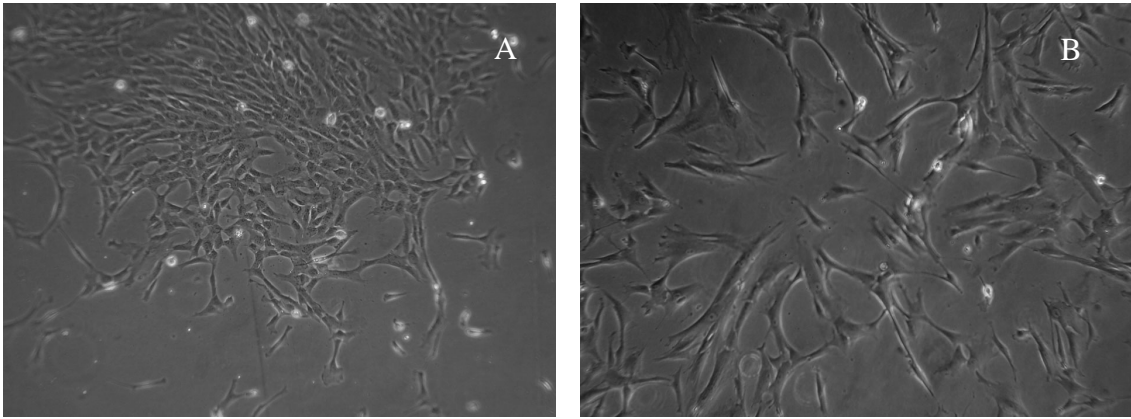
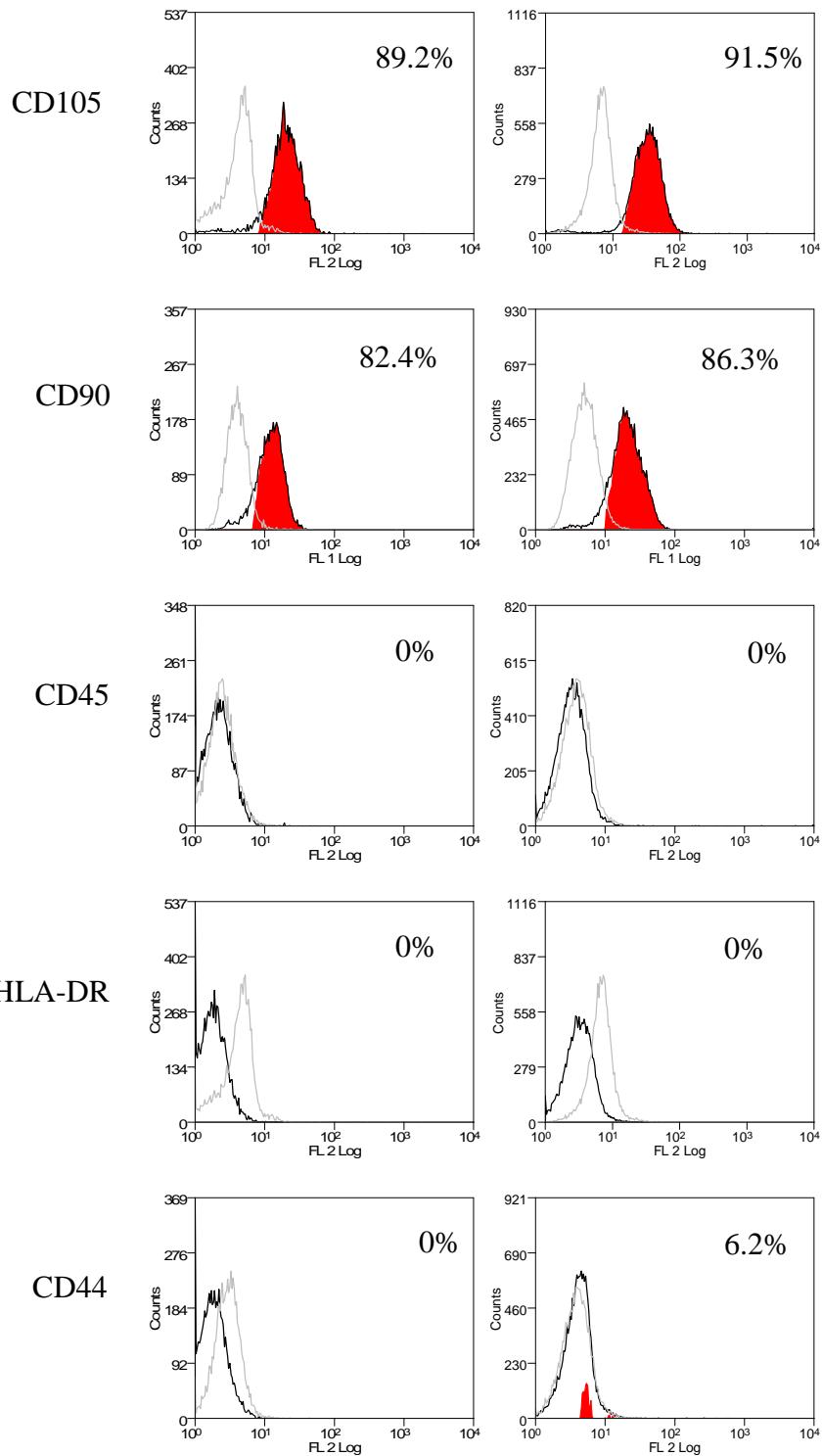


Figura 8: Analisi di microscopia ottica delle cellule CCO: (A) coltura primaria; (B) subcoltura XV. Ingrandimento: (A) X100, (B) X200.

Subcultura IV

Subcultura XV



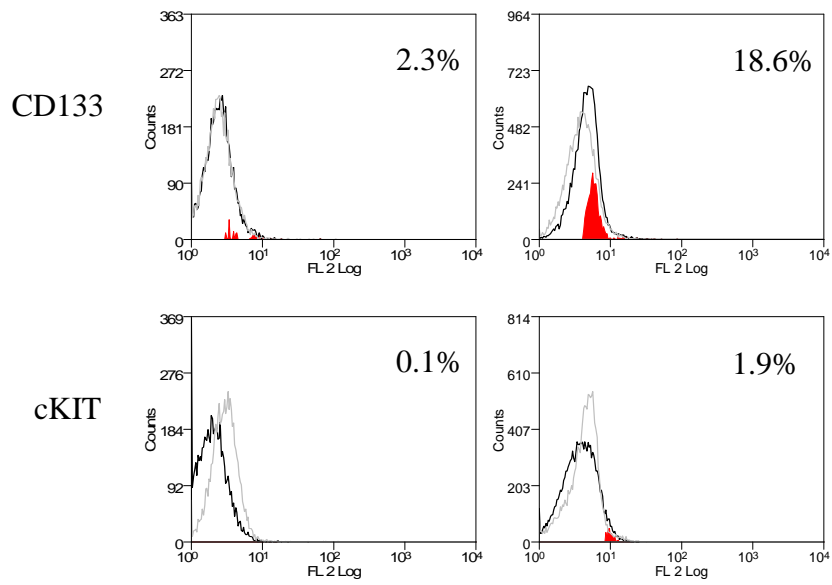


Figura 9: Caratterizzazione citofluorimetrica dell'immunofenotipo delle subcolture IV e XV delle cellule CCO. (Profilo grigio: controllo isotipico; profilo nero: campione marcato con anticorpo primario di interesse; profilo rosso: cellule positive rispetto al controllo isotipico).

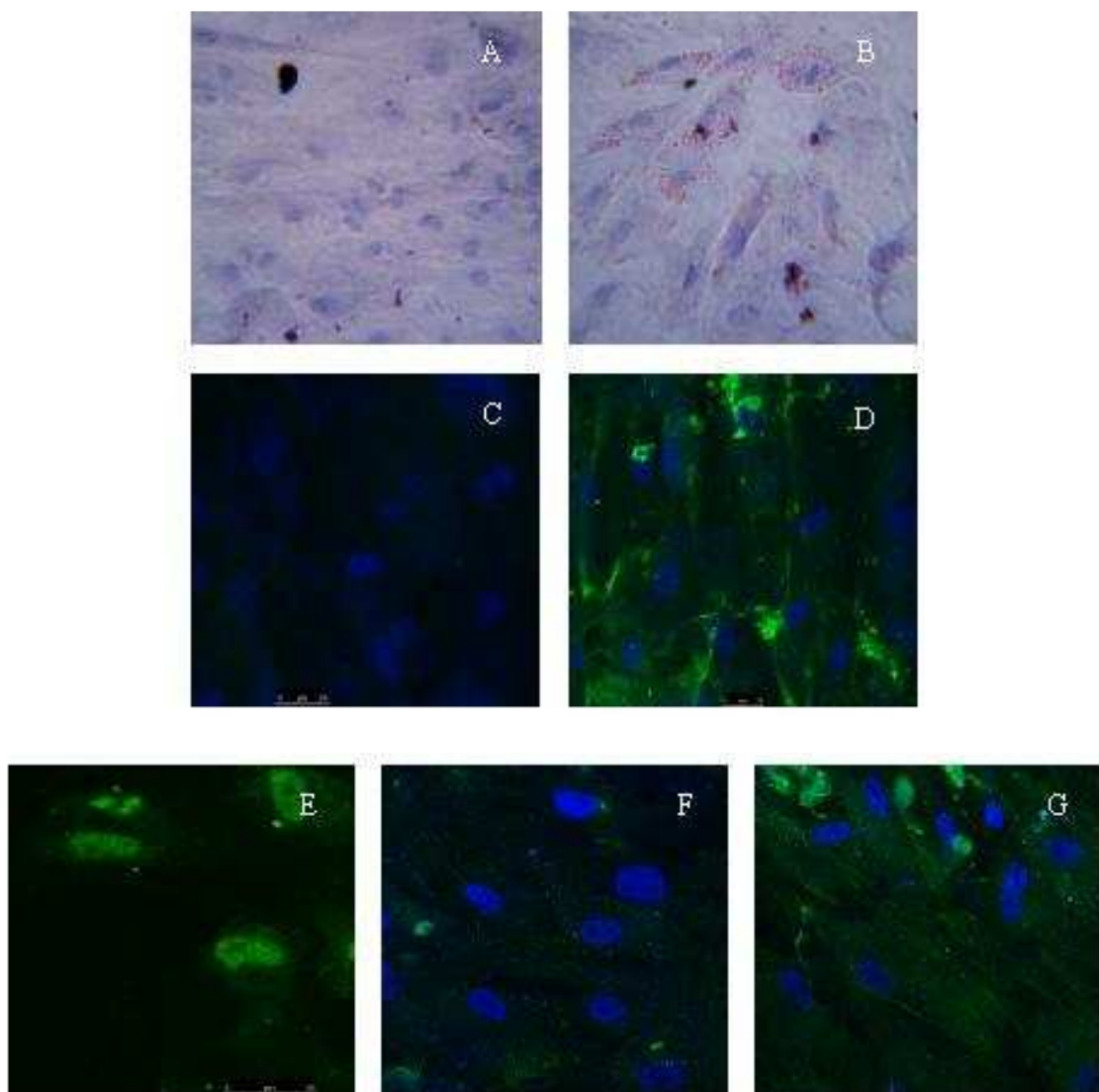


Figura 10: Caratterizzazione del potenziale differenziativo delle subcolture IV-XV mediante colorazione Oil Red O (A: controllo negativo; B: differenziato dopo 14gg) ed immunofluorescenza (C: controllo negativo; D: trattato con anti-perlecano; E: trattato con anti-Runx2; F: trattato con anti-osteocalcina; G: trattato con anti-osteopontina). Ingrandimento: (A, B, C, D, G) X400; (E, F) X630.

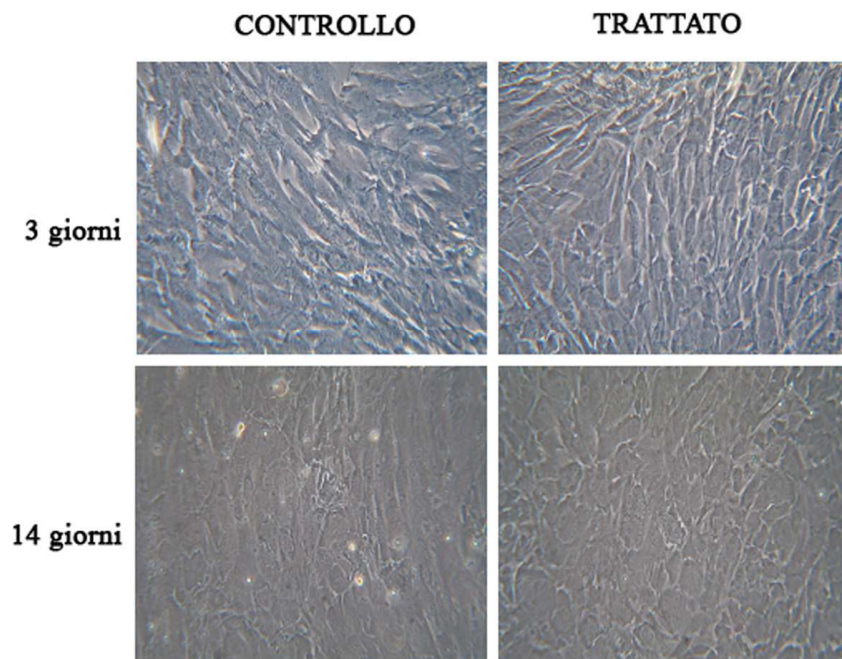


Figura 11: Analisi morfologica mediante microscopia ottica delle cellule CCO (subcoltura IV) dopo stimolazione con terreno specifico colangiocitario per 3 e 14 giorni. Ingrandimento: X200.

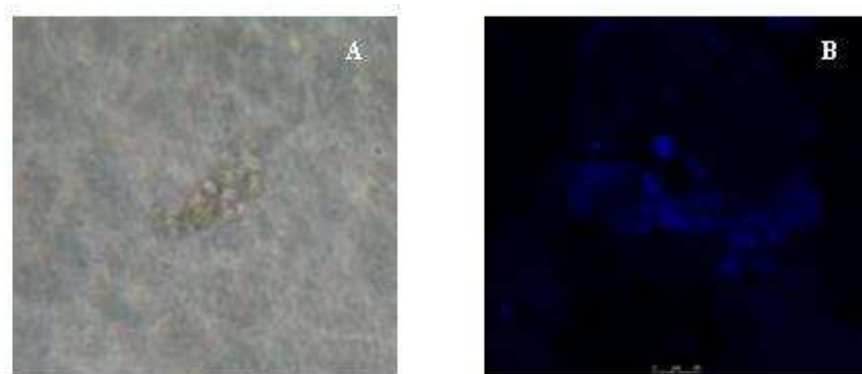


Figura 12: Analisi mediante microscopia ottica (A) e microscopia confocale dopo colorazione nucleare con DAPI (B) della subcoltura IV, incapsulata in matrice tridimensionale MATCO. Ingrandimento: X200.

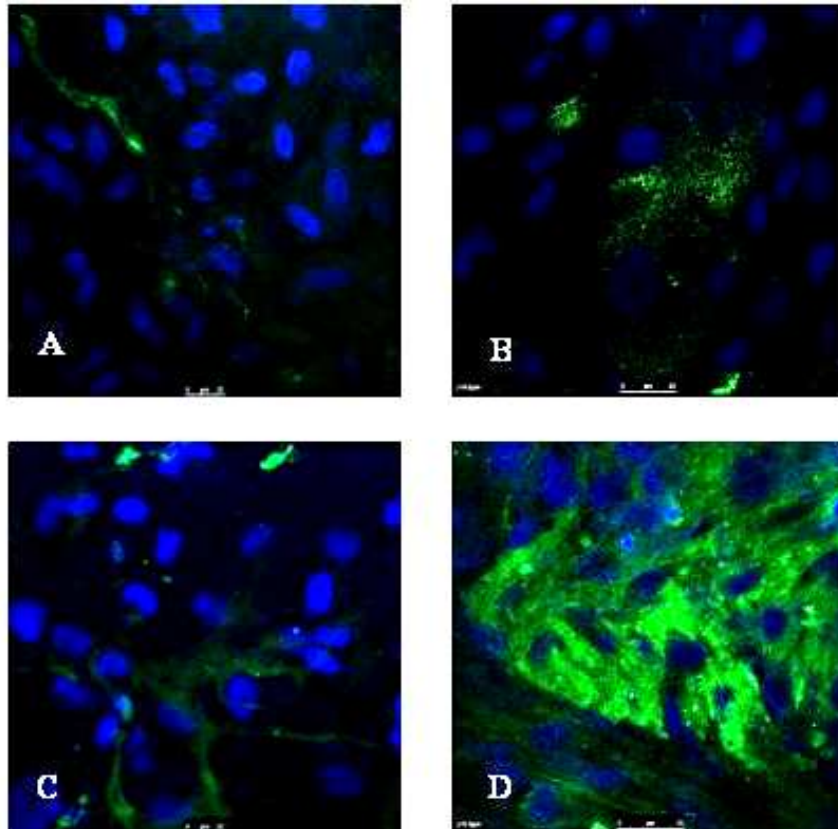


Figura 13: Caratterizzazione mediante immunofluorescenza dell'espressione di CK19 dopo 7 (B) e 14 giorni (D) dall'induzione colangiocitaria. In A e C sono riportati i corrispondenti controlli indifferenziati. Ingrandimento: X630.

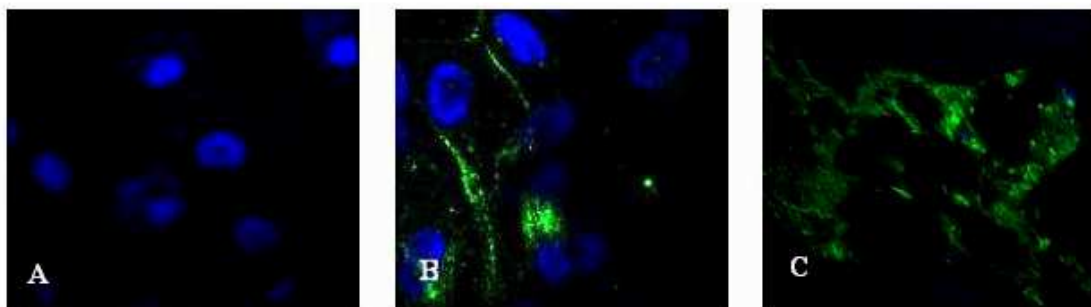


Figura 14: Caratterizzazione mediante immunofluorescenza dell'espressione di GGT-1 dopo 7 (B) e 14 giorni (C) dall'induzione colangiocitaria. (A) Controllo indifferenziato. Ingrandimento: X630.

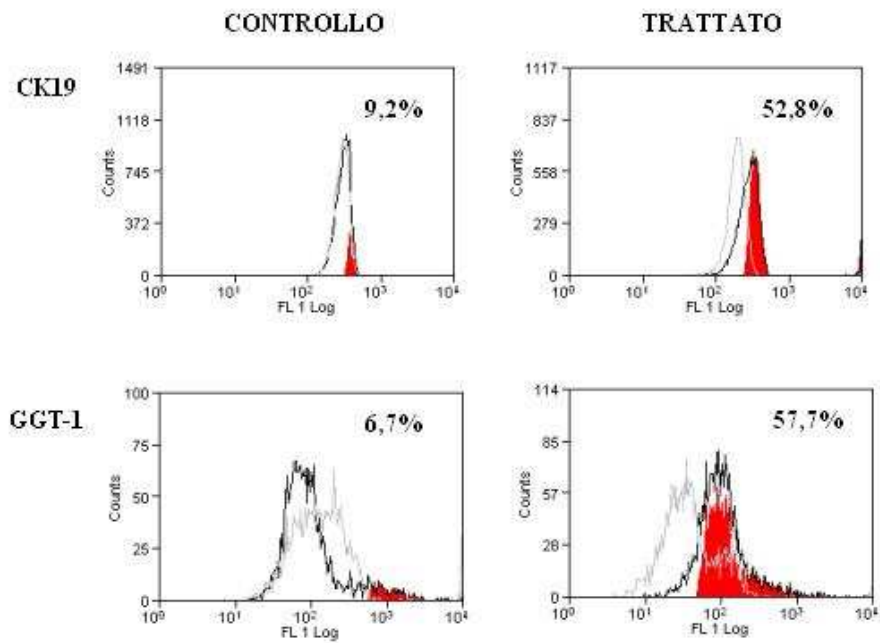


Figura 15: Valutazione mediante citofluorimetria dell'espressione di CK19 e GGT-1 nelle cellule CCO trattate e non trattate con terreno induttivo colangiocitario. (Profilo grigio: controllo isotipico; profilo nero: trattato con anticorpo primario di interesse; profilo rosso: cellule positive rispetto al controllo).

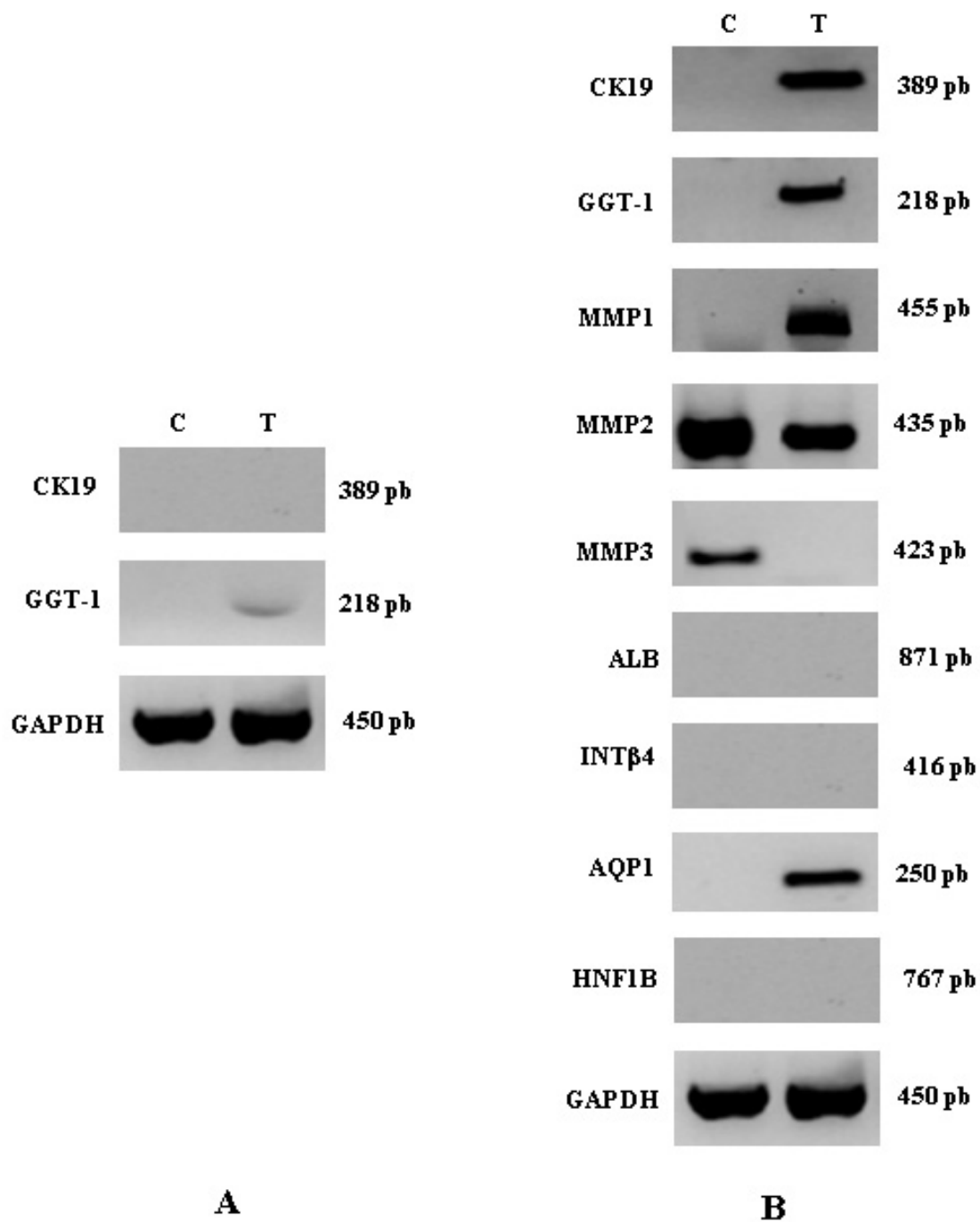


Figura 16: Studio di espressione mediante RT-PCR su cellule CCO (A) incapsulate in matrice MATCO o (B) seminate su *coating* di collagene di tipo 1 e matrigel. (C): Controllo indifferenziato; (T): trattato differenziato dopo 7 giorni dall'induzione. In parallelo, è stata valutata l'espressione del gene *housekeeping* GAPDH. Gli amplificati sono stati visualizzati su gel d'agarosio preparato al 2%.

DISCUSSIONE

Il fegato è un organo che possiede una elevata capacità rigenerativa (Lagasse *et al.*, 2000) e gli epatociti sono le cellule maggiormente implicate nei processi di recupero dell'integrità strutturale e funzionale epatica. E' stato dimostrato che oltre agli epatociti endogeni, intervengono al processo rigenerativo i progenitori epatici HPC o *cellule ovali*, che, localizzate nei canali di Hering (Forbes *et al.*, 2002), mostrano elevata capacità proliferativa e differenziativa in senso epatocitario e colangiocitario.

In numerose patologie epatiche acute e croniche di fase avanzata, tali "meccanismi riparatori fisio-patologici" non sono sufficienti a garantire una rigenerazione ed una funzionalità epatica compatibile con la vita. In tali casi, il trapianto di fegato rappresenta l'opzione terapeutica elettiva. Le malattie colestatiche croniche congenite o acquisite (*Cirrosi Biliare Primitiva, Colangite Sclerosante, atresia pediatrica delle vie biliari*) rappresentano nel loro insieme una delle principali indicazioni al trapianto di fegato. I colangiociti sono le cellule epiteliali dell'albero biliare e rappresentano gli elementi coinvolti nel danno insorgente nel corso delle colangiopatie (Boyer, 1997; Roberts *et al.*, 1997; Alvaro, 1999). Tali affezioni determinano nel parenchima epatico, da un punto di vista morfologico, una progressiva scomparsa dei dotti biliari intralobulari e l'insorgenza di un meccanismo di compenso da parte dei colangiociti che, con la loro attivazione in senso proliferativo, tentano di contrastare la lenta ma inesorabile progressione della patologia verso lo stadio finale di *duttopenia* ovvero scomparsa dei dotti (Desmet *et al.*, 1998; Alvaro *et al.*, 2000). Il corso di tali patologie è caratterizzato, dunque, da un iniziale equilibrio tra il danno ed il depauperamento dei dotti biliari e la successiva proliferazione compensatoria dei dotti residui, fino allo stadio terminale, nel corso del quale il verificarsi di un'inefficace proliferazione non bilancia più la perdita dei dotti biliari. In tale ottica, recentemente, sono stati messi in atto numerosi studi indirizzati a comprendere i meccanismi implicati nella regolazione della proliferazione colangiocitaria (Alvaro *et al.*, 2000) mediante l'impiego di modelli sperimentali quale quello che prevede la legatura della via biliare principale (BDL) nel ratto.

Nell'ultimo ventennio, nuove ed innovative strategie terapeutiche basate sull'impiego di cellule staminali multipotenti sono state individuate e proposte in chirurgia epatica. In particolare, le cellule staminali adulte isolate da fonti alternative al midollo osseo quali il sangue cordonale (Broxmeyer *et al.*, 1989) ed il cordone ombelicale (Liang *et al.*, 2012) hanno dimostrato di rispondere *in vitro* agli stimoli differenziativi in senso

epatocitario acquisendo specifiche caratteristiche morfologico-funzionali. In letteratura non risultano, al momento, studi che dimostrino la capacità delle cellule staminali isolate da cordone ombelicale a differenziarsi in cellule simil colangiociti. 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 quali quella adipogenica, osteogenica e condrogenica. In questo lavoro di tesi, è stata definita una procedura sperimentale per l'isolamento di cellule fibroblastoidi da gelatina di Wharton, dotate di buona capacità espansiva e differenziativa (CCO). In accordo con le linee guida internazionali di terapia cellulare, le cellule CCO 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. La caratterizzazione morfologica, immunofenotipica e differenziativa ne ha dimostrato la natura non emopoietica e le proprietà comuni con le cellule staminali mesenchimali (MSC) (Liu *et al.*, 2004). Infatti, le cellule CCO crescono *ex vivo* aderenti alla plastica, mostrano una forma fusata, esprimono molecole di adesione quali CD44, CD105, CD90 e, se adeguatamente stimolate, si differenziano in cellule simil adipociti, osteociti e condrociti.

E' noto che i progenitori epatici detti cellule ovali (Kon *et al.*, 2009) esprimono marcatori biliari quali CK7, CK19, marcatori epatocitari quali α -fetoproteina e proteine di membrana quali CD34, cKit e CD90. Nel compartimento staminale epatico, sono state identificate cellule di piccole dimensioni (*small hepatocytes/SH*) che presentano caratteristiche di progenitori epatocitari. Le cellule SH sono dotate di proprietà di crescita clonale e differenziano su un substrato di MatrigelTM ovvero un estratto di membrana basale di sarcoma di ratto. Kon *et al.* (2009) hanno osservato che le cellule SH presentano un aumento di espressione del marcatore CD44 durante la crescita espansiva ed una riduzione in seguito a stimolazione differenziativa. Inoltre, in un modello animale di danno epatico indotto mediante somministrazione di galattosamina, le popolazioni CD90 positive attivate hanno mostrato la potenzialità a differenziare verso la linea epatocitaria ed epiteliale biliare.

Le cellule CCO sono caratterizzate da un'alta espressione del CD90 (82,4%) similmente alle cellule epatiche progenitrici. La staminalità della popolazione incrementa durante la subcultura come dimostrato dal fatto che i campioni CCO si arricchiscono di elementi positivi al CD44 (6,2%), CD133 (18,6%), ckit (1,9%). L'analisi di espressione mediante RT-PCR ha dimostrato che sono attive nell'espressione di mRNA per le metalloproteinasi 2 e 3, enzimi coinvolti nella degradazione del collagene di tipo IV e III, che sono componenti costitutivi della membrana basale. Recentemente è stato dimostrato che tale enzima, unitamente ad altre metalloproteinasi, è tipicamente espresso nelle popolazioni cellulari staminali mesenchimali che si muovono dal letto vasale ai tessuti perivascolari o viceversa (Ries *et al.*, 2007). Secondo alcuni autori, le cellule staminali mesenchimali presenti a livello del sangue cordonale, dopo attraversamento della membrana basale, si localizzerebbero nella gelatina di Wharton costituendo le nicchie staminali. (Farias *et al.*, 2011).

Uno studio pilota di differenziamento colangiocitario su piastre non condizionate ha evidenziato che le popolazioni cellulari CCO sono responsive all'induzione, come dimostrato, mediante immunofluorescenza, dall'espressione di CK19, filamenti intermedi del citoscheletro e gamma-glutamilttransferasi 1. Il GGT-1 è un enzima eterodimerico di membrana implicato nella biosintesi proteica; esso catalizza il trasferimento di un gruppo gamma glutamile da un gamma glutamil peptide ad un amminoacido o ad un altro peptide. A tal fine l'enzima utilizza il glutatione quale substato per la sintesi di nuovi amminoacidi. La gamma-glutamilttransferasi risulta preferenzialmente espressa a livello tissutale in organi che manifestano una intensa attività secretiva quali il rene, il fegato, la ghiandola mammaria, l'apparato gastrointestinale, l'epitelio cerebro-vascolare ed i periciti.

I tradizionali sistemi di coltura bidimensionali basati sulla crescita cellulare in monostrato sono attualmente considerati limitati in quanto non ricreano quel complesso gioco di interazioni cellula-cellula e cellula-matrice che *in vivo* sono essenziali per la regolazione dei processi proliferativi e differenziativi.

E' noto che il microambiente cellulare, ovvero quel complesso di fattori strutturali che costituiscono la matrice extracellulare, gioca un ruolo essenziale nella traduzione a livello intracellulare dei segnali esterni induttivi. Le proteine della matrice extracellulare (ECM) modulano la differenziazione cellulare, regolando un adeguato scambio diffusivo dei segnali solubili inibitori e/o differenziativi. La loro modulazione permette il rilascio delle adesioni cellula-cellula ed il rimodellamento dei componenti cellulari

stessi, cambiamenti questi, necessari per la riorganizzazione cellulare e l'ottenimento dell'ambiente idoneo a promuovere l'espressione dei geni specifici. Nella ricerca di base della morfogenesi duttale biliare, Tanimizu *et al.* (2007) hanno dimostrato che gli epatoblasti HPPL, dopo incapsulazione in una matrice preparata con collagene 1 e MatrigelTM hanno acquisito una polarità apico-basale similmente ai colangiociti e si sono organizzati a formare strutture cistali dotate di un lume centrale pervio. All'analisi di immunofluorescenza, le cellule HPPL incapsulate sono risultate positive all'espressione di CK19 e dell'integrina $\alpha 6$ nei domini basolaterali. Dopo incapsulazione nella matrice MATCO, le popolazioni CCO hanno dimostrato una limitata potenzialità morfogenetica, come evidenziato dalla mancata organizzazione cellulare in cisti, dall'assenza di mRNA per il CK19 ed un basso livello di espressione del GGT-1. Al contrario, la risposta delle cellule CCO alla stimolazione con fattori colangiocitari e alla crescita su *coating* di matrice MATCO è risultata specifica. Infatti, all'analisi mediante RT-PCR, le colture differenziate hanno mostrato positività, rispetto al controllo indifferenziato, all'espressione di mRNA per CK19, GGT-1, MMP1 e AQP1. Il mantenimento dell'espressione della MMP2 rispetto alla MMP3 nei campioni indotti suggerisce che le cellule CCO siano attive in una specifica attività di rimodellamento della matrice di supporto mentre l'assenza di espressione dell'ALB lascia pensare ad un indirizzamento specifico delle cellule CCO verso la linea colangiocitaria. Inoltre, la mancata organizzazione cellulare in cisti ha probabilmente limitato l'espressione di INT β 4, una integrina di membrana coinvolta nella mediazione cellula-matrice extracellulare.

CONCLUSIONI

Lo studio ha dimostrato che, mediante una procedura standardizzata, è possibile isolare da gelatina di Wharton una popolazione cellulare staminale multipotente, dotata di caratteristiche immunofenotipiche stabili, potenziale di crescita *in vitro* a lungo termine e capace di rispondere allo stimolo differenziativo colangiocitario in un sistema di coltura bidimensionale. Sebbene all'analisi di morfogenesi le cellule CCO non abbiano mostrato la potenzialità di formare strutture tubulari simili, probabilmente per l'inadeguata struttura tridimensionale della matrice utilizzata, l'espressione di RNA messaggero per marcatori tipici di linea colangiocitaria osservata sulle colture differenziate in presenza di collagene di tipo 1 e MatrigelTM conferma la plasticità delle popolazioni cordonali isolate verso la linea epiteliale biliare. L'impianto *in vivo* in un modello animale di danno colangiocitario consentirà la valutazione del reale potenziale differenziativo delle popolazioni CCO.

BIBLIOGRAFIA

Al Battah F, De Kock J, Vanhaecke T, Rogiers V. Current status of human adipose-derived stem cells: differentiation into hepatocyte-like cells. *ScientificWorld Journal* 2011; 11: 1568-81.

Alagille D, Estrada A, Hadchouel M, Gautier M, Odievre M., Dommergues J P. Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia): review of 80 cases. *J Pediatr* 1987; 110: 195-200.

Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406(6793): 257.

Alpini G, Elias I, Glaser S, Rodgers R, Phinzy J, Robertson W, *et al.* Gamma interferon inhibits cholangiocyte proliferation and secretin-induced ductal secretion in a novel murine model of cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 27: 371–80.

Alpini G, Glaser S, Ueno Y, Pham L, Podila P, Caligiuri A, *et al.* Heterogeneity of the proliferative capacity of rat cholangiocytes following bile duct ligation. *Am J Physiol* 1998; 274: G767–75.

Alpini G, Lenzi R, Zhai W-R, Liu MH, Slott PA, Paronetto F, *et al.* Isolation of a nonparenchymal liver cell fraction enriched in cells with biliary epithelial phenotypes. *Gastroenterology* 1989; 97: 1248–60.

Alpini G, Phillips JO, LaRusso NF. The biology of the biliary epithelia. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, editors. *The Liver: Biology and Pathobiology*, 3rd edn. New York: Raven Press 1994; p. 623–54.

Alpini G, Ulrich CD 2nd, Phillips JO, Pham LD, Miller LJ, LaRusso NF. Upregulation of secretin receptor gene expression in rat cholangiocytes after bile duct ligation. *Am J Physiol* 1994; 266: G922-928.

Alvaro D, Alpini G, Jezequel AM, Bassotti C, Francia C, Fraioli F, Romeo R, Marucci L, Le Sage G, Glaser SS, Benedetti A. Role and mechanisms of action of acetylcholine in the regulation of rat cholangiocyte secretory functions. *J Clin Invest* 1997 a; 100: 1349-1362.

Alvaro D, Benedetti A, Marucci L, Delle Monache M, Monterubbianesi R, Di Cosimo E, Perego L, Macarri G, Glaser S, Le Sage G, Alpini G. The function of alkaline phosphatase in the liver: regulation of intrahepatic biliary epithelium secretory activities in the rat. *Hepatology* 2000; 32: 174-184.

Alvaro D, Mennone A, Boyer JL. Role of kinases and phosphatases in the regulation of fluid secretion and Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997 b; 273: G303-13.

Alvaro D. Biliary epithelium: a new chapter in cell biology. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999 Jan-Feb; 31(1): 78-83.

Baiocchi L, LeSage G, Glaser S, Alpini G. Regulation of cholangiocyte bile secretion. *J Hepatol* 1999; 31: 179-191.

Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the Stem Cell Factor Receptor *c-kit* in Normal and Diseased Pediatric Liver: Identification of a Human Hepatic Progenitor Cell?. *Hepatology* 1999; 30: 112-117.

Benedetti A, Bassotti C, Rapino K, Marucci L, Jezequel AM. A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol* 1996; 24: 335-342.

Boyer JL. Isolated hepatocyte couplets and bile duct units--novel preparations for the in vitro study of bile secretory function. *Cell Biology and Toxicology* 1997; 13: 289-300.

Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA. Human umbilical cord blood as a potential source of

transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(10): 3828-32.

Caccia G, Ekema G, Falchetti D, Pedersini P. Atresia delle vie biliari: attualità e prospettive *Prospettive in pediatria* 2004; 34: 39-43.

Caligiuri A, Glaser S, Rodgers R, Phinzy JL, Robertson W, Papa E, *et al*. Endothelin 1 inhibits secretin-stimulated ductal secretion by interacting with ETA receptors on large cholangiocytes. *Am J Physiol* 1998; 275: G835-46.

Chang CH, Chey WY, Erway B, Coy DH, Chang TM. Modulation of secretin release by neuropeptides in secretin-producing cells. *Am J Physiol* 1998; 275: G192-202.

Clarke LL, Grubb BR, Yankaskas JR, Cotton CU, McKenzie A, Boucher RC. Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in *Cftr(-/-)* mice. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 479-83.

Colonna JO, Shaked A, Gomes AS, Colquhoun SD, Jurim O, Mc Diarmid SV, *et al*. Biliary strictures complicating liver transplantation. *Ann Surg* 1992; 216: 344-352.

Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ. Human hepatic stem-like cells isolated using *c-kit* or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 2001 Feb; 120(2) :534-44.

D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Knechtle SJ, Odorico JS, Becker YT, Musat A, *et al*. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors. *Surgery* 2000; 128: 579-588.

Desmet VJ. Ludwig symposium on biliary disorders--part I. Pathogenesis of ductal plate abnormalities. *Mayo Clin Proc* 1998; 73: 80-89.

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: 315-317.

Fabris L, Strazzabosco M, Crosby HA, Ballardini G, Hubscher SG, Kelly DA, Neuberger JM, Strain AJ, Joplin R. Characterization and isolation of ductular cells coexpressing neural cell adhesion molecule and Bcl-2 from primary cholangiopathies and ductal plate malformations. *American Journal of Pathology* 2000; Vol. 156, No. 5.

Farias VA, Linares-Fernández JL, Peñalver JL, Payá Colmenero JA, Ferrón GO, Duran EL, Fernández RM, Olivares EG, O'Valle F, Puertas A, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar JM. Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties. *Placenta* 2011 Jan; 32(1): 86-95.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279(5356): 1528-30.

Fitz JG, Basavappa S, McGill J, Melhus O, Cohn JA. Regulation of membrane chloride currents in rat bile duct epithelial cells. *J Clin Invest* 1993; 91: 319–28.

Forbes SJ, Vig P, Poulsom R, Alison MR, Wright NA. Bone marrow-derived liver stem cells: their therapeutic potential. *Gastroenterology* 2002 Aug; 123(2): 654-5.

Francis H, Glaser S, Alvaro D, Taffetani S, Marucci L, Benedetti A, Ueno Y, Marzioni M, LeSage G, Venter J, Baumann B, Phinizy JL, Alpini G. The α -2 adrenergic receptor agonist, UK14,304, inhibits secretin-stimulated ductal secretion of bile duct ligated (BDL) rats by activation of the G-protein $G_{\alpha i}$. *Hepatology* 2003; 38: A1088.

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(4): 393-403.

Friedenstein AJ, Goskaja UF, Julagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4: 267-274.

Gerber MA, Thung SN, Shen S, Stromeyer FW, Ishak KG. Phenotypic characterization of hepatic proliferation. Antigenic expression by proliferating epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis, and nodular transformation of the liver. *Am J Pathol* 1983; 110(1): 70-4.

Glaser S, Alvaro D, Roskams T, Phinizy JL, Stoica G, Francis H, Ueno Y, Barbaro B, Marzioni M, Mauldin J, Rashid S, Mancino MG, LeSage G, Alpini G. Dopaminergic inhibition of secretin-stimulated choleresis by increased PKC-gamma expression and decrease of PKA activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G683-694.

Glaser S, Francio H, DeMorrow S, LeSage G, Fava G, Marzioni M, Ventre J, Alpini G. Heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *World J Gastroenterol* 2006; 12(22): 3523-3536.

Glaser S, Rodgers R, Phinizy JL, Robertson W, Lasater J, Caligiuri A, Tretjak Z, LeSage GD, Alpini G. Gastrin inhibits secretin-induced ductal secretion by interaction with specific receptors on rat cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997; 273: G1061-70.

Grief F, Broonsther OL, Van Thiel DH, Casavilla A, Iwatsoki S, Tzakis A, *et al.* The incidence, timing and management of biliary tract complication after orthotopic liver transplantation *Ann Surg* 1994; 219: 40-45.

He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells* 2007; 25: 69-77.

Ishii M, Vroman B, LaRusso NF. Morphologic demonstration of receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by isolated bile duct epithelial cells. *Gastroenterology* 1990; 98: 1284-1291.

Jones AL, Schmucker DL, Renston RH, Murakami T. The architecture of bile secretions. A morphological perspective of physiology. *Dig Dis Sci* 1980; 25:609–29.

Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alpini G. Regulation of cholangiocyte bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G612-625.

Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G. Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology* 2000; 31: 555-561.

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.

Kon J, Ichinohe N, Ooe H, Chen Q, Sasaki K, Mitaka T. Thy1-positive cells have bipotential ability to differentiate into hepatocytes and biliary epithelial cells in galactosamine-induced rat liver regeneration. *Am J Pathol* 2009 Dec; 175(6): 2362-71.

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229–1234.

Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology* 2004 Nov; 127(5): 1565-77.

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.

Lemaigre FP. Development of the biliary tract. *Mech Dev* 2003; 120: 81–87.

LeSage G, Glaser S, Gubba S, Robertson WE, Phinizy JL, Lasater J, *et al.* Regrowth of the rat biliary tree after 70% partial hepatectomy is coupled to increased secretin-induced ductal bile secretion. *Gastroenterology* 1996; 111: 1633–44.

LeSage GD, Benedetti A, Glaser S, Marucci L, Tretjak Z, Caligiuri A, *et al.* Acute carbon tetrachloride feeding selectively damages large, but not small, cholangiocytes from normal rat liver. *Hepatology* 1999; 29: 307–19.

Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J *et al.* Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 1997; 16: 243-251.

Liang XJ, Chen XJ, Yang DH, Huang SM, Sun GD, Chen YP. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells by hTERT gene transfection in vitro. *Cell Biol Int* 2012 Feb 1; 36(2): 215-21.

Libbrecht L, Cassiman D, Desmet V, Roskams T. Expression of neural cell adhesion molecule in human liver development and in congenital and acquired liver diseases. *Histochem Cell Biol* 2001; 116: 233–239.

Libbrecht L, Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2002 Dec; 13(6): 389-96.

Liu J, Hu Q, Wang Z, Xu C, Wang X, *et al.* Autologous stem cell transplantation for myocardial repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H501-H511.

Ludwig J. New concepts in biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1987; 7: 293-301.

Marinelli RA, Pham L, Agre P, LaRusso NF. Secretin promotes osmotic water transport in rat cholangiocytes by increasing aquaporin-1 water channels in plasma membrane. Evidence for a secretin-induced vesicular translocation of aquaporin-1. *J Biol Chem* 1997; 272: 12984–8.

Marinelli RA, Pham LD, Tietz PS, LaRusso NF. Expression of aquaporin-4 water channels in rat cholangiocytes. *Hepatology* 2000; 31: 1313-1317.

Marinelli RA, Tietz PS, Pham LD, Rueckert L, Agre P, LaRusso NF. Secretin induces the apical insertion of aquaporin-1 water channels in rat cholangiocytes. *Am J Physiol* 1999; 276: G280-G286.

Martinez-Anso E, Castillo JE, Diaz J, Medina JE, Prieto J. Immunohistochemical detection of Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger in human liver. *Hepatology* 1994; 19: 1400-1406.

Marzioni M, Glaser S, Francis H, Marucci L, Benedetti A, Alvaro D, Taffetani S, Ueno Y, Roskams T, Phinzy JL, Venter J, Fava G, LeSage GD, Alpini G. Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology* 2005; 128: 121-137.

McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB. NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 169-173.

Merion RM, Pelletier SJ, Goodrich N, Englesbe MJ, Delmonico FL. Donation after cardiac death as a strategy to increase deceased donor liver availability. *Ann Surg* 2006; 244: 555-562.

Mezey E, Chandross KJ. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol* 2000; 405: 297-302.

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.

Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 1991; 14:551-566.

Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 1991; 14: 551-566.

Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110: 3499-3506.

Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Agre P. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7275-7279.

Nishida S, Endo N, Yamagiwa H *et al.* Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab* 1999; 17: 171-177.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410(6829): 701-705.

Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 2003; 112: 535-548.

Popper H. The relation of mesenchymal cell products to hepatic epithelial systems. *Prog Liver Dis* 1990; 9: 27-38.

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. *Journal of Autoimmunity* 2008; 30: 151-162.

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 May 1; 109(9): 4055-63.

Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology* 1997 Jan; 112(1): 269-79.

Roberts SK, Yano M, Ueno Y, Pham L, Alpini G, Agre P, LaRusso NF. Cholangiocytes express the aquaporin CHIP and transport water via a channel-mediated mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 13009-13013.

Roskams T, van den Oord JJ, De Vos R, Desmet VJ. Neuroendocrine features of reactive bile ductules in cholestatic liver disease. *Am J Pathol* 1990 Nov; 137(5): 1019-25.

Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor Cells in Diseased Human Liver. *Semin Liver Dis* 2003; 23(4): 385-396

Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw AS, Hytioglou P, Knisely AS, Kojiro M, Lefkowitch JH, Nakanuma Y, Olynyk JK, Park YN, Portmann B, Saxena R, Scheuer PJ, Strain AJ, Thung SN, Wanless IR, West AB. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 2004; 39: 1739–1745.

Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 1993; 81: 1679-1690.

Ruck P, Xiao JC, Pietsch T, Von Schweinitz D, Kaiserling E. Hepatic stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval cell associated antigens detected by OV-1 and OV-6. *Histopathology*. 1997 Oct; 31(4): 324-9.

Sanchez-Urdazpal L, Batts KP, Gores GJ, Moore SB, Sterioff S, Wiesner RH, *et al*. Increased bile duct complications in liver transplantation across the AOB barrier. *Ann Surg* 1993; 218: 152-158.

Schaffner F, Popper H. Electron microscopic studies of normal and proliferated bile ductules. *Am J Pathol* 1961; 38: 393–410.

Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001; 33: 738–750.

Seta N, Kuwana M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J Med* 2007; 56: 41-47.

Snykers S, De Kock J, Tamara V, Rogiers V. Hepatic differentiation of mesenchymal stem cells: in vitro strategies. *Methods Mol Biol* 2011; 698: 305-14.

Stenderup K, Justuesen J, Clausen C *et al.* Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003; 33: 919-926.

Strazzabosco M, Fabris L, Spirli C. Pathophysiology of cholangiopathies. *J Clin Gastroenterol*, 2005 Apr; 39(4 Suppl 2): S90-S102. Review.

Strazzabosco M, Joplin R, Zsembery A, Wallace L, Spirli C, Fabris L, Granato A, Rossanese A, Poci C, Neuberger JM, Okolicsanyi L, Crepaldi G. Na-dependent and -independent Cl⁻/HCO₃⁻ exchange mediate cellular HCO₃⁻ transport in cultured human intrahepatic bile duct cells. *Hepatology* 1997; 25: 976-985.

Strazzabosco M, Mennone A, Boyer JL. Intracellular pH regulation in isolated rat bile duct epithelial cells. *J Clin Invest* 1991; 87: 1503–12.

Strazzabosco M, Spirli C, Okolicsanyi L. Pathophysiology of the intrahepatic biliary epithelium. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000 Mar; 15(3): 244-53. Review.

Tanimizu N, Miyajima A, Mostov KE. Liver Progenitor Cells Develop Cholangiocyte-Type Epithelial Polarity in Three-dimensional Culture. *Molecular Biology of the Cell* April 2007; Vol 18: 1472–1479.

Tavoloni N. The intrahepatic biliary epithelium: an area of growing interest in hepatology. *Sem Liv Dis* 1987; 7: 280-292.

Tung BY, Kimmey MB. Biliary complications of orthotopic liver transplantation. *Dig Dis* 1999; 17: 133-144.

Van Den Heuvel MC, Slooff MJ, Visser L, Muller M, De Jong KP, Poppema S, Gouw AS. Hepatology. Expression of anti-OV6 antibody and anti-N-CAM antibody along the biliary line of normal and diseased human livers 2001 Jun; 33(6): 1387-93.

Verkman AS. Mechanisms and regulation of water permeability in renal epithelia. *Am J Physiol* 1989; 257: C837-50.

Vosough M, Moslem M, Pournasr B, Baharvand H. Cell-based therapeutics for liver disorders. *Br Med Bull* 2011; 100: 157-72.

Walsh JH, Mayer EA. Gastrointestinal hormones. In: Sleisenger MH, Fordtran JS, editors. *Gastrointestinal Disease*, 5th edn. London, UK: WB Saunders Company Ltd; 1993; p. 18-44.

Yokoyama HO, Wilson ME, Tsuboi KK, Stowell RE. Regeneration of mouse liver after partial hepatectomy. *Cancer Res* 1953; 13: 80-85.

Zeng W, Lee MG, Muallem S. Membrane-specific regulation of Cl⁻ channels by purinergic receptors in rat submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 32956-65.

Zsembery A, Spirli C, Granato A, LaRusso NF, Okolicsanyi L, Crepaldi G, *et al.* Purinergic regulation of acid/base transport in human and rat biliary epithelial cell lines. *Hepatology* 1998; 28: 914-20.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-4295.