



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Scienze Farmaceutiche**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA E MEDICINA**

**DELLA RIGENERAZIONE**

**INDIRIZZO IN INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI**

**XX CICLO**

**TESI DI DOTTORATO**

***Studio in vitro e in vivo della capacità differenziativa di cellule CD105 positive da cordone ombelicale e da sangue cordonale umano***

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

**Dottorando:** Dott. Michela Turetta

31 gennaio 2008





## LEGENDA

|                  |   |
|------------------|---|
| AFP              | alpha fetoprotein   |
| ASC              | Adult Stem Cells  |
| BMP              | Bone Morphogenic Protein  |
| BSA              | Bovine Serum Albumin  |
| CCl <sub>4</sub> | tetracloruro di carbonio  |
| CFU-F            | Colony Forming Units- Fibroblasts   |
| Cy5              | Cyanine 5   |
| DAB              | diaminobenzidine  |
| DAPI             | 4',6-diamidino-2-phenylindole   |
| DEPC             | diethylpyrocarbonate  |
| ECM              | Extracellular matrix  |
| EDTA             | ethylenediaminetetraacetate   |
| EGF              | Epidermal Growth Factor   |
| EpSC             | Epitelial Stem Cells  |
| ESC              | Embryonic Stem Cells  |
| FGF              | Fibroblast Growth Factor  |
| FGF-4            | Fibroblast Growth Factor 4  |
| FITC             | fluorescein isothiocyanate  |
| GAPDH            | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  |
| GVHD             | Graft Versus Host Disease   |
| HEPES            | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid  |
| HGF              | Hepatocyte Growth Factor  |
| HNF4-alfa        | Hepatocyte Nuclear Factor 4 alfa  |
| HSC              | Hematopoietic Stem Cells  |
| ICM              | Inner Cell Mass   |
| ISC              | Intestinal Stem Cells   |
| ITS              | Insulin, Transferrin and Sodium selenite  |
| KDR              | Kinase insert domain protein receptor   |
| LIF              | Leukemia Inhibitory Factor  |
| LPC              | Liver Progenitor Cells  |
| MAPC             | Multipotent Adult Progenitor Cells  |
| MIAMI cells      | Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible cells  |
| MNC              | Mononuclear cells   |
| MSC              | Mesenchymal Stem Cells  |
| MTS              | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; |
| NADPH            | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate   |
| NADH             | Nicotinamide adenine dinucleotide   |
| NGFR             | Nerve Growth Factor Receptor  |
| NSC              | Neural Stem Cells   |
| OC-2             | Oval Cell 2   |
| Oct-4            | Octamer-binding transcription factor 4  |
| OSM              | Oncostatine M   |
| OV-6             | rat oval cell marker 6  |
| PBS              | Phosphate Buffer Solution   |
| PCR              | Polymerase Chain Reaction   |
| PDL              | Population Doubling Level   |
| PPAR             | Peroxisome Proliferator Activated Receptors   |



RNA Ribonucleic Acid  
RPE R-phycoerythrin  
RS-1 Recycling Stem cells 1  
RS-2 Recycling Stem cells 2  
SH2 Src homology domain 2  
SMA Smooth muscle actin  
Sox 2 SRY-related HMG-box gene 2  
Sry Sex-determining region Y  
SSEA-3 Stage-Specific Embryonic Antigen 3  
SSEA-4 Stage-Specific Embryonic Antigen 4  
TGF-beta Transforming Growth Factor beta  
TRA-1-60 Tumor Rejection Antigen 1-60  
TRA-1-81 Tumor Rejection Antigen 1-81  
UC Umbilical Cord  
UCB Umbilical Cord Blood

## RIASSUNTO

Le cellule staminali recentemente sono assunte all'attenzione mondiale in quanto potenzialmente utilizzabili nella cura di un elevato numero di malattie diverse; inoltre, prestandosi a interventi di manipolazione, rappresentano un promettente strumento per la terapia genica. Tra i vari tipi di cellule staminali, le cellule mesenchimali risultano particolarmente interessanti, in quanto possano essere isolate non solo da vari tipi di tessuti adulti, ma anche da tessuti di derivazione fetale, quali cordone, sangue cordonale e placenta, e possono essere indotte a differenziarsi in numerosi tipi cellulari diversi. Tuttavia, soprattutto per quanto riguarda le cellule isolate da tessuti di derivazione fetale, non è ancora completamente chiarito il reale potenziale proliferativo e differenziativo.

In questo lavoro sono stati studiati il sangue cordonale e il cordone ombelicale come fonti di cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSC). A questo scopo, da entrambe le fonti è stata isolata una sottopopolazione di cellule esprimenti CD105, un'antigene di superficie considerato uno dei principali marcatori delle MSC, e se ne è valutata la capacità proliferativa e differenziativa. Quest'ultima è stata testata *in vitro* mediante utilizzo di supporti (sintetici e naturali) e/o di specifici fattori induttivi.

Inoltre, in prospettiva di un possibile utilizzo clinico delle MSC, si è valutata la capacità di engraftment di tali cellule *in vivo* in un modello animale di danno epatico indotto.

La dimostrazione della plasticità della sottopopolazione di cellule CD105 positive da sangue cordonale e da cordone ombelicale non solo verso cellule di linea mesodermica (osteogenica ed adipogenica), ma anche verso cellule di linea endodermica (epatogenica) può aprire la strada all'applicazione di tali cellule nella medicina rigenerativa. Infatti, essendo completamente accessibili, privi di qualsiasi implicazione etica e di rischio nella raccolta, il sangue cordonale e il cordone ombelicale potrebbero diventare due fonti di elezione per l'ottenimento di cellule staminali multipotenti.

## SUMMARY

Stem cells have become worldwide interesting because they can be potentially employed for the treatment of many different types of diseases; moreover, they can be manipulated representing a promising tool for genetic therapy. Mesenchymal stem cells (MSC) can be obtained from several adult tissues and from fetal-derived tissues, such as umbilical cord, umbilical cord blood and placenta, and they can be induced to differentiate into several cell types. Nevertheless, proliferation and differentiation potential of these cells has not yet been explained; particularly differentiative potential of fetal-derived tissue cells remains to be investigated.

In this study, umbilical cord blood (UCB) and umbilical cord (UC) have been evaluated as potential sources of MSC. For this purpose, a subpopulation of cells expressing CD105, a membrane antigen well known as marker of MSC, has been isolated from UCB and UC. The proliferative potential and plasticity of CD105-positive cells have been investigated *in vitro* by means of synthetic or natural supports and/or using differentiative media containing inductive factors. Finally, in view of clinical applications, the engraftment of these cells in a model of chemical-induced liver injury has been verified.

Collectively, our data have demonstrated *in vitro* the plasticity of UCB and UC CD105-positive cells not only towards mesodermal lineage cells (osteogenic and adipogenic lineage) but also towards endodermal lineage cells (hepatogenic lineage). These results suggest that CD105-positive cells could be usefully employed in regenerative medicine. In fact, due to availability, safety in the collection and lack of ethical issues, UCB and UC may become elective sources of multipotent MSC.

# INDICE

|   |         |
|---|---------|
| <b>INTRODUZIONE</b>   | pag. 1  |
| <u>Cellule staminali e ingegneria tissutale</u>                                       | pag. 1  |
| <u>Cellule staminali embrionali</u>   | pag. 2  |
| <u>Cellule staminali dell'adulto</u>  | pag. 3  |
| <u>Cellule staminali mesenchimali</u>   | pag. 5  |
| <i>Nicchia delle MSC</i>  | pag. 6  |
| <i>Marcatori delle MSC</i>  | pag. 7  |
| <i>Potenziale di self-renewal delle MSC</i>   | pag. 9  |
| <i>Potenziale differenziativo delle MSC</i>   | pag. 9  |
| <u>Sangue cordonale e cordone ombelicale umano<br/>    come fonti di MSC</u>          | pag. 12 |
| <u>MSC e fegato</u>   | pag. 14 |
| <br>  |         |
| <b>MATERIALI E METODI</b>   | pag. 17 |
| <u>Fonte dei campioni di UCB e UC umano</u>   | pag. 17 |
| <u>Colture primarie di cellule provenienti da UCB</u>                                 | pag. 17 |
| 1. <i>Isolamento e coltura di MNC da UCB</i>  | pag. 17 |
| 2. <i>Population Doubling e Population Doubling Level</i>                             | pag. 17 |
| 3. <i>Caratterizzazione fenotipica mediante<br/>        immunofluorescenza</i>        | pag. 18 |
| <u>Colture di cellule CD105 positive da UCB</u>                                       | pag. 19 |
| 1. <i>Condizionamento di biglie magnetiche con anticorpo</i>                          | pag. 19 |
| 2. <i>Immunoseparazione</i>   | pag. 19 |
| 3. <i>Population Doubling e Population Doubling Level</i>                             | pag. 20 |
| 4. <i>Caratterizzazione fenotipica mediante<br/>        analisi citofluorimetrica</i> | pag. 20 |

|  |         |
|--|---------|
| 5. <i>Valutazione della presenza di cellule fetali nella sottopopolazione CD105 positiva mediante RT-PCR</i> | pag. 21 |
| <u><i>Estrazione di RNA con Trizol reagent (Gibco)</i></u>   | pag. 21 |
| <u><i>Retrotrascrizione di RNA estratto</i></u>  | pag. 22 |
| <u><i>Reazione di amplificazione</i></u>   | pag. 22 |
| <br>   |         |
| <u>Colture primarie di cellule provenienti da UC</u>   | pag. 23 |
| 1. <i>Isolamento e coltura di cellule da UC</i>  | pag. 23 |
| 2. <i>Caratterizzazione fenotipica mediante immunocitochimica</i>  | pag. 24 |
| <br>   |         |
| <u>Colture di cellule CD105 positive da UC</u>   | pag. 25 |
| <br>   |         |
| <u>Differenziazione adipogenica ed osteogenica <i>in vitro</i> di cellule CD105 positive da UCB e UC</u>     | pag. 25 |
| 1. <i>Induzione dei differenziamenti</i>   | pag. 25 |
| 2. <i>Metodiche per valutare i differenziamenti</i>  | pag. 25 |
| <u><i>Analisi morfologica</i></u>  | pag. 25 |
| <u><i>Analisi mediante immunofluorescenza</i></u>  | pag. 26 |
| <u><i>Analisi mediante RT-PCR</i></u>  | pag. 26 |
| <u><i>Saggio Oil-Red-O per la presenza di trigliceridi</i></u>   | pag. 26 |
| <u><i>Saggio von Kossa per la deposizione di sali di calcio</i></u>  | pag. 27 |
| <br>   |         |
| <u>Differenziamento epatocitario <i>in vitro</i> di cellule CD105 positive da UCB e UC</u>                   | pag. 27 |
| <br>   |         |
| <u>Su supporto di Matrigel™</u>  | pag. 27 |
| <br>   |         |
| <u>Su supporto di PuraMatrix™</u>  | pag. 28 |
| <br>   |         |
| <u>Su matrice acellulare omologa di fegato</u>   | pag. 28 |
| 1. <i>Ottenimento della matrice acellulare</i>   | pag. 28 |
| 2. <i>Analisi istochimica / immunostochimica</i>   | pag. 29 |
| <u><i>Inclusione in paraffina</i></u>  | pag. 29 |
| <u><i>Analisi istochimica</i></u>  | pag. 29 |
| <u><i>Analisi immunostochimica</i></u>   | pag. 29 |
| 3. <i>Semina di cellule CD105 positive da UCB su matrice</i>   | pag. 30 |
| 4. <i>Osservazione tramite microscopia elettronica a scansione</i>   | pag. 30 |
| 5. <i>Valutazione della vitalità delle cellule su matrice</i>  | pag. 30 |
| 6. <i>Valutazione della produzione di albumina umana</i>   | pag. 31 |

|  |         |
|--|---------|
| <u>Differenziamento epatocitario <i>in vivo</i> di cellule CD105 positive da UCB e da UC</u>             | pag. 31 |
| 1. <i>Induzione del danno</i>  | pag. 31 |
| 2. <i>Somministrazione di cellule CD105 positive da UCB e da UC</i>                                      | pag. 31 |
| 3. <i>Valutazione istologica degli organi</i>  | pag. 32 |
| 4. <i>Valutazione della presenza di cellule umane mediante immunistochemica</i>                          | pag. 32 |
| <b>RISULTATI</b>   | pag. 35 |
| <u>Colture primarie di cellule provenienti da UCB</u>  | pag. 35 |
| <u>Colture di cellule CD105 positive da UCB</u>  | pag. 36 |
| <u>Colture primarie di cellule provenienti da UC</u>   | pag. 39 |
| <u>Colture di cellule CD105 positive da UC</u>   | pag. 40 |
| <u>Differenziazione adipogenica ed osteogenica <i>in vitro</i> di cellule CD105 positive da UCB e UC</u> | pag. 41 |
| <u>Differenziamento epatocitario <i>in vitro</i> di cellule CD105 positive da UCB e UC</u>               | pag. 43 |
| <u>Su supporto di Matrigel™</u>  | pag. 43 |
| <u>Su supporto di PuraMatrix™</u>  | pag. 44 |
| <u>Su matrice acellulare omologa di fegato</u>   | pag. 45 |
| <u>Differenziamento epatocitario <i>in vivo</i> di cellule CD105 positive da UCB e da UC</u>             | pag. 49 |
| a. <u>Modello di danno epatico da tetracloruro di carbonio</u>   | pag. 50 |
| b. <u>Modello di danno epatico da alcool allilico</u>  | pag. 57 |
| <b>DISCUSSIONE</b>   | pag. 63 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>  | pag. 73 |



# INTRODUZIONE

## Cellule staminali e ingegneria tissutale

Attualmente, una cellula staminale viene definita come una cellula non specializzata che ha la capacità di moltiplicarsi indefinitamente mediante divisioni cellulari e che, sotto condizioni fisiologiche o sperimentali, è in grado di differenziarsi in cellule mature con specifiche funzioni. Inoltre, ogni singola cellula staminale deve essere capace di generare una linea cellulare geneticamente uguale, chiamata clone.

Cellule staminali di origine diversa possiedono un diverso grado di potenzialità differenziativa. Questo grado varia dalla totipotenzialità dell'uovo fecondato, lo zigote, di originare un intero embrione e il trofoblasto della placenta; alla pluripotenzialità delle cellule staminali embrionali, che sono capaci di differenziarsi in tutti i tipi cellulari derivanti dai tre foglietti; alla multipotenzialità (capacità di differenziarsi in alcune linee cellulari) di certe cellule staminali adulte ed infine all'unipotenzialità di cellule staminali tessuto-specifiche che originano un unico tipo di cellula specializzata [Stocum DL, 2001; Report NHI, 2001].

Le cellule staminali recentemente sono assunte all'attenzione mondiale in quanto potenzialmente utilizzabili nella cura di un elevato numero di malattie diverse, dall'Alzheimer al Parkinson, dalla distrofia muscolare all'insufficienza cardiaca, dalla sclerosi multipla al diabete. Inoltre, prestandosi a interventi di manipolazione, rappresentano un interessante strumento per la terapia genica. Il grande interesse suscitato ha già fatto moltiplicare gli studi atti a comprenderne meglio la biologia e le potenziali applicazioni, conoscenze che potrebbero portare queste cellule ad assumere un ruolo centrale nella medicina in generale e in quella della rigenerazione in particolare. Quest'ultima, partendo dallo studio dei processi attraverso i quali un organismo è in grado di sostituire o riparare parti del corpo malate o danneggiate, si pone come obiettivo l'identificazione di strategie terapeutiche atte a ripristinare la funzionalità tissutale. In questo contesto, l'ingegneria tissutale, volta alla progettazione e all'ottenimento di sostituti tissutali o d'organo, rappresenta un ramo della medicina rigenerativa. Essa coniuga i principi bio-medici con quelli dell'ingegneria e negli ultimi dieci anni ha avuto un grande sviluppo grazie ai progressi compiuti nella comprensione dei meccanismi di riparazione e delle molecole segnale coinvolte, all'avvento di nuovi biomateriali come potenziali "guide" per la crescita dei tessuti, al miglioramento nella progettazione di bioreattori nonché alle nuove conoscenze acquisite mediante analisi a livello genomico e proteomico.



Le cellule staminali nel campo dell'ingegneria tissutale potrebbero rivestire un ruolo chiave, venendo utilizzate per dar origine a un numero elevato di cellule con fenotipo specifico da incorporare nei costrutti tissutali per la riparazione o la rigenerazione di danni tissutali o d'organo [Polack JM et al., 2006].

## **Cellule staminali embrionali**

Le cellule staminali embrionali (Embryonic Stem Cells, ESC) derivano dall'embrione allo stadio di sviluppo che precede l'impianto *in utero*. A circa 5 giorni dalla fecondazione avviene la separazione tra lo strato più esterno di cellule, che diventeranno il trofoblasto, e la massa cellulare interna (Inner Cell Mass, ICM), le cui cellule sono in grado di proliferare indefinitamente e di dar origine ai tipi cellulari appartenenti ai tre foglietti embrionali, sia *in vivo* che *in vitro* mediante appropriate condizioni di coltura.

Le ESC sono state ottenute la prima volta dal topo nel 1981 [Evans MJ et al., 1981]; in seguito sono state isolate dai primati non umani [Thomson JA et al., 1995, 1996] e nel 1998 dall'uomo [Thomson JA et al., 1998].

ESC umane provenienti da blastocisti derivanti da fecondazioni *in vitro* e da cellule primordiali germinali di embrioni di 5-9 settimane di vita sono state stabilizzate in coltura.

Queste colture cellulari possono dividersi in modo simmetrico per moltissime volte senza andare incontro a processi di differenziazione e mantenendo un cariotipo normale e diploide. Sono capaci individualmente di dare origine a cellule derivanti dai tre foglietti embrionali germinali (ectoderma, mesoderma, endoderma) e a cellule germinali. Inoltre ogni singola cellula embrionale staminale può originare colonie di cellule geneticamente uguali (cloni) che mantengono inalterate le proprietà della cellula da cui originano.

Il mantenimento della pluripotenzialità richiede l'espressione di alcuni fattori di trascrizione: Oct-4 (Octamer-binding transcription factor 4) e Nanog sono considerati i principali responsabili della pluripotenzialità, anche se recenti studi hanno portato a individuare set di numerosi geni (fino a 92) [Bhattacharya B et al., 2004] espressi solo in linee cellulari umane embrionali indifferenziate.

Altri marcatori specifici della pluripotenzialità espressi da queste cellule sono SSEA-3 e SSEA-4 (Stage-Specific Embryonic Antigens), TRA-1-60, TRA-1-81 (Tumor Rejection Antigen) e fosfatasi alcalina; mentre l'enzima telomerasi espresso ad alti livelli sarebbe la causa del mantenimento della lunghezza delle sequenze telomeriche durante le divisioni cellulari e quindi della loro elevata capacità proliferativa.

L'utilizzo delle ESC risulta essere di fondamentale importanza per la comprensione dei geni coinvolti durante lo sviluppo dell'embrione e delle linee cellulari germinali e anche per capire i processi di differenziazione di molti tessuti. Inoltre il trapianto di cellule derivate dalle ESC ha dato risultati promettenti in modelli animali di rigenerazione di vari tessuti.

Tuttavia poiché non è ancora chiaro il rischio di tumorigenicità indotto dal trapianto di tali cellule e dati i problemi di natura etica connessi al loro utilizzo, la ricerca scientifica si è indirizzata verso la scoperta di nuove fonti di cellule staminali, quali ad esempio i tessuti dell'adulto.

### **Cellule staminali dell'adulto**

Le cellule staminali dell'adulto (Adult Stem Cells, ASC) sono rare e localizzate in diversi tessuti del corpo umano, dove si comportano in vari modi a seconda dell'ambiente circostante. La loro funzione principale è di mantenere l'omeostasi del tessuto a cui appartengono, rimpiazzando le cellule che muoiono a causa di danno o di malattia. Non si conosce ancora esattamente quale sia la loro origine anche se alcuni ritengono che esse siano un set di cellule rimaste indifferenziate durante lo sviluppo embrionale.

Le ASC possono differenziare in linee cellulari appartenenti al medesimo foglietto germinale: per esempio cellule da midollo osseo, che è di origine mesodermica, possono differenziare in altri tessuti di derivazione mesodermica quali muscolo scheletrico [Ferrari G et al., 1998], muscolo cardiaco [Orlic D et al., 2001]. D'altra parte si è visto che ASC possono differenziare anche in tessuti che non appartengono al loro foglietto germinale d'origine: per esempio cellule da midollo osseo possono differenziare in cellule del fegato [Alison MR et al., 2000] che è un tessuto di origine endodermica e altresì in cellule del tessuto neurale [Mezey E et al., 2000] che è di origine ectodermica; viceversa le cellule staminali neuronali possono differenziare in cellule ematopoietiche [Bjornson CR et al., 1999]. Tale capacità plastica è nota col termine di metaplasia.

La lista dei tessuti adulti sia animali che umani contenenti cellule staminali sta crescendo e include già molti tessuti di origine sia mesodermica che ectodermica ed endodermica.

Alla prima categoria appartengono le cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells, HSC) che hanno la capacità di dar origine a tutti gli elementi corpuscolati del sangue. Esse sono state riconosciute come cellule staminali più di 40 anni fa [Till JE et al., 1961] e sono utilizzate ormai da anni nel trattamento di numerosi disordini ematologici. Possono venire isolate dal midollo osseo, dal sangue periferico o dal sangue del cordone ombelicale.

Di origine mesodermica sono anche le cellule staminali del muscolo scheletrico, dette cellule satellite. Esse sono localizzate sulla superficie della membrana basale delle cellule muscolari mature, le miofibre. Queste cellule normalmente non si dividono ma in seguito a danno muscolare, sono in grado di ricapitolare il programma di differenziazione muscolare fino a differenziarsi in miofibre [Hansen-Smith FM et al., 1979; Jones PH, 1982].

I derivati epiteliali di origine embrionale ectodermica ed endodermica rappresentano circa il 60% delle cellule differenziate nel corpo, rivestono sia superfici interne che esterne e svolgono varie funzioni come la secrezione, l'assorbimento e il mantenimento dell'integrità delle superfici. Cellule epiteliali che possiedono tali funzioni sono state identificate nel sistema nervoso, nell'epidermide, nei follicoli dei capelli, nella cornea, nell'epitelio respiratorio e in quello del canale digerente, nel pancreas e nel fegato.

L'epidermide contiene, a livello dello regione basale, cellule staminali (Epithelial Stem Cells, EpSC) che differenziano in cheratinociti mentre si muovono verso gli strati più esterni della pelle [Jensen UB et al., 1999]; anche le cellule presenti nell'epitelio dell'intestino si rinnovano continuamente grazie alla proliferazione ed al differenziamento di cellule staminali (Intestinal Stem Cells, ISC) individuate nelle cripte di Lieberkuhn.

Sono state identificate cellule staminali anche a livello del tessuto nervoso (Neural Stem Cells, NSC), ritenuto fino a poco tempo fa incapace di rigenerarsi. Esse *in vitro* formano neurosfere e sono in grado di differenziarsi sia in neuroni che in cellule della glia (astrociti e oligodendrociti). Le NSC sono positive per la nestina e nei mammiferi sono state isolate dalla zona subventricolare dell'encefalo [Reynolds BA et al., 1992] e nel giro dentato dell'ippocampo [Palmer TD et al., 1997].

Nel fegato le cellule staminali residenti sono le cellule ovali (o Liver Progenitor Cells, LPC) che si trovano localizzate nell'epitelio dei canali di Hering. Tali cellule sono bipotenti in quanto possono differenziarsi in epatociti e colangiociti, cellule epiteliali del dotto biliare; esse risultano positive per OC-2 (Oval Cell 2), OV-6 (rat oval cell marker 6) e per marker caratteristici degli epatoblasti come l' $\alpha$ -fetoproteina, la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasi [Thorgeirsson SS, 1996], ma non per quelli degli epatociti adulti, indicando la possibilità di un percorso di sviluppo simile a quello embrionale.

Cellule staminali sono state isolate anche da altri tessuti adulti quasi che ogni tessuto contenesse un pool di cellule in stato indifferenziato. Le ASC, pur essendo meno numerose e meno plastiche 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 questioni di natura etica.

## **Cellule staminali mesenchimali**

Le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSC) sono un tipo di ASC e sono state per la prima volta identificate nel midollo osseo e nella milza di cavia nel 1970 [Friedenstein AJ et al., 1970] come fibroblasti formanti colonie (Colony Forming Units-Fibroblasts, CFU-F). In seguito sono state isolate da midollo osseo umano e descritte nel loro potenziale differenziativo da Pittenger e colleghi [Pittenger MF et al., 1999].

Da allora l'interesse verso le MSC è aumentato per il loro possibile impiego nell'ingegneria tissutale e in applicazioni terapeutiche: le MSC sono già state impiegate in maniera efficace in diversi tipi di terapie cellulari, tra cui il trattamento di bambini affetti da *osteogenesis imperfecta* [Horwitz EM et al., 2002], nel recupero dell'emopoiesi in pazienti con cancro mammario [Koc ON et al., 2000] e nella rigenerazione di tessuto osseo [Petite H et al., 2000]. L'aspetto più attraente di queste cellule è il loro grado di plasticità e la possibilità di essere isolate da diversi tessuti adulti.

Nonostante la crescente e variegata quantità di informazioni riguardante le MSC e il loro impiego in terapie cellulari, i meccanismi che governano la loro capacità di rigenerarsi (self-renewal) e di differenziarsi in diverse linee cellulari non sono ancora ben noti, così come resta da chiarire l'esatta natura e localizzazione delle MSC *in vivo*.

Per convenzione si ritiene che tale tipo cellulare si trovi nel tessuto connettivo in formazione durante lo sviluppo dell'organismo e durante la sua rigenerazione o riparazione lungo la crescita post-natale.

Sin dal lavoro di Castro-Malaspina e colleghi del 1980 [Castro-Malaspina H et al., 1980] molti ricercatori hanno impiegato diversi metodi per isolare MSC e hanno sviluppato nuovi approcci per la loro purificazione.

La capacità di aderire alla plastica delle piastre formando colonie di cellule di morfologia fibroblastoide (CFU-F) [Caplan AI, 1991] è ancora oggi considerato un sistema per isolare MSC da diversi tessuti adulti.

Tuttavia la mancanza di una definizione unica di MSC e le diverse metodologie usate per coltivare e caratterizzare tipi cellulari riconducibili alle MSC hanno portato alla identificazione di nuovi tipi cellulari, quali le cellule adulte progenitrici multipotenti (Multipotent Adult Progenitor Cells, MAPC) [Reyes M et al., 2001], le cellule adulte isolate da midollo inducibili verso molteplici linee (Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible

cells, MIAMI cells) [D'Ippolito G et al., 2004], cellule staminali riciclatorie (Recycling Stem cells, RS-1, RS-2) [Colter DC et al., 2000], caratterizzate da origine e capacità differenziativa peculiari.

### ***Nicchia delle MSC***

Per definire più precisamente le MSC si è cercato di determinare la loro nicchia di esistenza *in vivo*.

La nicchia comprende tutti gli elementi che circondano le cellule staminali quando queste sono ancora nel loro stato nativo, includendo le cellule non staminali con cui possono venire in contatto, la matrice extracellulare e molecole solubili come citochine e fattori di crescita o differenziativi.

Anche la percentuale di ossigeno nel mezzo risulta importante nel definire e mantenere la nicchia di staminalità: è stato dimostrato che condizioni ipossiche (2% di O<sub>2</sub>) favoriscono la proliferazione delle MSC rispetto a condizioni normossiche (20% di O<sub>2</sub>) [Grayson WL et al., 2006].

Una nicchia di cellule staminali molto studiata è quella del midollo osseo: in essa lo stroma e le cellule stromali consentono la sopravvivenza e la crescita di cellule staminali ematopoietiche (HSC) provvedendo loro un supporto fisico e segnali di indirizzamento (commitment), differenziamento e maturazione [Koller MR et al., 1997].

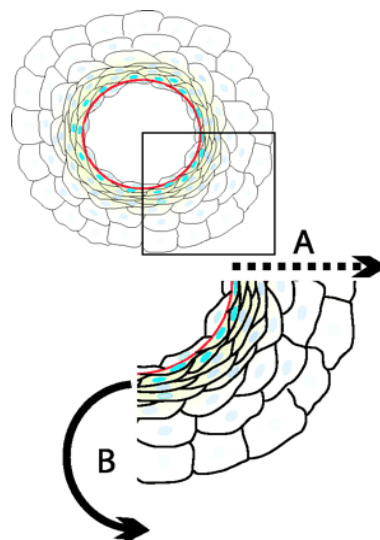
E' nello stroma - costituito da cellule endoteliali, adipociti, macrofagi, cellule reticolari, fibroblasti e progenitori osteogenici oltre che dalle HSC - che si ritiene risiedano le MSC del midollo osseo. Tuttavia non è ancora chiaro se le MSC condividano la stessa nicchia con le HSC o se siano dotate di un proprio compartimento separato. Certo è che i segnali intra- ed extra- cellulari richiesti per il programma di sviluppo delle MSC devono essere diversi da quelli richiesti per il mantenimento e lo sviluppo delle HSC e devono ancora essere opportunamente descritti.

Nonostante il midollo osseo sia una fonte ben accettata di MSC, esse sono state isolate anche da altri tessuti dell'adulto quali le trabecole ossee [Noth U et al., 2002], il tessuto adiposo [Zuk PA et al., 2001], i tendini [Salingcarnboriboon R et al., 2003], i legamenti peridontali [Seo BM et al., 2004], la membrana sinoviale [De Bari C et al., 2001] e i polmoni [Sabatini F et al., 2005].

Un recente studio sul topo [da Silva Meirelles L et al., 2006] ha messo in luce la possibilità di isolare MSC anche da tessuti di origine non mesodermica: questo fatto suggerisce che la

nicchia di esistenza delle MSC non è ristretta al solo midollo osseo e anzi sembrerebbe piuttosto ubiquitaria in tutto l'organismo.

Come spiegazione è stata ipotizzata l'esistenza di una nicchia perivascolare per le MSC per cui queste cellule risiederebbero nei vasi di ogni tessuto o organo adulto e si attiverebbero in seguito a segnali del microambiente, per esempio in conseguenza di un danno, dando origine a progenitori indirizzati (committed) che gradualmente si integrerebbero nel tessuto (**Tavola 1**).



**Tavola 1.** Un modello di contributo delle MSC al mantenimento tessutale. In questa rappresentazione schematica di una sezione trasversale di un vaso, le MSC si trovano nella membrana basale (linea rossa) opposta alle cellule endoteliali. I segnali emessi dal microambiente specifico del tessuto coordinano una graduale transizione (rappresentata da gradiente di colore verde) da cellule indifferenziate a progenitori e cellule mature. Questo processo avviene naturalmente come rappresentato dalla freccia tratteggiata (A). In caso di danno tessutale, MSC indifferenziate possono essere mobilizzate direttamente nel tessuto senza passare attraverso lo stadio di progenitori come rappresentato dalla freccia curva (B).

### ***Marcatore delle MSC***

In seguito a molti lavori di caratterizzazione che prevedevano lo studio di diversi antigeni di superficie si è riusciti a determinare con un certo consenso quali marcatori non vengono espressi dalle MSC, consenso che invece è del tutto assente per quanto riguarda la determinazione di un marcatore positivo che possa essere impiegato per identificare in maniera inequivocabile le MSC soprattutto *in vivo*.

Per quanto riguarda i marcatori negativi, è accettato che le MSC non esprimano CD11 (un marcatore di cellule del sistema immunitario), la glicoforina A (marcatore di linea eritroide) e il CD45 (marcatore di cellule ematiche); CD34, marcatore di HSC primitive raramente viene espresso nelle MSC umane, mentre è positivo nelle cellule murine; CD31 (espresso dalle

cellule endoteliali ed ematopoietiche) e CD117 (marcatore di HSC) sono quasi sempre assenti nelle MSC sia umane che murine [Colter DC et al., 2001].

Al contrario vengono riportate miriadi di marcatori per i quali le MSC sono positive, a seconda del set utilizzato da ogni gruppo di ricerca. Tra questi molto conosciuti e accettati sono Stro-1 [Dennis JE et al., 2002] ma anche CD105, CD106, CD73, CD90, CD44, CD29, CD13, FLK-1/CD309, Sca-1, CD10, fino al più recente CD271/NGFR [Quirici N et al., 2002]. Nel tentativo di identificare un marcatore positivo definitivo, tale lista è destinata ad accrescersi comprendendo nuovi marcatori che mano a mano si scoprono essere espressi dalle MSC.

Nella tabella 1, elaborata da Kolf e colleghi [Kolf et al., 2007] prendendo in considerazione 19 studi diversi, vengono riportati gli antigeni di superficie comunemente indagati durante l'isolamento di MSC e la positività o negatività a questi.

|                   |                                     | Numero di popolazioni riportate con livelli specifici di antigene <sup>b</sup> |     |    |                         |     |    |
|-------------------|-------------------------------------|--|-----|----|-------------------------|-----|----|
|                   |                                     | MSC umane <sup>c</sup>   |     |    | MSC murine <sup>c</sup> |     |    |
| Tipo di marcatura | Antigene di superficie <sup>a</sup> | +  | +/- | -  | +                       | +/- | -  |
| Positiva          | Stro-1                              | 7  | 1   | 2  | 0                       | 0   | 0  |
|                   | CD13                                | 5  | 0   | 0  | 1                       | 0   | 1  |
|                   | CD29                                | 5  | 0   | 0  | 11                      | 0   | 0  |
|                   | CD44                                | 11   | 0   | 1  | 10                      | 1   | 0  |
|                   | CD73                                | 5  | 0   | 0  | 0                       | 0   | 0  |
|                   | CD105                               | 7  | 0   | 0  | 1                       | 0   | 0  |
|                   | CD106                               | 4  | 0   | 2  | 4                       | 1   | 0  |
| Negativa          | CD11b                               | 0  | 0   | 3  | 0                       | 1   | 5  |
|                   | CD31                                | 0  | 3   | 10 | 0                       | 0   | 6  |
|                   | CD34                                | 1  | 1   | 10 | 5                       | 6   | 3  |
|                   | CD45                                | 0  | 0   | 11 | 0                       | 0   | 6  |
|                   | CD117                               | 0  | 2   | 3  | 1                       | 1   | 13 |
| Variabile         | Sca-1                               | 0  | 0   | 0  | 6                       | 5   | 4  |
|                   | CD10                                | 6  | 0   | 5  | 0                       | 1   | 0  |
|                   | CD90                                | 11   | 1   | 1  | 2                       | 4   | 10 |
|                   | Flk-1                               | 2  | 1   | 1  | 0                       | 0   | 5  |

**Tabella 1:** <sup>a</sup>Antigeni scelti se testati in almeno 4 popolazioni di MSC; <sup>b</sup>numero di popolazioni di MSC (isolate da vari tessuti umani o di topo) positive (+), per lo più positive (+/-), o negative (-); <sup>c</sup>MSC isolate principalmente da midollo osseo ma anche da tessuto adiposo, pelle, timo, reni, muscolo, fegato, polmoni e placenta.

### ***Potenziale di self-renewal delle MSC***

Una delle caratteristiche delle cellule staminali è la loro capacità di rigenerarsi, ossia di dar origine a delle copie identiche di se stesse mediante divisioni mitotiche per lunghi periodi di tempo, a volte per tutta la durata della vita di un organismo.

Per self-renewal si intendono gli schemi e i meccanismi biologici che preservano lo stato indifferenziato delle cellule staminali.

Nel mantenimento della staminalità sono coinvolti geni e segnali extracellulari, quali fattori di crescita e citochine: MSC ottenute da diverse specie di mammiferi esprimono geni tipici di cellule staminali embrionali quali Oct-4, Sox-2, Rex-1 [Izadpanah R et al., 2006]; mentre Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Fibroblast Growth Factors (FGF) e Wnts, famiglia di glicoproteine secrete ricche di cisteina, sono citochine coinvolte nel mantenimento delle MSC. LIF, citochina pleiotropica mantiene lo stato indifferenziato delle MSC [Jiang Y et al., 2002] e di altre staminali [Metcalf D, 2003]. FGF-2 mantiene lo stato di mesenchimale prolungando la vitalità cellulare in coltura [Tsutsumi S et al., 2001]. La famiglia Wnts, in particolare Wnt3a, potrebbe regolare il mantenimento delle MSC in quanto da una parte ne incrementa la proliferazione dall'altra ne inibisce la capacità differenziativa osteogenica [Boland GM et al., 2004].

La capacità rigenerativa assoluta delle MSC rimane tuttavia una questione aperta a causa dei diversi metodi utilizzati per isolare popolazioni di tali cellule e i vari approcci impiegati per valutarne il potenziale di self-renewal.

Popolazioni di MSC da midollo osseo hanno dimostrato un potenziale di self-renewal significativo ma altamente variabile durante l'espansione *in vitro* e population doubling elevati (superiori a 50) sono stati ottenuti solo aggiungendo in coltura specifici fattori di crescita (per esempio FGF-2) [Bianchi G et al., 2003].

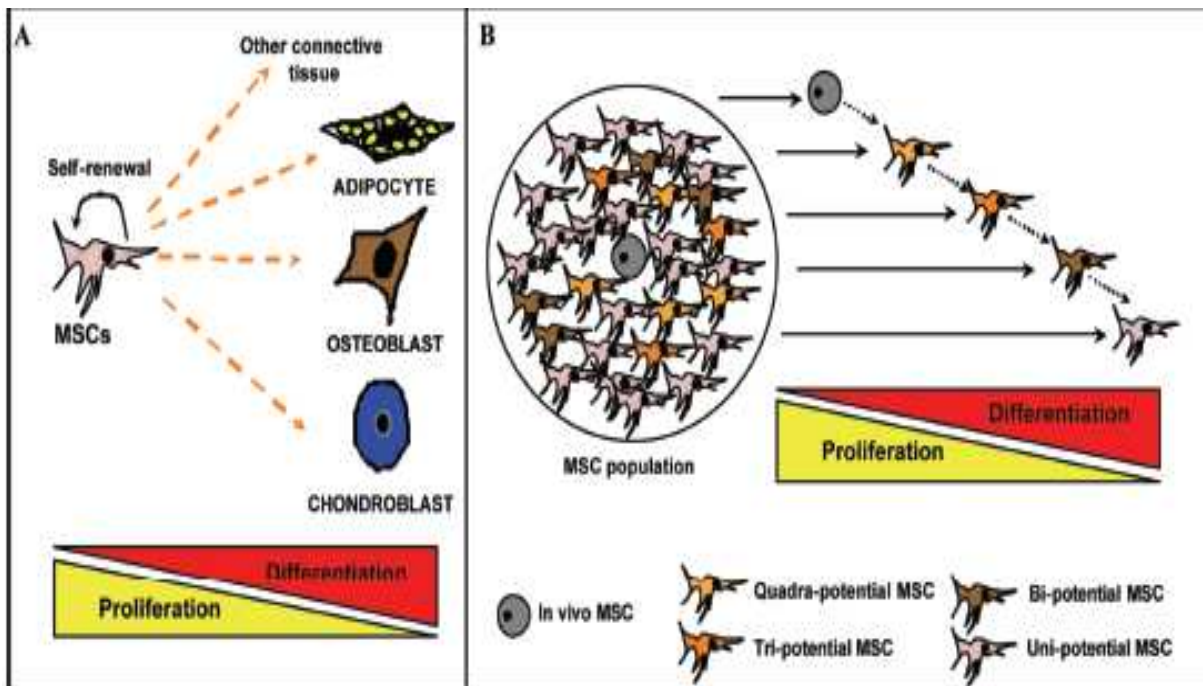
### ***Potenziale differenziativo delle MSC***

Studi su popolazioni di MSC da midollo osseo di uomo, cane, coniglio, ratto e topo hanno dimostrato la capacità di tali cellule di dar origine sia *in vitro* che *in vivo* a cellule di derivazione mesenchimale, quali quelle presenti nell'osso [Bruder SP et al., 1997], nella cartilagine [Kadiyala S et al., 1997], nel tendine [Young RG et al., 1998], nel muscolo [Ferrari G et al., 1998], nel tessuto adiposo [Dennis JE et al., 1999] e a cellule stromali che supportano l'ematopoiesi [Prockop DJ, 1997]. Tuttavia l'indagine sul potenziale differenziativo di cloni di singole MSC ha dato risultati che vedono tale capacità variare dalla uni-potenzialità (solo linea osteogenica), alla tri-potenzialità (linea osteogenica, condrogenica



ed adipogenica). Questi risultati suggeriscono che le MSC di derivazione clonale presentano eterogeneità nel loro potenziale differenziativo oltre che di self-renewal.

Tale eterogeneità potrebbe essere spiegata ammettendo l'esistenza di sottopopolazioni in diverso stato differenziativo all'interno del compartimento mesenchimale come illustrato nella **tavola 2**.

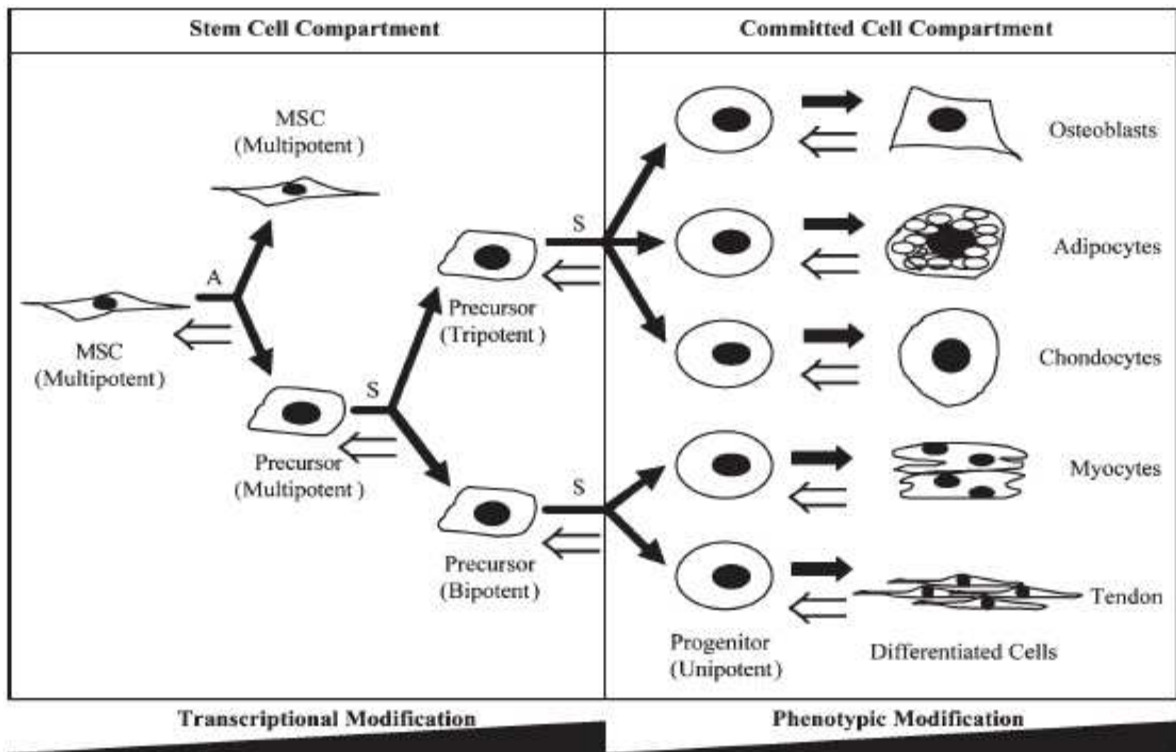


**Tavola 2.** Modelli di differenziazione delle MSC. (A) Una singola MSC è in grado di differenziarsi in cellule di tutti i tessuti connettivi; (B) MSC comprendono sottopopolazioni di cellule con diverso potenziale differenziativo (da uni- a quadri-potenziale).

Durante la coltura *in vitro* si avrebbe la perdita del pool di MSC multipotenti a causa delle loro bassa frequenza rispetto alle sottopopolazioni più differenziate.

Una questione importante perciò risulta essere come queste cellule multipotenti possano essere mantenute nel loro stato multipotenziale durante l'espansione *in vitro* prima di passare al differenziamento.

Il differenziamento sembra avvenire mediante passaggio da cellula staminale non indirizzata a precursore parzialmente indirizzato fino a cellula completamente differenziata come rappresentato nella **tavola 3**.



**Tavola 3.** Modello schematico di differenziamento di MSC

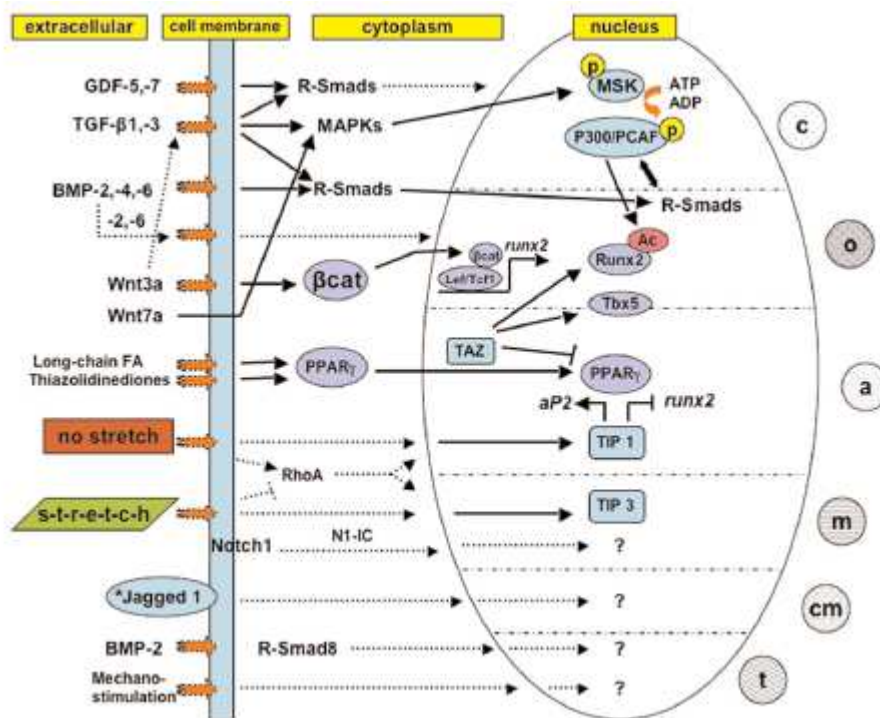
Questi passaggi sono stimolati da condizioni induttive definite: studi *in vitro* hanno infatti permesso l'identificazione di vari fattori essenziali per l'indirizzamento (commitment) delle cellule staminali, tra i quali risultano molecole secrete e loro recettori, componenti della matrice extracellulare (per esempio collagene e proteoglicani) e fattori di trascrizione intracellulari.

Tuttavia i meccanismi che stanno alla base del processo di differenziamento non sono ancora chiari: transdifferenziazione, dedifferenziazione e successiva ridifferenziazione nonché fusione sono alcuni dei meccanismi proposti.

La tecnologia dei microarray di DNA è stata utilmente impiegata per delineare il profilo di espressione di geni coinvolti nel commitment e nel differenziamento delle cellule staminali; mediante tale approccio si possono confrontare geni espressi durante il differenziamento delle MSC alla ricerca di quello che può essere il master gene che controlla l'indirizzamento verso una determinata linea cellulare.

A tal proposito Runx2 è risultato il master gene per la linea osteogenica ed esso è indotto nelle MSC dalle proteine BMP, in particolare da BMP-2 [Chen D et al., 2004], mentre PPAR-gamma è risultato essere un gene regolatore di importanza critica per promuovere l'adipogenesi delle MSC reprimendo contemporaneamente l'osteogenesi [Nuttall ME et al., 2004].

Il tentativo di rappresentare il programma di citodifferenziazione delle MSC e le molecole coinvolte nella regolazione può portare a quadri piuttosto complessi e non completamente definiti come rappresentato nella **tavola 4**.



**Tavola 4.** Regolazione molecolare della differenziazione delle MSC. c = condroblasti, o = osteoblasti, a = adipoblasti, m = mioblasti, cm = cardiomiociti, t = tenoblasti.

### Sangue cordonale e cordone ombelicale umano come fonti di MSC

Da quando nel 1988 è stato utilizzato per la prima volta con successo per curare un paziente affetto da anemia di Fanconi [Gluckman E et al., 1989], è ormai diventato evidente che il sangue cordonale (Umbilical Cord Blood, UCB) è una buona fonte di HSC [Mayani H et al., 1998].

Come fonte di HSC l'UCB rispetto al midollo osseo presenta diversi vantaggi: a parità di volume è più ricco di cellule ematopoietiche; è più tollerato per quanto riguarda i mismatches di HLA, quindi presenta minor rischio di rigetto (Graft Versus Host Disease, GVHD); inoltre la sua raccolta non è invasiva.

Tuttavia il numero di HSC che si possono ottenere per campione è sufficiente solo per trapianti in bambini o adulti di basso peso corporeo.

Recentemente l'UCB insieme ad altri tessuti di derivazione fetale quali cordone (Umbilical cord, UC) e placenta è stato preso in considerazione anche come fonte di MSC.

Tali tessuti rappresentano una fonte ideale di cellule in quanto la loro raccolta non comporta procedure invasive e non solleva questioni etiche, ma avviene al momento del parto in totale sicurezza sia per la madre che per il neonato. Inoltre data la loro natura di annessi embrionali si ritiene possano contenere cellule in stato indifferenziato.

Esistono molte evidenze a favore di questa ipotesi: nell'UC sono stati isolati progenitori mesenchimali sia dallo strato endoteliale/subendoteliale della vena ombelicale [Romanov YA et al., 2003] che dallo stroma cordonale o gelatina di Wharton [Wang HS et al., 2004]; studi condotti sulla placenta hanno messo in luce la possibilità di ottenere MSC sia dalla digestione della placenta *in toto* [Fukuchi Y et al., 2004] sia dalle membrane (amnios e corion) e dai villi coriali [Portmann-Lanz CB et al., 2006].

Anche il liquido amniotico si è rivelato una promettente fonte di staminali: recentemente da esso è stata isolata una sottopopolazione di cellule con potenzialità proliferativa e differenziativa simile a quella delle embrionali [De Coppi P et al., 2007], quindi in uno stato ancor più indifferenziato delle mesenchimali.

Le indagini finora condotte sull'UCB invece hanno dato esiti controversi: se è ormai appurata la sua capacità di fornire precursori ematopoietici, non è altrettanto chiaro il suo ruolo come fonte di progenitori mesenchimali. Alcuni gruppi di ricerca sostengono la possibilità di isolare con facilità precursori mesenchimali multipotenti dall'UCB [Goodwin HS et al., 2001; Lee OK et al., 2003], mentre altri la considerano una possibilità remota [Mareschi K et al., 2001; Wexler SA et al., 2003].

Nonostante tali posizioni contrastanti è ormai accettata l'ipotesi che insieme ai progenitori ematopoietici l'UCB veicoli anche progenitori mesenchimali dai siti fetali di origine (sacco vitellino, aorta ventrale, fegato, timo, milza e midollo osseo fetale) verso altri tessuti, in particolar modo verso il midollo osseo, che rimarrebbe la sede principale di tali progenitori. Questa mobilitazione avverrebbe precocemente durante lo sviluppo embrionale data la correlazione inversa esistente tra contenuto di progenitori mesenchimali ed ematopoietici nell'UCB e l'età di gestazione [Erices A et al., 2000].

Quindi il problema alla base della difficoltà di isolamento di progenitori mesenchimali dall'UCB consiste nella bassa percentuale di tali cellule ivi presenti al momento del parto - mentre durante la gestazione tale percentuale sarebbe maggiore [Campagnoli C et al., 2001; Wyrsch A et al., 1999] - e inoltre nella mancanza di una identificazione tramite marker di una particolare popolazione cellulare con le caratteristiche ricercate.

Diversi gruppi di ricerca hanno cercato di ovviare a tali problemi mettendo a punto il protocollo di estrazione delle MSC [Bieback K et al., 2004] o cercando di individuare un marcatore selettivo per esse [Tondreau T et al., 2005].

In base a recenti studi è risultato che cellule da UCB sarebbero in grado di differenziare non solo nelle tre linee cellulari di origine mesodermica (adipogenica, osteogenica e condrogenica) ma anche in cellule muscolari scheletriche [Gang EJ et al., 2004], in cheratinociti [Kamolz LP et al., 2005], in epatociti [Hong SH et al., 2005], in cellule in grado di produrre insulina [Yoshida S et al., 2005], quindi anche in cellule di origine ecto ed endodermica.

Negli esperimenti di differenziamento *in vivo* la componente che ha dato più risultati è stata la frazione di cellule ematopoietiche: cellule mononucleate da UCB arricchite nella frazione CD34 positiva (marcatore di cellule ematopoietiche) sono risultate in grado di differenziare in cellule muscolari una volta iniettate in topi distrofici [Kong KY et al., 2004] o di indurre angiogenesi in modelli animali di infarto cardiaco [Ma N et al., 2005].

Anche le cellule da UC hanno dimostrato capacità plastica tipica delle MSC venendo indotte a differenziarsi *in vitro* in osteoblasti ed adipociti [Covas DT et al., 2003]. *In vivo* invece hanno dimostrato capacità differenziativa maggiore dando origine a cellule muscolari scheletriche [Conconi MT et al., 2006] e a cellule neuronali [Weiss ML et al., 2003], lasciando intuire che la reale potenzialità di queste cellule probabilmente non è stata ancora indagata nella sua completezza.

## **MSC e fegato**

Le malattie del fegato si possono distinguere in tre categorie: insufficienze epatiche acute, malattie metaboliche ereditarie e insufficienze epatiche croniche (cirrosi). Attualmente l'unico trattamento efficace è rappresentato dal trapianto d'organo, il quale tuttavia presenta diverse problematiche legate allo scarso numero di donatori, all'invasività della procedura del trapianto, ai rischi di rigetto e di contrazione di infezioni, nonché agli elevati costi. Una terapia alternativa per i pazienti affetti da malattie epatiche è rappresentata dal trapianto di epatociti. Tale approccio è stato utilizzato in un numero limitato di casi in quanto la scarsità di fegati donati risulta una limitazione oltre che per il trapianto d'organo anche per l'ottenimento di un numero sufficiente di epatociti. In questo senso le cellule staminali potrebbero rappresentare una fonte alternativa di epatociti per il trapianto.

Il fegato stesso contiene un pool di cellule staminali d'organo, le cellule ovali, che opportunamente isolate ed espanse potrebbero rappresentare una fonte di epatociti. Tuttavia

essendo staminali intraepatiche esse non risolvono il problema legato alla scarsa disponibilità d'organi. Per questo l'attenzione si è rivolta verso le cellule staminali extraepatiche e alla possibilità di convertirle in epatociti funzionali.

Studi condotti su cellule da midollo osseo hanno evidenziato che sia le HSC che le MSC possono differenziare in epatociti [Shu SN, et al., 2004]. Nel caso delle HSC sarebbe in particolare la frazione CD34 positiva a possedere capacità epatocitaria [Theise ND et al., 2000; Fiegel HC et al., 2003], mentre le MSC sono in grado di differenziare in cellule simil epatiche sia *in toto* [Lee KD et al., 2004] che nella frazione multipotente costituita dalle MAPC [Schwartz RE et al., 2002].

Anche dall'UCB sono state isolate MSC in grado di differenziare in cellule simil epatiche *in vitro* [Kang XQ et al., 2005] mediante condizioni di coltura che prevedono l'utilizzo di specifici fattori di crescita, quali FGF-4 (Fibroblast Growth Factor 4) e HGF (Hepatocyte Growth Factor). Invece la capacità di tali cellule di differenziare *in vivo* è stata testata per lo più in modelli animali di danno epatico, in quanto il danno indurrebbe le cellule staminali a migrare verso il sito del tessuto danneggiato e a differenziare nel tipo cellulare colpito.

Numerosi studi sono stati condotti con varie selezioni di cellule da UCB trapiantate in diversi modelli animali di danno: epatectomia, danno da agente chimico quale alcool allilico o tetracloruro di carbonio, o combinazione di questi due tipi di danno seguiti da somministrazione di cellule cordonali hanno portato a interessanti esiti [Kakinuma S et al., 2003; Piscaglia AC et al., 2005; Di Campli C et al., 2005].

Tuttavia i meccanismi che regolano la conversione delle cellule trapiantate in cellule con caratteristiche di epatocita non sono ancora chiari: si ritiene che alcuni tipi cellulari possano fondersi con gli epatociti del ricevente [Alvarez Dolado M et al., 2003]; in alternativa potrebbero essere i fattori del microambiente a guidare la transdifferenziazione delle cellule.

Importante per la coltura di epatociti, oltre che ai fattori di crescita specifici, è la presenza di un supporto adeguato che dia loro un sostegno meccanico e contribuisca a creare un ambiente che li mantenga funzionali; quindi anche per il differenziamento epatocitario delle cellule staminali si ritiene che il supporto possa svolgere un ruolo chiave. Come supporti sono già stati utilizzati scaffold di materiale biodegradabile, quali l'acido poliglicolico, l'acido polilattico o non biodegradabili come poliuretano; inoltre componenti purificati della matrice extracellulare (Extracellular matrix, ECM) quali collagene [Weiss TS et al., 2002], fibronectina [Sanchez A. et al., 2000]; peptidi autoassemblanti (PuraMatrix™) [Semino CE et al., 2003], ECM ottenuta da colture cellulari neoplastiche (per esempio Matrigel™) [Richert L et al., 2002] e matrice acellulare omologa [Burra P et al., 2004]

Tra i vari supporti proposti la matrice acellulare omologa presenta delle caratteristiche interessanti per il differenziamento delle cellule staminali in quanto data la sua natura essa presenta il vantaggio di offrire il miglior grado di biocompatibilità e di contenere molecole di adesione e fattori di crescita naturali.

Inoltre essa è già stata utilizzata con risultati incoraggianti per la ricostruzione di vari tessuti quali l'uretra [Parnigotto, PP et al., 2000], l'intestino [Parnigotto PP, et al., 2000], il muscolo scheletrico [De Coppi P et al., 2006] e le valvole cardiache [Steinhoff G et al., 2000] e quindi potrebbe essere potenzialmente utile anche per la ricostruzione del fegato.

Sulla base di questi presupposti, in questo lavoro è stato verificato se UCB e UC umani contenessero MSC multipotenti in grado di differenziare in epatociti. A tal fine, lo schema sperimentale si è articolato nelle seguenti fasi:

- isolamento di cellule da UCB e UC e loro espansione *in vitro*;
- identificazione e caratterizzazione di una sottopopolazione cellulare esprime un marcatore di superficie tipico delle MSC;
- valutazione della capacità differenziativa *in vitro* di tale sottopopolazione verso linee cellulari mesodermiche (adipogenica ed osteogenica) e verso linea cellulare endodermica (epatogenica);
- valutazione della capacità di engraftment *in vivo* di tale sottopopolazione in un modello animale di danno epatico acuto.

# **MATERIALI E METODI**

## **Fonte dei campioni di UCB e di UC umano**

72 campioni di UCB e 76 di UC sono stati forniti dall'Unità Clinica Ospedaliera di Ginecologia e Ostetricia dell'ospedale di Cittadella (PD) previo consenso delle madri. Per la raccolta di UCB sono state utilizzate sacche MacoPharma MSC 1203 DU contenenti citrato fosfato destrosio come anticoagulante; per la raccolta di UC sono stati utilizzati vasetti di plastica sterili contenenti soluzione salina tamponata (Phosphate Buffer Solution, PBS).

## **Culture primarie di cellule provenienti da UCB**

### ***1. Isolamento e coltura di MNC da UCB***

Per isolare le cellule mononucleate (Mononuclear cells, MNC), ogni campione di UCB è stato diluito 1:1 con PBS/2mM EDTA e caricato delicatamente su una soluzione di Histopaque-1077 (Sigma). Dopo centrifugazione a 2500rpm per 20 minuti a temperatura ambiente, le cellule mononucleate sono state rimosse dall'interfase e lavate 2 volte con PBS/2mM EDTA e quindi poste in coltura in piastre Petri 100x20mm (Falcon) con terreno di proliferazione costituito da DMEM low glucose + HEPES (Euroclone), 20% FBS specifico per cellule mesenchimali (StemCell Technologies) e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica (10000U/ml penicillina, 10mg/ml streptomina solfato, 25µg/ml anfotericina B, Sigma). Le cellule così ottenute sono state coltivate a 37°C in 5% di CO<sub>2</sub>, cambiando 2 volte la settimana il terreno.

Le colture primarie sono state osservate giornalmente al microscopio ottico (Leitz DMIRB, Leica) per determinare la comparsa di colonie di cellule fibroblastoidi.

Tali colonie sono state isolate mediante incubazione con soluzione di tripsina 0,04% (Sigma) ed EDTA 0,03% (Sigma) in PBS in rapporto 1:1 (v/v) per 5 minuti a 37°C.

### ***2. Population Doubling e Population Doubling Level***

Le cellule seminate in piastre Petri 100x20mm a una densità pari a  $17,6 \times 10^3 / \text{cm}^2$  sono state staccate 2 volte alla settimana come precedentemente descritto e contate mediante camera di Burker. La conta è stata eseguita a partire dalla sesta generazione e i raddoppi di popolazione o Population Doubling sono stati calcolati utilizzando la seguente equazione:



Population Doubling =  $[\log_{10}(\text{NH}) - \log_{10}(\text{NI})] / \log_{10}(2)$  dove NI è il numero di cellule seminate ed NH è il numero di cellule raccolte.

Per ottenere il numero cumulativo dei raddoppi di popolazione o Population Doubling Level si sono sommati i valori di Population Doubling di una generazione a quelli delle generazioni precedenti. Le conte sono state eseguite in triplo.

### ***3. Caratterizzazione fenotipica mediante immunofluorescenza***

Le cellule sono state analizzate per la presenza dei seguenti marcatori: CD14, CD31, CD34, CD38, CD73, CD90, CD105, CD133, CD166, HLA-A, nestina, KDR (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), CD45 (Oncogene Research Products), CD54 (Sigma), SMA (Smooth muscle actin, Dako).

Per l'analisi immunocitochimica le cellule sono state seminate in chamber slides da 8 pozzetti (Falcon) ad una densità di  $8 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> e lasciate crescere fino a una confluenza del 70%. Dopo essere state fissate per 30 minuti a 4°C in paraformaldeide (Sigma) al 4% in tampone ISO 2X (TRIS 4,84 g/l, NaCl 58,5 g/l), le cellule sono state lavate velocemente in PBS e quindi sono state incubate con una soluzione mantenuta a 4°C di PBS contenente il 10% di siero della specie animale dell'anticorpo secondario, per 1 ora e 15 minuti a temperatura ambiente, al fine di ottenere il blocco dei siti aspecifici.

Nel caso di indagine di marcatori citoplasmatici le cellule hanno subito preventivamente permeabilizzazione della membrana cellulare mediante trattamento con una soluzione di H<sub>2</sub>O distillata contenente triton X-100 (Sigma) all'1% per 6 minuti a temperatura ambiente.

E' seguita un'incubazione in camera umidificata a temperatura ambiente per 1 ora con l'anticorpo primario diluito 1:200 in PBS contenente il 3% di siero della specie animale dell'anticorpo secondario, un lavaggio con la stessa soluzione in cui era stato diluito l'anticorpo primario e quindi un'altra incubazione per 30 minuti in camera umidificata a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (biotinilato) diluito in PBS contenente l'1,5% del siero della specie in cui viene prodotto il secondario, come indicato dal protocollo fornito dalla Vector Laboratories, Inc.. Dopo lavaggio in PBS le cellule sono state trattate per 10 minuti al buio a temperatura ambiente con fluorocromo Fluorescein Avidin DCS del Fluorescent Avidin Kit (Vector) diluito 1:500 in soluzione di HEPES 10 mM, NaCl 0,15 M. I preparati così ottenuti sono stati montati con un montante per fluorescenza contenente DAPI (4-6 diamidino-2-fenilindolo) (Vector).

Come controllo negativo sono state usate cellule non incubate con anticorpo primario.

## **Culture di cellule CD105 positive da UCB**

Una volta espansa, dalle colture primarie di cellule fibroblastoidi si è ottenuta una sottopopolazione utilizzando il marker di membrana CD105. La selezione è stata ottenuta con tecnica di immunoseparazione mediante biglie condizionate con anticorpo anti-CD105 (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

### ***1. Condizionamento di biglie magnetiche con anticorpo***

Da una soluzione acquosa di  $4 \times 10^8$  biglie/ml (Dynabeads M-450 Tosylactivated, Dynal) si sono prelevate  $2 \times 10^8$  biglie, le quali sono state trasferite in una provetta sterile posizionata su un magnete e sottoposte a lavaggio con buffer A (PBS 0,1M, pH 7,4). Successivamente è stato aggiunto l'anticorpo specifico a una concentrazione di  $5 \mu\text{g}/10^7$  biglie e la soluzione è stata incubata a  $37^\circ\text{C}$  per 10 minuti, in agitazione.

Si sono aggiunti  $50 \mu\text{l}$  di PBS contenente 0,1% di BSA (Sigma) e si è proseguita l'incubazione a  $37^\circ\text{C}$  dalle 16 alle 24 ore, in agitazione.

In seguito, dalla provetta posta sul magnete si è tolto il buffer A e aggiunto buffer D (PBS, pH 7,4 con 0,1% BSA) per 5 minuti a  $4^\circ\text{C}$ .

Si è effettuato un secondo lavaggio con buffer D per 5 minuti a  $4^\circ\text{C}$  e successivamente lo si è sostituito con buffer E (Tris 0,2M, pH 8,5 con 0,1% BSA) e si è lasciato incubare a  $37^\circ\text{C}$  per 4 ore, in agitazione.

Si è sostituito il buffer E nuovamente con buffer D, mantenendo il contatto per 5 minuti a  $4^\circ\text{C}$ . Si è raggiunto un volume finale di 1ml con buffer D in modo da ottenere una concentrazione di biglie pari a  $2 \times 10^8$  biglie/ml.

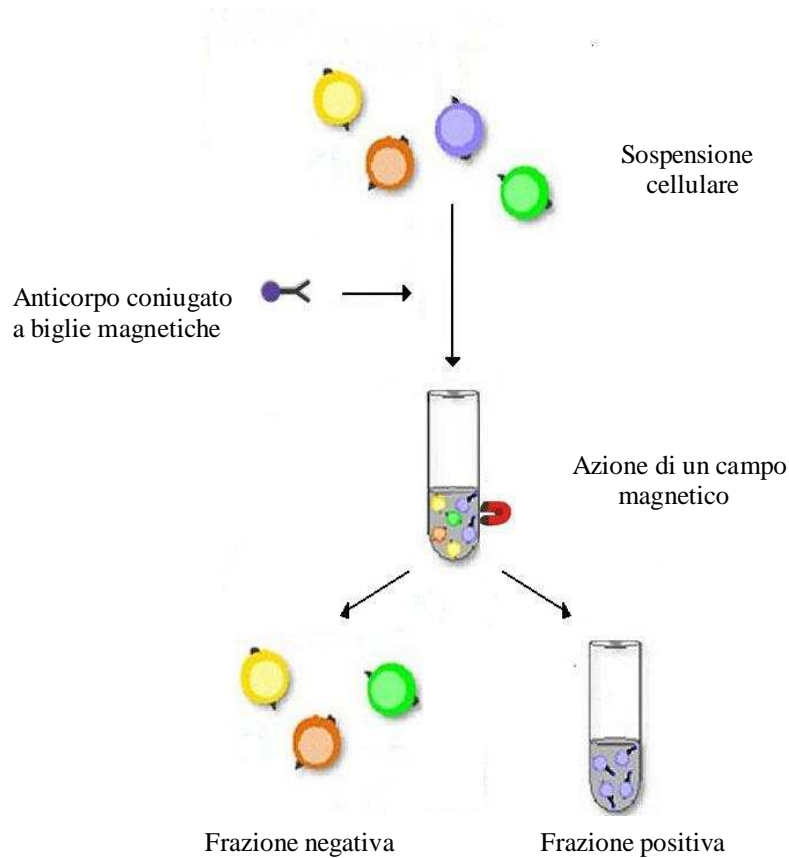
### ***2. Immunoseparazione***

Le cellule, dopo essere state staccate, sono state sospese in buffer D ad una concentrazione pari a  $1 \times 10^6$  cellule/ml.

Le biglie magnetiche condizionate con l'anticorpo sono state aggiunte alla sospensione cellulare, utilizzando un rapporto 1:5 tra cellula e biglia.

Dopo un'incubazione di 30 minuti a  $4^\circ\text{C}$ , con agitazione manuale ogni 5 minuti, la sospensione di cellule e biglie è stata sottoposta all'azione di un campo magnetico per 5 minuti. Il surnatante, contenente la frazione negativa, è stato prelevato e scartato. La frazione positiva, composta dalle cellule legate alle biglie e che pertanto erano rimaste nella provetta

posta sul magnete, è stata allontanata dal campo magnetico e risospesa in terreno di proliferazione.



Immunoseparazione magnetica.

### ***3. Population Doubling e Population Doubling Level***

Le cellule, seminate in piastra Petri 100x20mm a una densità di semina pari a  $14,1 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup>, sono state staccate e contate due volte la settimana dalla settima alla sedicesima generazione. Il calcolo del Population Doubling e del Population Doubling Level è stato effettuato come precedentemente descritto.

### ***4. Caratterizzazione fenotipica mediante analisi citofluorimetrica***

La sottopopolazione di cellule CD105 positive da UCB e' stata sottoposta ad analisi citofluorimetrica per lo studio di espressione dei seguenti antigeni: CD71, CD90, CD105, c-Kit, CXCR4, HLA-DR, CD31, CD34, CD38, CD45, CD166 e integrina beta. Dopo trattamento con una soluzione di EDTA/tripsina, le cellule sono state marcate in modo diretto con gli anticorpi specifici coniugati a fluorocromo: 1) CD105-FITC, CD166-FITC, CD90-

RPE, CD31-RPE, CD14-RPE-Cy5, CD34-RPE Cy5, CD38-FITC (Dako Italia SpA); 2) CD71-RPE, c-Kit-RPE, CXCR4-RPE, HLA-DR-RPE, CD45-RPE, e integrina beta-FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Sono stati utilizzati 10µl di anticorpo per  $10^5 - 10^6$  cellule risospese in 100 µl di soluzione di PBS addizionata con BSA al 2%. In parallelo, e' stato preparato un campione di controllo negativo utilizzando la miscela MultiMix (Dako) contenente anticorpi isotipici coniugati con FITC, RPE e RPE-Cy5. L'incubazione e' stata eseguita al buio, a 4° C, per 30 minuti e i campioni, dopo lavaggio con PBS/BSA al 2% sono stati caricati su citofluorimetro MoFlo high-speed cell sorter (Dako). L'eccitazione dei fluorocromi e' stata eseguita mediante il laser Argon 488 e i segnali acquisiti sono stati poi elaborati mediante l'utilizzo del programma Summit 4.0 (Dako).

### ***5. Valutazione della presenza di cellule fetali nella sottopopolazione CD105 positiva mediante RT-PCR***

Per valutare l'eventuale origine fetale delle cellule CD105 positive è stata verificata l'espressione del gene Sry da parte di cellule ottenute da UCB di neonato maschio.

#### ▪ *Estrazione di RNA con Trizol reagent (Gibco)*

Le cellule dopo esser state tenute in coltura con terreno di proliferazione sono state staccate con soluzione di PBS contenente 0,25% di tripsina e 0,02% di EDTA in rapporto 1:1 (v/v) per 5 minuti a 37°C e centrifugate a 1500rpm per 5 minuti. Quindi sono state lisate in 1ml di Trizol (sufficiente per un numero di cellule fino a  $5 \times 10^6$ ) lasciando a riposo per 5 minuti a temperatura ambiente per consentire la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Si sono aggiunti 0,2ml di cloroformio per creare un gradiente di separazione. La provetta è stata quindi agitata vigorosamente per 15 secondi e lasciata per 2-3 minuti a temperatura ambiente. Si è poi centrifugato a 12000g per 15 minuti a 4°C per separare la fase acquosa da quella organica.

Successivamente, per ottenere la precipitazione dell'RNA, si è trasferita la fase acquosa in un'altra provetta aggiungendo 0,5ml di isopropanolo. Dopo aver lasciato agire per 10 minuti a temperatura ambiente, si è centrifugato a 12000g per 10 minuti a 4°C.

Dopo aver rimosso il surnatante dalla provetta, il pellet è stato lavato con 1ml di etanolo 75% a 4°C e centrifugato a 7500g per 5 minuti a 4°C. Una volta tolto il surnatante, si è lasciato evaporare l'alcool.

L'RNA presente è stato risospeso in 10µl di acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) (Invitrogen).

I campioni di RNA così estratti sono stati conservati a -20°C.

▪ Retrotrascrizione di RNA estratto

3µl di RNA di ciascun campione sono stati retrotrascritti utilizzando 2µl di buffer 10X, 4,4µl di soluzione MgCl<sub>2</sub> 25mM, 8µl di dNTPs Mix 10mM, 1µl di Random Hexamers 50µM, 1µl di RNase Inhibitor 20U/µl e 0,6µl di Multiscribe Reverse Transcriptase 50U/µl (Applied Biosystem).

La retrotrascrizione è stata effettuata con il seguente programma su termociclatore Icyler (Biorad):

25°C per 11 minuti (temperatura di attivazione enzimatica)

42°C per 20 minuti (temperatura ottimale di reazione)

99°C per 5 minuti

12°C per 10 minuti

Come controllo, si è effettuata la retrotrascrizione di 3µl di acqua trattata con DEPC al posto del campione.

▪ Reazione di amplificazione

Il c-DNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato sottoposto ad una reazione di amplificazione, Polymerase Chain Reaction, PCR.

In un volume finale di 12µl si è posto 1µl di c-DNA, con 1,25µl di soluzione MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1,25µl di buffer 10X, 6,8µl di H<sub>2</sub>O, 0,5µl di dNTPs Mix 10mM, 0,2µl di Ampli Taq Gold 5U/µl (Applied Biosystem), 0,5µl di primer senso specifici e 0,5µl di primer antisenso specifici (10pM, Invitrogen).

La soluzione è stata posta in un termociclatore Icyler (Biorad) e sottoposta alle seguenti condizioni di reazione:

*Fase 1*) 95°C per 10 minuti (temperatura di attivazione della Taq Gold e di denaturazione iniziale)

*Fase 2*) 95°C per 30 secondi (temperatura di denaturazione)

*Fase 3*) temperatura di annealing variabile a seconda dei primer per 45 secondi

*Fase 4*) 72°C per 30 secondi (temperatura di estensione)

*Fase 5) 72°C per 10 minuti (temperatura di estensione finale)*

*Fase 6) 15°C*

Le fasi 2, 3, 4 sono state ripetute per 40 cicli.

Come controllo della reazione è stato amplificato il cDNA proveniente dalla retrotrascrizione dell'acqua DEPC.

Come gene housekeeping è stato scelto il gene per la Gliceraldeide-3-Fosfato Deidrogenasi, GAPDH.

I prodotti della reazione di amplificazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% contenente bromuro di etidio (Invitrogen).

Nella seguente tabella sono indicati i geni analizzati e i primer specifici utilizzati.

| Gene  | Primer (senso-antisenso)                             | Lunghezza (bp) | Cicli | Annealing Temp(°C) |
|-------|--|----------------|-------|--------------------|
| GAPDH | 5'AGTCCCTGCCACACTCAGTC3'<br>5'AGGGGTCTACATGGCAACTG3' | 68             | 40    | 60                 |
| Sry   | 5'TCGCACTCTCCTTGTTTTTG3'<br>5'TGGGTCGCTTCACTCTATCC3' | 213            | 40    | 58                 |

Primer impiegati nella reazione di amplificazione

## **Colture primarie di cellule provenienti da UC**

### ***1. Isolamento e coltura di cellule da UC***

Dopo essere stato disinfettato velocemente con Braunol 7,5% (Braun) e lavato in PBS contenente l'1% di soluzione antibiotica-antimicotica, ogni campione di UC è stato privato meccanicamente della vena ombelicale e delle due arterie. La restante gelatina di Wharton è stata quindi ridotta in frammenti molto piccoli mediante forbici.

Tali frammenti sono stati posti in coltura in piastre Petri 100x20mm con terreno di proliferazione costituito da DMEM high glucose (Sigma), 20% di FBS specifico per mesenchimali (StemCell Technologies) e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica (Sigma). Le piastre sono state mantenute a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>, cambiando 2 volte la settimana il terreno. Subcolture cellulari sono state ottenute tramite distacco con soluzione di PBS contenente 0,25% di tripsina e 0,02% di EDTA in rapporto 1:1 (v/v) per 5 minuti a 37°C.

## ***2. Caratterizzazione fenotipica mediante immunocitochimica***

Le cellule primarie ottenute da UC sono state analizzate per la presenza dei seguenti marcatori: CD31, CD34, CD38, CD90, CD105, KDR, (Santa Cruz Biotechnology, Inc), CD40 (Calbiochem), CD45 (Oncogene Research Products), fattore di von Willebrand (Dako) nel seguente modo.

Dopo essere state fissate per 30 minuti a 4°C in paraformaldeide (Sigma) al 4% in tampone ISO 2X, le cellule sono state lavate velocemente in PBS.

Nel caso dell'identificazione di marcatori citoplasmatici o nucleari, si è eseguita la permeabilizzazione della membrana cellulare mediante trattamento con una soluzione di H<sub>2</sub>O distillata contenente triton X-100 (Sigma) all'1% per 6 minuti a temperatura ambiente. Quindi le cellule sono state poste in una soluzione di PBS contenente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 15% per 40 minuti, a temperatura ambiente, al buio al fine di disattivare le perossidasi endogene. In seguito, sono state lavate con PBS e incubate con una soluzione di PBS mantenuta a 4°C e contenente il 10% di siero della specie animale dell'anticorpo secondario, per 1 ora e 15 minuti a temperatura ambiente, per ottenere il blocco dei siti aspecifici.

E' seguita un'incubazione di 60 minuti in camera umidificata a temperatura ambiente con l'anticorpo primario diluito 1:100 in PBS contenente il 3% di siero della specie animale dell'anticorpo secondario, un lavaggio con la stessa soluzione in cui era stato diluito l'anticorpo primario e quindi un'altra incubazione per 30 minuti in camera umidificata a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (biotinilato) diluito in PBS contenente l'1,5% del siero della specie in cui era stato prodotto il secondario, come indicato dal protocollo fornito dalla Vector Laboratories. Le cellule sono state sottoposte di nuovo a lavaggio con PBS e incubate per 30 minuti in camera umidificata a temperatura ambiente, al buio, con una soluzione A/B (Reagente A = Avidina, Reagente B = perossidasi biotinilata) del kit ABC (Vector), preparata precedentemente mettendo 2 gocce di reagente A + 2 gocce di reagente B per ogni 5ml di PBS e lasciata a riposare per 30 minuti.

Dopo lavaggio in PBS le cellule sono state poste in una soluzione rivelatrice (cromogena) contenente 3, 3'diaminobenzidina (DAB), substrato delle perossidasi, preparata utilizzando 100µl di buffer, 200µl di DAB e 100µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (Vector) in 5ml di acqua distillata e mantenuta al buio.

La soluzione così preparata è stata aggiunta alle cellule e si è seguita la reazione enzimatica al microscopio ottico. Dopo un tempo variabile dai 5 ai 10 minuti la reazione è stata bloccata con acqua distillata.

La colorazione di contrasto è stata ottenuta con ematossilina (Merck) e il preparato è stato montato con Acquovitrex (Carlo Erba), montante acquoso.

### **Culture di cellule CD105 positive da UC**

Le cellule CD105 positive sono state ottenute da colture primarie di UC tramite immunoseparazione. Sono state poste in coltura con terreno di proliferazione e, una volta espanse, sono state sottoposte ad analisi immunocitochimica come precedentemente descritto. E' stata valutata l'espressione dei seguenti marcatori: CD31, CD34, CD38, CD90, CD105, KDR, (Santa Cruz Biotechnology, Inc) CD45 (Oncogene Research Products), CD54 (Sigma), SMA e von Willebrand Factor (Dako).

### **Differenziazione adipogenica ed osteogenica *in vitro* di cellule CD105 positive da UCB e UC**

#### ***1. Induzione dei differenziamenti***

Le cellule CD105 positive sono state seminate in chamber slides da 4 pozzetti (Falcon) ad una densità di 8000 cellule/cm<sup>2</sup> e quindi sottoposte a differenziazione adipogenica e osteogenica mediante uso di terreni induttivi forniti dalla ditta Cambrex (hMSC Differentiation Bulletkit Adipogenic e hMSC Differentiation Bulletkit Osteogenic).

Come controllo negativo per tutte le differenziazioni si sono utilizzate cellule coltivate con solo terreno di proliferazione. Successivamente, le colture sono state fissate a intervalli di tempo variabili a seconda della linea cellulare indotta.

I terreni sono stati cambiati 2 volte alla settimana.

#### ***2. Metodiche per valutare i differenziamenti***

##### **Analisi morfologica**

Le cellule, durante il processo di differenziazione, sono state osservate tutti i giorni al microscopio ottico e le immagini sono state acquisite tramite camera a testata raffreddata DS-5Mc e unità di controllo DS-L1 (NIKON).



### Analisi mediante immunofluorescenza

Le cellule, alla fine del processo di differenziazione, sono state caratterizzate come sopra descritto per la presenza di leptina e Ob-receptor, marcatori di linea adipogenica (Santa Cruz Biotechnology, In).

Il controllo era rappresentato da cellule coltivate in terreno proliferativo.

### Analisi mediante RT-PCR

L'espressione di marcatori di linea adipogenica è stata valutata sulle colture a tempi precisi dall'inizio dell'induzione con terreno specifico, come precedentemente descritto.

I marcatori utilizzati con i rispettivi primers, lunghezze dell'amplificato, temperature di annealing e cicli di amplificazione sono riportati nella seguente tabella.

Come gene house keeping si è utilizzato GAPDH.

| Gene                | Primer (senso-antisenso)                              | Lunghezza (bp) | Cicli | Annealing Temp(°C) |
|---------------------|---|----------------|-------|--------------------|
| GAPDH               | 5'AGTCCCTGCCACACTCAGTC3'<br>5'AGGGGTCTACATGGCAACTG3'  | 68             | 35    | 60                 |
| adiponectina        | 5'TGAGAAGGGTGAGAAAGGA3'<br>5'GGTAGAGAAGAAAGCCTGTGA3'  | 533            | 32    | 64                 |
| lipoproteina lipasi | 5'CTGGTCGAAGCATTTGGAAT3'<br>5'TGTAGGGCATCTGAGAACGAG3' | 421            | 37    | 62                 |

Primers impiegati nella reazione di amplificazione

### Saggio Oil-Red-O per la presenza di trigliceridi

La presenza di granuli lipidici nelle colture cellulari indotte a differenziamento adipogenico è stata determinata con la colorazione Oil-Red-O. Le cellule, fissate per 10 minuti a 4°C in acetone conservato a -20°C, sono state lavate in H<sub>2</sub>O di fonte e incubate per 15 minuti con una soluzione di isopropanolo allo 0,5% di Oil-Red-O (Sigma), filtrata e diluita al 60% in H<sub>2</sub>O distillata. Successivamente le cellule sono state lavate in H<sub>2</sub>O di fonte e contrastate con ematossilina per un tempo variabile dai 30 secondi a un minuto. Dopo ripetuti lavaggi in H<sub>2</sub>O di fonte, i preparati sono state montati con Histovitrex (Carlo Erba).

Come controllo si sono utilizzate cellule coltivate in terreno proliferativo.

### Saggio von Kossa per la deposizione di sali di calcio

La capacità di produrre matrice mineralizzata da parte delle cellule indotte a differenziamento osteogenico è stata valutata mediante colorazione di von Kossa [Jainwal *et al.*, 1997]. Le cellule fissate in acetone a 4°C sono state reidratate per 5 minuti con H<sub>2</sub>O milliQ, incubate in una soluzione acquosa di nitrato d'argento all'1% (Sigma) ed esposte a luce UV (Philips HPW) per 45 minuti. Successivamente le cellule sono state lavate con H<sub>2</sub>O milliQ, trattate con soluzione acquosa contenente 3% di tiosolfato di sodio (Sigma) per 5 minuti, lavate e colorate con soluzione acquosa allo 0,2% di safranina (Sigma) filtrata. Infine i preparati sono stati montati con Eukitt (O.Kindler GmbH & Co.).

Il controllo era rappresentato dalle cellule coltivate in terreno proliferativo.

## **Differenziamento epatocitario *in vitro* di cellule CD105 positive da UCB e UC**

### **Su supporto di Matrigel™**

Le cellule CD105 positive da UC sono state seminate in chamber slides da 8 pozzetti precedentemente condizionati con Matrigel™ (BD Biosciences) lasciato scongelare per una notte in ghiaccio a 4°C, diluito in DMEM in rapporto 1:10, piastrato e incubato a 37°C per un'ora prima della semina. Come terreno differenziativo è stato utilizzato DMEM high glucose contenente il 15% di FBS, l'1% di soluzione antibiotica-antimicotica e addizionato di fattori di crescita favorevoli al differenziamento epatocitario: 10<sup>-7</sup>M desametasone (Sigma), 10mg/ml ITS supplement (25mg/ml insulina, 25mg/ml transferrina, and 25µg/ml sodio selenite, Roche), 20ng/ml Hepatocyte Growth Factor (HGF, PeproTech EC), 100ng/ml Fibroblast Growth Factor-4 (FGF-4, PeproTech EC), 10 ng/ml Oncostatine M (OSM, Sigma). Come controllo sono state utilizzate cellule coltivate in terreno proliferativo.

Le cellule fissate a 14 e 30 giorni dall'inizio dell'induzione sono state analizzate tramite immunocitochimica, come precedentemente descritto, per l'espressione dei marcatori di differenziamento HNF4-alfa (Hepatocyte Nuclear Factor 4 alfa), c-met, alfa fetoproteina (AFP) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ed albumina (Sigma).

Come controllo negativo, sono state usate cellule non incubate con anticorpo primario. Gli anticorpi sono stati utilizzati diluiti 1:200.

### **Su supporto di PuraMatrix™**

Le cellule CD105 positive da UCB sono state incapsulate in PuraMatrix™(BD), seguendo il protocollo di incapsulazione 3D fornito dal produttore e utilizzando inserti per colture cellulari Millicell 0,4µm (Millipore). Le cellule così incapsulate sono state trattate sia con il terreno differenziativo sopra descritto che con il terreno proliferativo, come controllo. A 12 giorni dall'inizio dell'induzione è stata valutata l'espressione del marcatore di differenziamento precoce HNF4-alfa tramite immunofluorescenza con anticorpo anti-HNF4-alfa (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluito 1:100.

### **Su matrice acellulare omologa di fegato**

#### ***1. Ottenimento della matrice acellulare***

La matrice acellulare è stata ottenuta da campioni di fegato umano provenienti da interventi di resezione epatica e conservati a -20°C. Tali campioni sono stati scongelati rapidamente a temperatura ambiente e quindi tagliati al criostato raffreddato a CO<sub>2</sub> (Jung) per ottenere delle sezioni dello spessore di 200µm. Le sezioni raccolte sono state lavate in PBS sterile contenente l'1% di soluzione antibiotica-antimicotica (AF) e quindi sottoposte a 1 ciclo di decellularizzazione secondo il metodo detergente-enzimatico di Meezan [Meezan E, 1975] parzialmente modificato che prevede i seguenti passaggi:

- 1) 2 lavaggi di 20 minuti ciascuno in PBS addizionato dell'1% di AF a 4°C;
- 2) passaggio in soluzione acquosa di sodio deossicolato al 4% (peso/volume) (Fluka) per 14 minuti a temperatura ambiente;
- 3) 2 lavaggi veloci in PBS;
- 4) 2 passaggi in acqua sterile addizionata all'1% di AF per 20 minuti a 4°C per consentire la lisi cellulare;
- 5) passaggio in soluzione di deossiribonucleasi I (Sigma) per 7 minuti (una vial da 2000 unità sciolta in 40 ml di soluzione acquosa sterile di NaCl 1M);
- 6) lavaggio veloce in PBS addizionato all'1% di AF.

Prima dell'uso, la matrice così ottenuta è stata conservata per 24 ore a 4°C in PBS contenente l'1% di AF.

## ***2. Analisi istochimica / immunoistochimica***

### *Inclusione in paraffina*

I campioni di matrice fissati per 24 ore in PBS contenente formalina al 4% (Sigma) sono stati disidratati mediante la scala ascendente degli alcoli nel seguente modo: 2 ore in alcool 70%, 2 ore in alcool 80%, 2 ore in alcool 90%, una notte in alcool 95%, 2 ore in alcool 100%, 2 ore in xilolo/alcool 100% (1:1, v/v) e quindi in xilolo per altre 2 ore. E' seguito quindi passaggio in paraffina a 60°C per 2 ore per l'impregnazione e quindi l'inclusione in vaschette metalliche. Al microtomo (Histoslide 2000, Reichert-Jung), sono state ottenute sezioni dello spessore di 5-7µm, che sono state fatte aderire su vetrini portaoggetti SuperFrost Plus (Menzel-Glaser).

### *Analisi istochimica*

E' stata eseguita mediante colorazione con ematossilina-eosina (Merck); le sezioni sono state preventivamente sparaffinate tramite due passaggi in xilolo, ciascuno di 5 minuti, e idratate tramite passaggi di 5 minuti ciascuno in una scala discendente di alcool: alcool 100%, alcool 95%, alcool 80%, alcool 70%, alcool 50%, alcool 30%, alcool 10%, per finire con un passaggio di 15 minuti in acqua distillata. In seguito ciascuna sezione è stata trattata con ematossilina per 2 minuti, lavata 2 volte velocemente in acqua distillata e contrastata per 6 minuti in acqua di fonte, quindi è stata trattata con eosina per 1 minuto e lavata ancora velocemente in acqua distillata.

Dopo la colorazione i preparati sono stati disidratati tramite passaggi veloci in alcool 80%, alcool 95%, alcool assoluto, trattati con xilolo e montati con Eukitt.

E' stata inoltre eseguita la colorazione Masson tricromica utilizzando il kit Masson trichrome Goldner (Bio-optica) seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

Le osservazioni sono state effettuate con microscopio ottico DM2000 (Leica).

### *Analisi immunoistochimica*

Le sezioni, sparaffinate e idratate, sono state trattate con anticorpo anti-HLA-A diluito 1:100. Essendo un antigene di superficie non è stato necessario ricorrere a permeabilizzazione della membrana cellulare. Come sistema di rivelazione è stata utilizzata la 3, 3'diaminobenzidina (DAB).

La colorazione di contrasto è stata ottenuta con ematossilina (Merck) e il preparato è stato montato con Acquovitrex (Carlo Erba), montante acquoso.

Come controllo negativo sono state usate sezioni non incubate con anticorpo primario.

### ***3. Semina di cellule CD105 positive da UCB su matrice***

Dopo 24 ore dalla preparazione, la matrice è stata suddivisa in pozzetti di piastra da 24 pozzetti, tenuta ferma con anellini di acciaio e lasciata aderire al fondo per circa un'ora prima della semina delle cellule.

$2 \times 10^5$  cellule CD105 positive da UCB sono state seminate sulla matrice per ogni pozzetto da 24 con terreno proliferativo o con terreno differenziativo epatocitario. Come controllo è stata tenuta incubata la sola matrice in presenza di terreno sia di proliferazione che differenziativo epatocitario.

### ***4. Osservazione tramite microscopia elettronica a scansione***

Le colture sono state fissate con glutaraldeide al 3% (Merck) in tampone sodio cacodilato (Sigma) 0,1M pH 7,2 a 24 ore e a 14 giorni dalla semina delle cellule. Dopo disidratazione con scala ascendente degli alcoli, crytical point drying e metallizzazione in oro, i preparati sono stati esaminati al microscopio elettronico a scansione (Cambridge Stereoscan).

### ***5. Valutazione della vitalità delle cellule su matrice***

Per valutare la vitalità delle cellule CD105 positive da UCB seminate su matrice è stato eseguito saggio colorimetrico con kit Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega): le colture cellulari sono state incubate per 2 ore con un reagente contenente un sale di tetrazolo [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS]. Tale composto è bioridotto dalle cellule in formazano, un prodotto colorato che è solubile nel terreno di coltura. La conversione è compiuta da NADPH o NADH prodotti dalle deidrogenasi in cellule metabolicamente attive e quindi è indice di cellule vitali. E' seguita lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 490nm mediante lettore Microplate autoreader EL 13 a 24, 48, 76 ore e 7 giorni dalla semina delle cellule su matrice ( $15 \times 10^4$  cellule/pozzetto da piastra da 24). Le colture sono state trattate sia con terreno proliferativo che differenziativo epatocitario e come controllo si sono considerate le cellule seminate direttamente su piastra rispettivamente con terreno proliferativo e differenziativo. I risultati sono stati espressi in percentuale rispetto al controllo, a cui è stato assegnato arbitrariamente il valore 100.

## ***6. Valutazione della produzione di albumina umana***

E' stato utilizzato l'Albumin Fluorescence Assay Kit (Fluka). I surnatanti provenienti da colture di cellule e matrici trattate sia con terreno proliferativo che con terreno differenziativo sono stati raccolti a 7 e 14 giorni dalla semina dopo un'incubazione di 4 ore con terreno privo di siero. I campioni sono stati conservati a -20 °C fino al momento dell'uso. A ciascuno di essi è stato aggiunto il colorante albumin blue AB 580 (2,5 ml di reagente per 0,5ml di campione) ed è seguita immediatamente la lettura della fluorescenza mediante spettrofluorimetro FP 6500 Jasco (lunghezza d'onda di eccitazione pari a 600nm e lunghezza d'onda di emissione pari a 630nm). Le concentrazioni di albumina sono state ottenute mediante interpolazione dalla retta di taratura eseguita con programma Origin.

## **Differenziamento epatocitario *in vivo* delle cellule CD105 positive da UCB e da UC**

Per valutarne la capacità differenziativa epatocitaria *in vivo*, le cellule CD105 positive sono state somministrate in ratti Lewis che avevano subito un danno chimico acuto a livello epatico.

### ***1. Induzione del danno***

Previo consenso veterinario, sono stati allestiti due modelli animali di induzione chimica di danno epatico:

A) Modello di danno epatico da tetracloruro di carbonio, CCl<sub>4</sub>: dopo esser stati anestetizzati con Zoletil (Tiletamina cloridrato in associazione con Zolazepam cloridrato-40mg/Kg) e Rompum (Xilazina-2mg/Kg), 20 ratti Lewis maschi hanno ricevuto un'iniezione intraperitoneale di CCl<sub>4</sub> (1 ml/kg peso corporeo, densità 1,594 gr/ml, Sigma) sciolto in un egual volume di olio d'oliva e successivamente filtrato.

B) Modello di danno epatico da alcool allilico: 7 ratti Lewis maschi, anestetizzati come sopra descritto, sono stati trattati con un'iniezione intraperitoneale di alcool allilico (0,93 mmol/kg peso corporeo, Sigma).

### ***2. Somministrazione di cellule CD105 positive da UCB e da UC***

Dopo 48 ore dall'induzione del danno acuto, previa anestesia, sono state somministrate mediante iniezione intraperitoneale (ago da 26 G) 10<sup>6</sup> cellule CD105 positive sospese in

0,5ml di PBS. Le cellule sono state staccate dalle piastre di coltura mediante soluzione di tripsina-EDTA, contate, pelletizzate e risospese in PBS nel numero desiderato e velocemente iniettate.

Dei ratti sopravvissuti al trattamento con CCl<sub>4</sub>, 5 sono stati utilizzati per valutare il danno a 24, 48 ore e 5, 9 e 16 giorni dall'induzione, 2 hanno ricevuto cellule CD105 positive da UCB, 4 hanno ricevuto cellule CD105 positive da UC, 3 hanno ricevuto solo PBS (controlli).

Dei ratti trattati con alcool allilico, 1 è stato utilizzato per valutare il danno a 48 ore, 2 hanno ricevuto cellule CD105 positive da UCB, 2 hanno ricevuto cellule CD105 positive da UC, 2 hanno ricevuto solo PBS (controlli).

### ***3. Valutazione istologica degli organi***

Gli animali trattati con CCl<sub>4</sub> sono stati sacrificati mediante CO<sub>2</sub> a 24, 48 ore e a 5, 9 e 16 giorni dall'induzione del danno per la valutazione dell'evoluzione del danno, mentre quelli trattati con CCl<sub>4</sub> ma che avevano ricevuto le cellule CD105 positive o il PBS (controlli) sono stati sacrificati a 7 e 14 giorni dalla somministrazione della sospensione cellulare e quindi rispettivamente a 9 e 16 giorni dall'induzione del danno.

1 animale trattato con alcool allilico è stato sacrificato mediante CO<sub>2</sub> a 48 ore dal danno per la valutazione del medesimo; gli animali trattati con alcool allilico e che avevano ricevuto solo PBS (controlli) sono stati sacrificati a 4 e 9 giorni dall'induzione del danno, mentre gli animali trattati con alcool allilico e che avevano ricevuto le cellule CD105 positive sono stati sacrificati 48 ore e 7 giorni dopo la somministrazione delle cellule quindi rispettivamente a 4 e 9 giorni dall'induzione del danno.

Sono stati prelevati oltre al fegato, reni, milza, polmoni e cuore al fine di valutare un'eventuale localizzazione ectopica delle cellule iniettate.

Gli organi dopo esser stati lavati in PBS e ridotti in pezzi, sono stati fissati per 24 ore in soluzione di PBS contenente il 4% di formalina (Sigma).

In seguito ciascun pezzo è stato incluso in paraffina.

Sezioni di 5 µm ottenute al microtomo sono state colorate con ematossilina-eosina (Merck), come precedentemente descritto.

### ***4. Valutazione della presenza di cellule umane mediante immunistochemica***

Per valutare la presenza di cellule umane è stata verificata l'espressione del marcatore HLA-A. A tale scopo è stata eseguita indagine immunistochemica con specifico anticorpo anti- HLA-A diluito 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) su sezioni di fegato e di reni appartenenti ai

ratti trattati e non trattati con cellule CD105 positive. Come controllo negativo si sono utilizzate delle sezioni in cui non è stata eseguita l'incubazione con l'anticorpo primario.



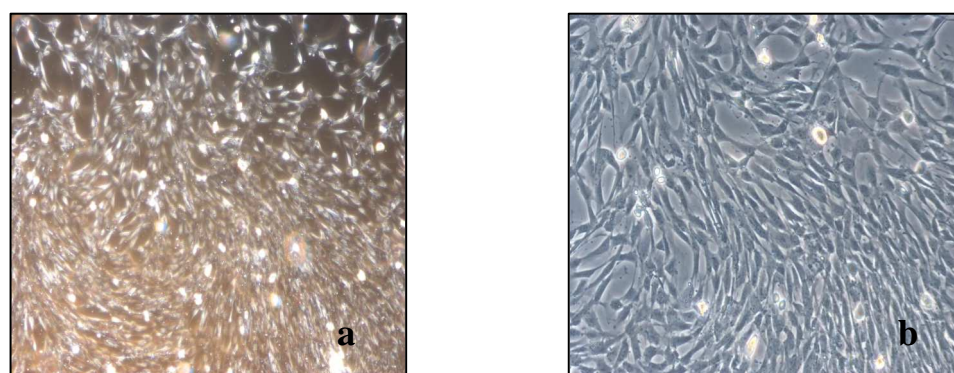


## RISULTATI

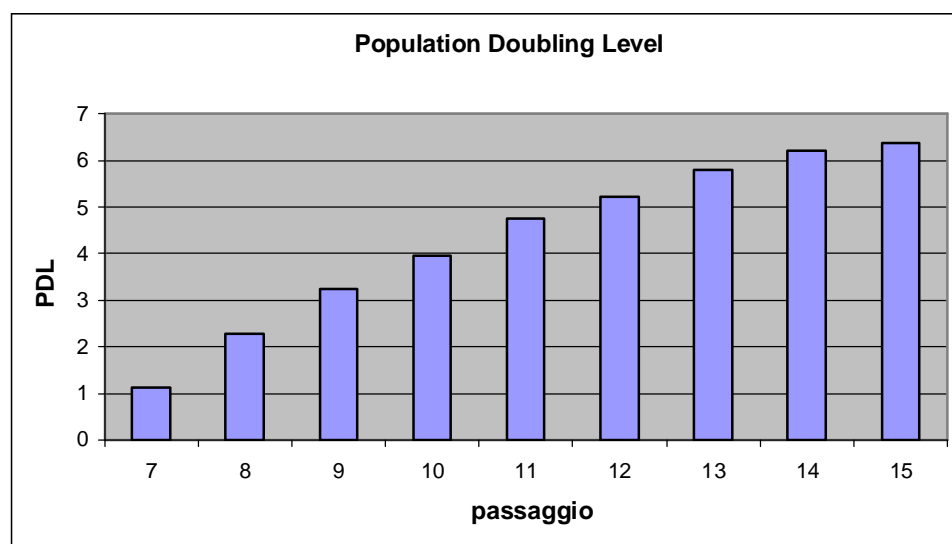
### Culture primarie di cellule provenienti da UCB

Dei 72 campioni di UCB processati, 10 hanno dato origine a colonie di cellule con morfologia fibroblastoide (13% del totale) visibili in coltura a 14 giorni dall'isolamento (**Fig. 1**).

Tali cellule sono state mantenute in coltura al massimo fino alla diciottesima generazione e nel periodo tra l'ottava e la sedicesima generazione sono stati raggiunti in media 6,4 raddoppi di popolazione cumulativi senza riscontrare variazioni di morfologia cellulare (**Fig. 2**).

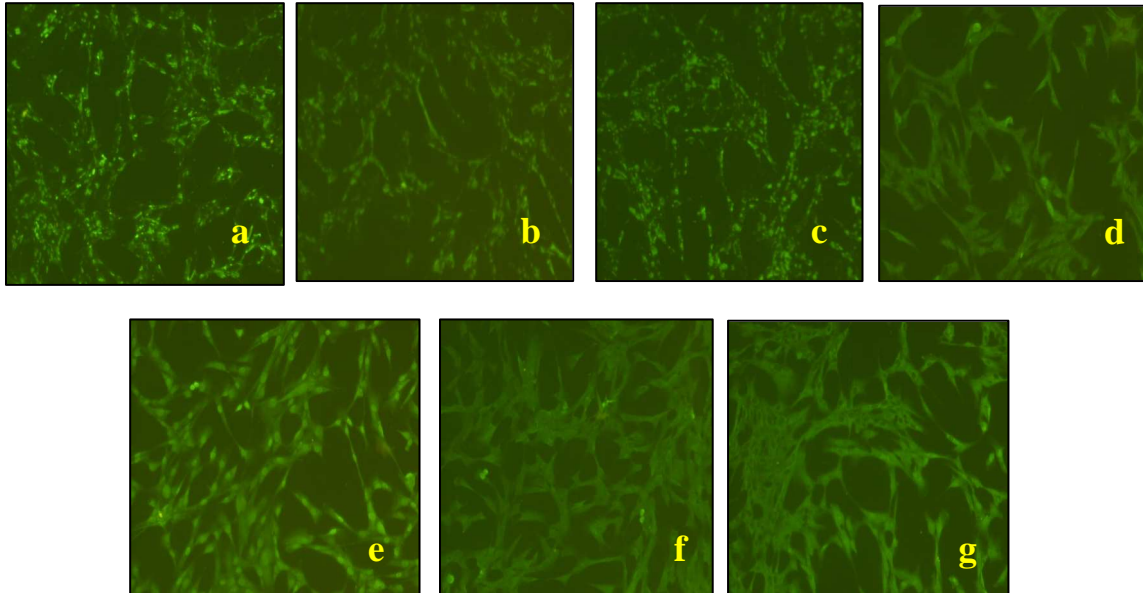


**Fig.1.** Microscopia ottica a contrasto di fase di colture primarie di cellule fibroblastoidi da UCB a 14 giorni dall'isolamento. Ingrandimenti: a) x50; b) x100.



**Fig. 2.** Population Doubling Level (PDL) di cellule fibroblastoidi da UCB

La caratterizzazione fenotipica mediante immunofluorescenza ha rivelato che tali cellule esprimevano CD54, CD73, CD90, CD105, CD166, nestina, KDR e HLA-A (**Fig. 3**), mentre non esprimevano CD14, CD31, CD34, CD38, CD45, CD133 e SMA.

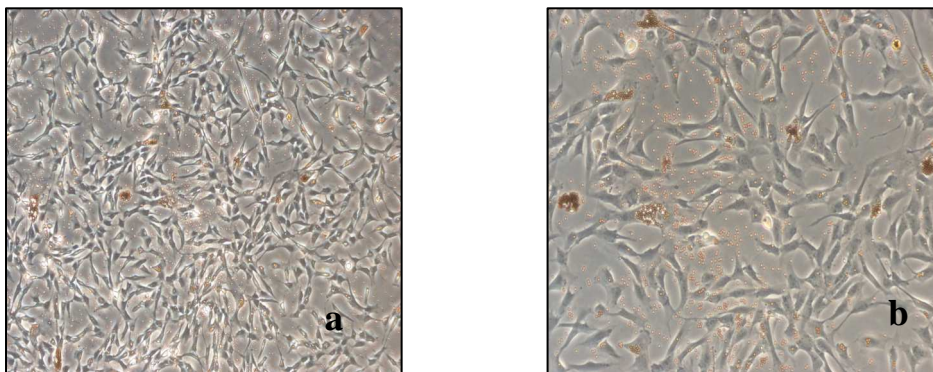


**Fig. 3.** Immunofluorescenza su colture primarie di cellule da UCB trattate con anticorpi anti-CD54 (a), -CD90 (b), -CD105(c), -CD166 (d), -nestina (e), -KDR (f), -HLA-A (g). Ingrandimenti x100.

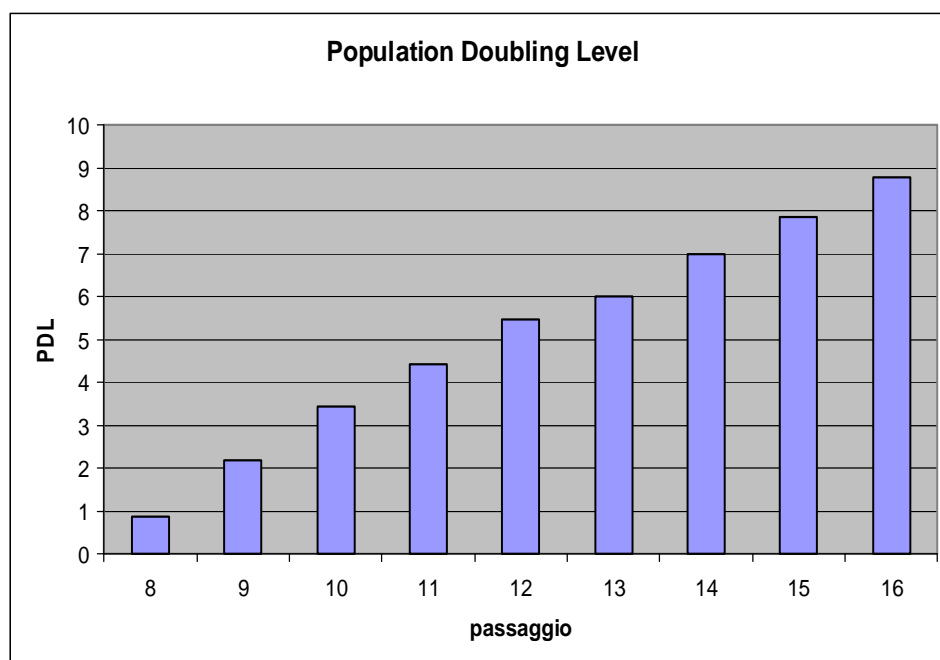
### Colture di cellule CD105 positive da UCB

Le cellule CD105 positive isolate dalle colture primarie di UCB mediante immunoseparazione presentavano morfologia fibroblastoide (**Fig. 4**).

Proliferavano fino alla diciassettesima generazione e nel periodo tra la nona e la diciassettesima generazione sono stati raggiunti in media 8,8 raddoppi di popolazione cumulativi senza riscontrare variazioni di morfologia cellulare (**Fig. 5**).



**Fig.4.** Colture di cellule CD105 positive da UCB. Ingrandimenti: a x50 e b x100.

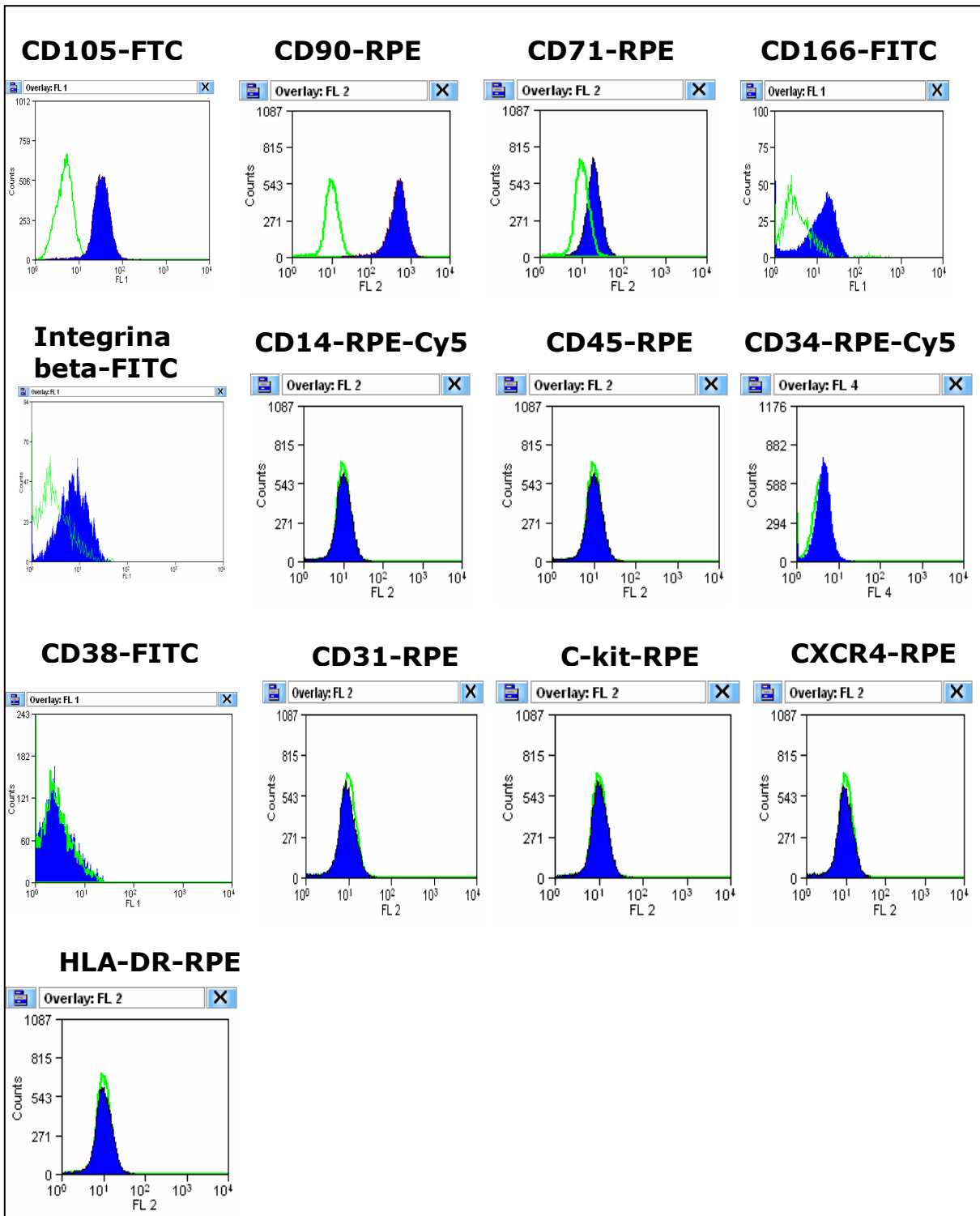


**Fig. 5.** Population Doubling Level (PDL) di cellule CD105 positive da UCB.

L'analisi citofluorimetrica (**Fig. 6**), condotta per caratterizzare fenotipicamente la sottopopolazione cellulare, ha portato ai risultati riassunti nella seguente tabella:

| Antigene       | Espressione |
|----------------|-------------|
| CD105          | +           |
| CD90           | ++          |
| CD71           | +/-         |
| CD166          | +/-         |
| INTEGRINA BETA | +/-         |
| CD14           | -           |
| CD45           | -           |
| CD34           | -           |
| CD38           | -           |
| CD31           | -           |
| c-Kit          | -           |
| CXCR4          | -           |
| HLA-DR         | -           |

+: espressione dell'antigene;  
 ++: alta espressione dell'antigene;  
 +/-: popolazione parzialmente positiva, debole espressione dell'antigene;  
 -: nessuna espressione dell'antigene.



**Fig. 6.** Istogrammi di citofluorimetria che mostrano l'immunofenotipo delle cellule CD105 positive da UCB (picco blu) rispetto al controllo negativo (picco verde). Come controllo negativo è stato utilizzato anticorpo isotipico di topo IgG1 multicolour (FITC / RPE / RPE Cy5).

Infine dall'analisi mediante RT-PCR è risultato che le cellule CD105 positive ottenute da UCB di neonato maschio esprimevano il gene Sry (213pb), gene presente solo sul cromosoma Y (**Fig. 7**) a indicazione della presenza di cellule di derivazione fetale in tale sottopopolazione.



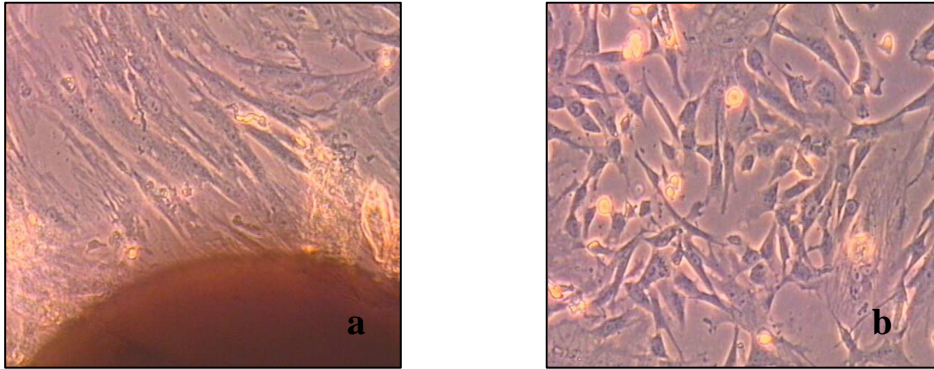
**Fig. 7.** RT-PCR delle cellule CD105 positive da UCB per l'espressione del gene Sry (213pb): cellule da UCB di neonato maschio (linea 4); cellule da UCB di neonato femmina (linea 5); espressione del gene housekeeping GAPDH (68pb) nei campioni (linea 1, 2); controllo della retrotrascrizione (linea 3 e 6). M, marcatore di peso molecolare.

### **Culture primarie di cellule provenienti da UC**

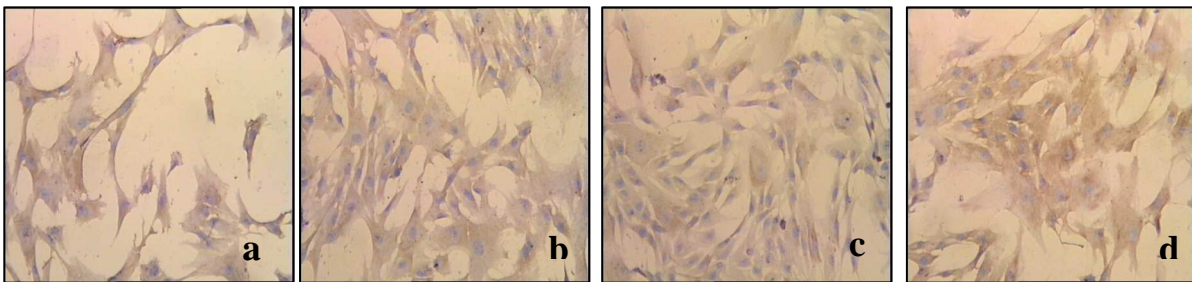
Dei 76 campioni di UC raccolti, 27 hanno dato origine a culture cellulari (36% dei campioni). Dopo 10 giorni di coltura si potevano notare cellule fibroblastoidi fuoriuscire dai frammenti di gelatina posti in piastra e occupare l'intera superficie di coltura nell'arco di 17-20 giorni (**Fig. 8**).

Tali cellule hanno dimostrato buona capacità proliferativa venendo mantenute in coltura fino alla diciassettesima generazione. Dall'analisi immunocitochimica condotta su cellule al secondo passaggio è emerso che le stesse risultavano negative per CD31, CD34, CD38, CD40, CD45, mentre erano positive per CD105, CD90, KDR e fattore di von Willebrand (**Fig. 9**).





**Fig. 8.** Microscopia ottica a contrasto di fase di colture cellulari primarie da gelatina di Wharton a 10 (a) e 17 (b) giorni dall'inizio della coltura. Ingrandimenti x100.

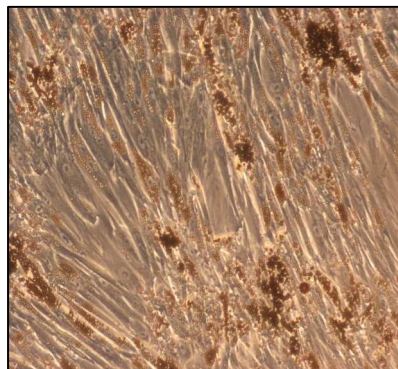


**Fig. 9:** Colture primarie di cellule estratte da cordone ombelicale trattate con anticorpi anti-CD105 (a), -KDR (b), -CD90 (c), -von Willebrand Factor (d). Ingrandimenti x100.

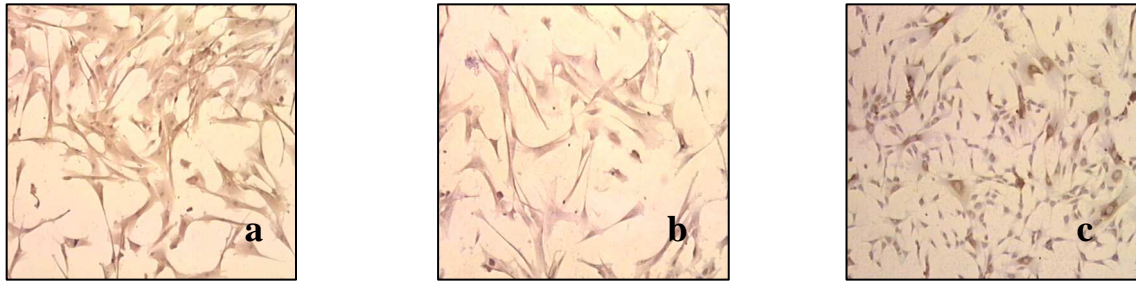
### **Colture di cellule CD105 positive da UC**

Dalle colture primarie di cellule da UC umano sono state isolate cellule esprimenti l'antigene di superficie CD105 mediante immunoseparazione con biglie (Dynal) condizionate con anticorpo anti-CD105. Queste cellule presentavano morfologia fibroblastoide (**Fig. 10**).

Esse hanno proliferato fino alla sedicesima generazione senza cambiamenti di morfologia e alla all'analisi immunocitochimica sono risultate negative per CD34, CD38, CD45, CD31, KDR, SMA e von Willebrand Factor, positive invece per CD105, CD90, CD54 (**Fig. 11**).



**Fig.10.** Microscopia ottica a contrasto di fase di colture di cellule CD105 positive da UC. Ingrandimento x100.



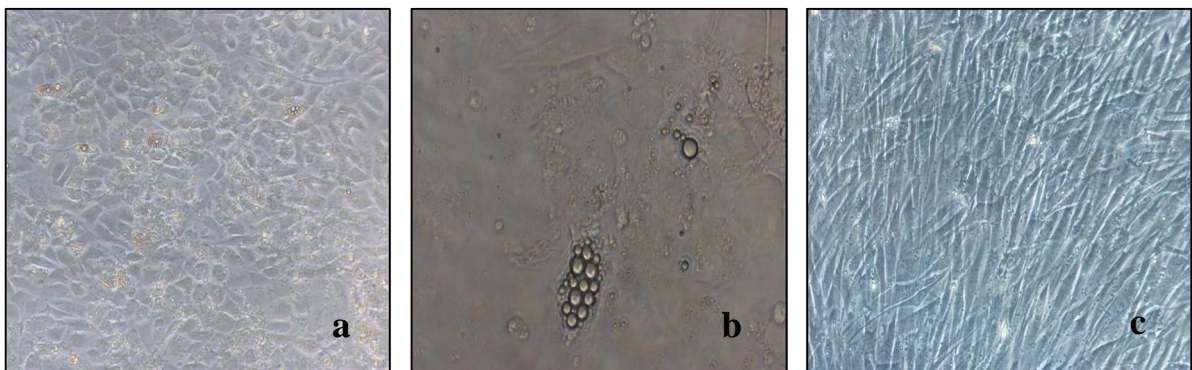
**Fig. 11:** Immunocitochimica con anticorpi anti-CD105 (a), -CD90 (b), -CD54 (c). a, b, ingrandimento x50; c ingrandimento x40.

### Differenziazione adipogenica ed osteogenica *in vitro* di cellule CD105 positive da UCB e UC

Dopo 11 giorni di coltura in terreno differenziativo adipogenico le cellule CD105 positive da UCB presentavano morfologia rotondeggiante e nel citoplasma di alcune di loro erano ben visibili vacuoli (**Fig. 12**) che si sono confermati essere lipidici mediante colorazione Oil-Red-O (**Fig. 13**).

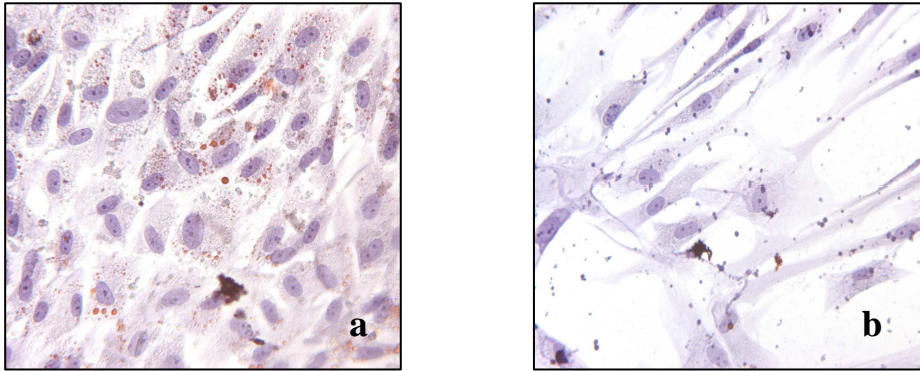
Tali cellule esprimevano leptina e il suo recettore (Ob receptor) a 18 giorni dall'inizio del differenziamento, come evidenziato dall'analisi all'immunofluorescenza (**Fig. 14**).

Inoltre a 13 giorni dall'induzione è stata rilevata espressione di adiponectina (533pb) e lipoproteina lipasi (421pb) mediante RT-PCR (**Fig. 15**).

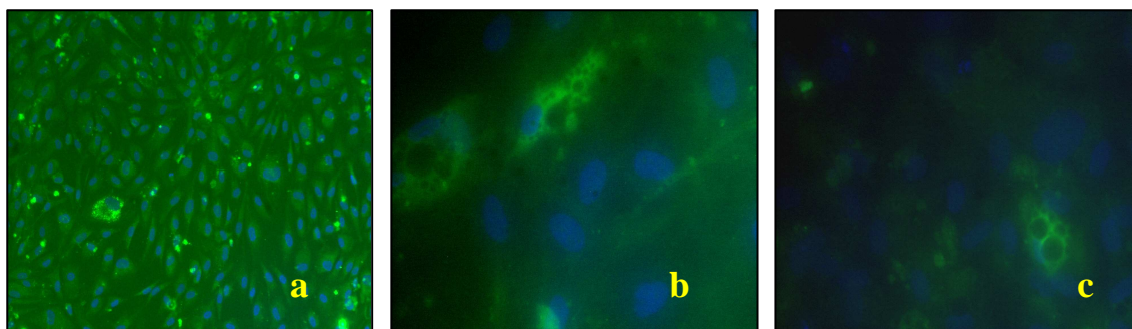


**Fig. 12.** Microscopia ottica a contrasto di fase di colture di cellule CD105 positive da UCB dopo 11 giorni in terreno adipogenico (a e b) e in terreno proliferativo (c). a, c ingrandimento x100, b ingrandimento x400.

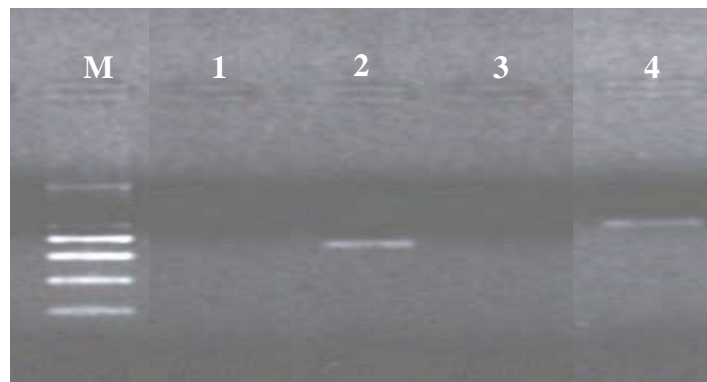




**Fig. 13.** Colorazione Oil-Red-O di colture di cellule CD105 positive da UCB dopo 18 giorni in terreno adipogenico (a) e in terreno proliferativo (b). Ingrandimento x250.

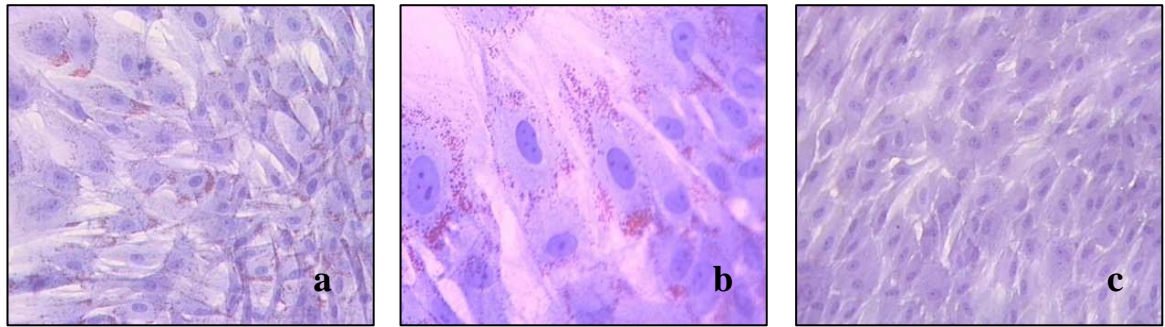


**Fig. 14.** Immunofluorescenza su colture di cellule CD105 positive da UCB trattate con anticorpi anti-leptina (a, b), -anti Ob receptor (c). a, ingrandimento x100; b, c ingrandimento x400.



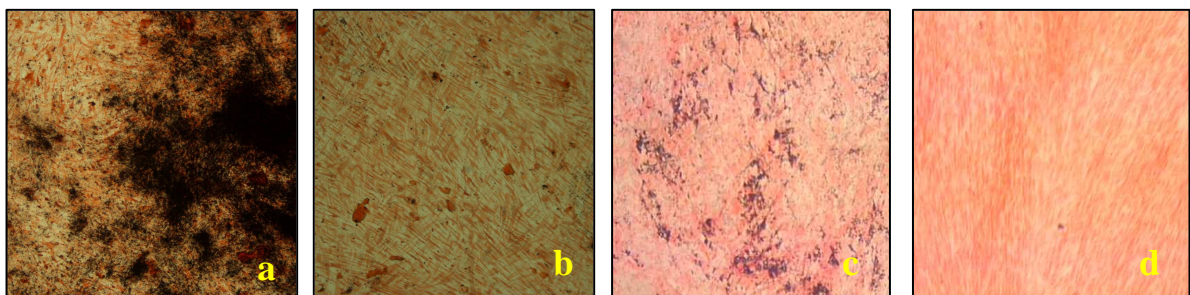
**Fig. 15.** RT-PCR di cellule CD105 positive da UCB trattate per 13 giorni con terreno adipogenico per l'espressione di lipoproteina lipasi (linea 2, 421pb) e di adiponectina (linea 4, 533pb); controllo della retrotrascrizione (linea 1, 3). M, marcatore di peso molecolare.

Le cellule CD105 positive da UC già a 9 giorni dall'inizio dell'induzione adipogenica assumevano una forma rotondeggiante e presentavano nel citoplasma vacuoli di natura lipidica in quanto positivi alla colorazione Oil-Red-O (**Fig. 16**).



**Fig. 16.** Colture di cellule CD105 positive da UC dopo 9 giorni di coltura in terreno adipogenico (a e b) e in terreno proliferativo (c) colorate con Oil-Red-O. a e c ingrandimento x100, b ingrandimento x250.

Per quanto riguarda il differenziamento osteogenico le cellule CD105 positive da UCB tendevano a stratificare e depositavano sali di calcio dopo 14 giorni di coltura in terreno differenziativo osteogenico, come confermato dalla colorazione di von Kossa. Invece le cellule CD105 positive da UC già a 7 giorni dall'inizio del differenziamento si disponevano in più strati ed erano positive alla colorazione di von Kossa (**Fig. 17**).

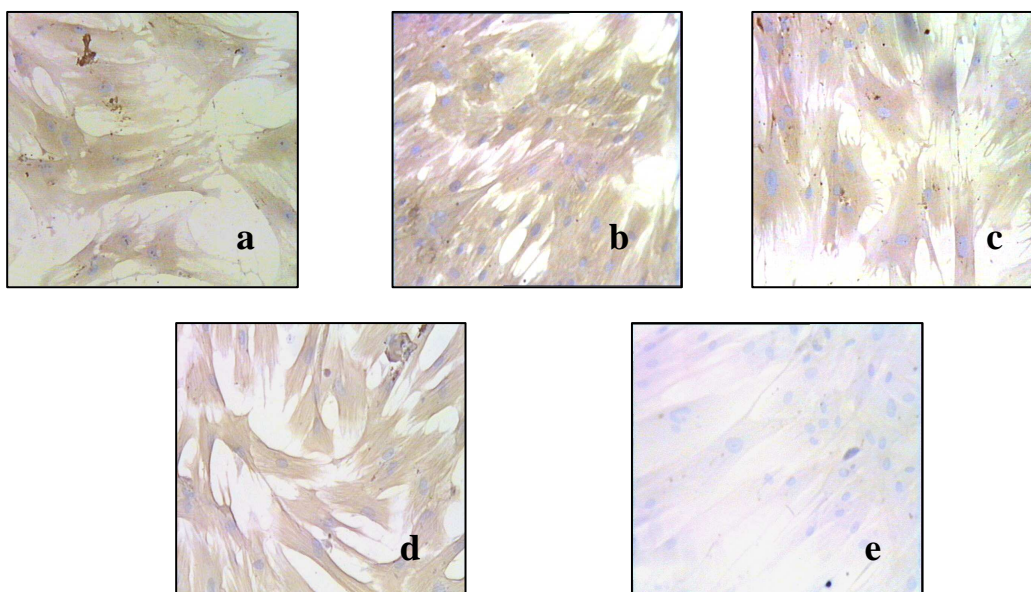


**Fig. 17.** Colorazione von Kossa di cellule CD105 positive da UCB (a) e da UC (c) trattate con terreno osteogenico rispettivamente per 14 e per 7 giorni. Cellule CD105 positive da UCB (b) e da UC (d) trattate con terreno proliferativo. Ingrandimenti x100.

## **Differenziamento epatocitario *in vitro* di cellule CD105 positive da UCB e da UC**

### **Su supporto di Matrigel™**

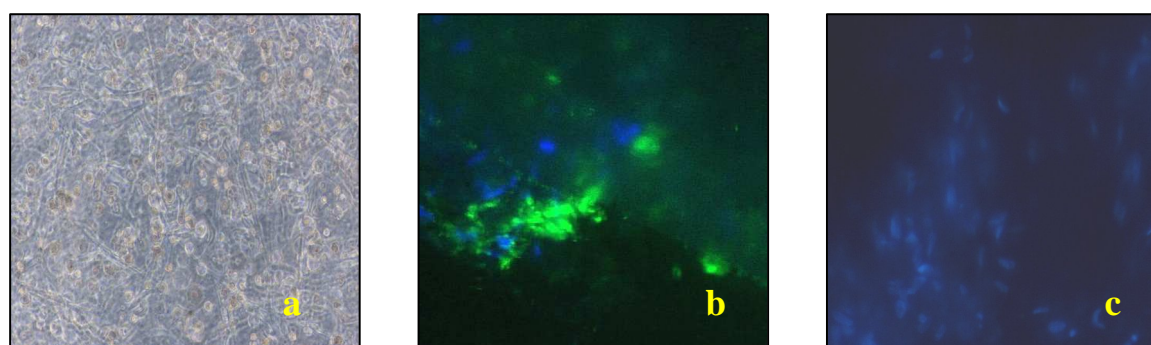
Le cellule CD105 positive da UC coltivate su Matrigel™ con terreno contenente specifici fattori induttivi hanno espresso HNF4-alfa e AFP a 14 giorni e albumina e c-met a 30 giorni dall'inizio del differenziamento, mentre nelle cellule in terreno proliferativo non è stata evidenziata alcuna immunoreattività (**Fig. 18**).



**Fig. 18.** Immunocitochimica su cellule CD105 positive da UC trattate con anticorpi anti-HNF4-alfa (a) e -AFP (b) dopo 14 giorni in terreno differenziativo e con anticorpi anti-c-met (c) e -albumina (d) dopo 30 giorni in terreno epatocitario; e) controllo negativo rappresentato da cellule coltivate con terreno proliferativo. Ingrandimenti x100.

### Su supporto di PuraMatrix™

A 12 giorni dall'inizio dell'induzione epatocitaria le cellule CD105 positive da UCB incapsulate in PuraMatrix™ hanno presentato positività al marcatore di differenziamento epatico precoce HNF4-alfa, come rivelato dall'analisi all'immunofluorescenza, mentre le cellule in terreno proliferativo non hanno mostrato alcuna positività per tale marcatore (**Fig. 19**).

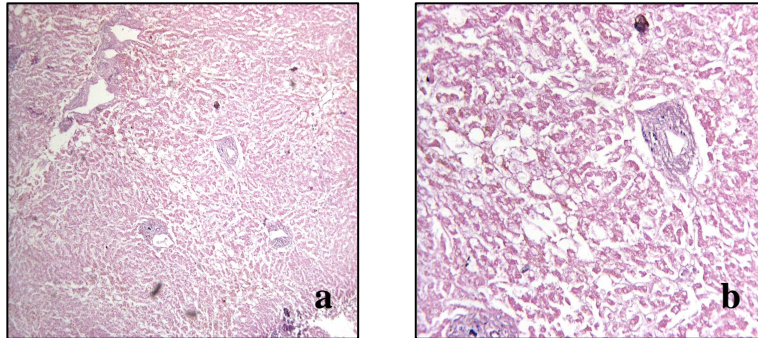


**Fig. 19.** Microscopia ottica a contrasto di fase di colture di cellule CD105 positive da UCB incapsulate in PuraMatrix e trattate con terreno epatocitario per 2 giorni (a); immunofluorescenza per marcatore HNF4-alfa su cellule CD105 positive da UCB incapsulate in PuraMatrix e mantenute per 12 giorni in terreno epatocitario (b) e in terreno proliferativo (c). Ingrandimenti x100.

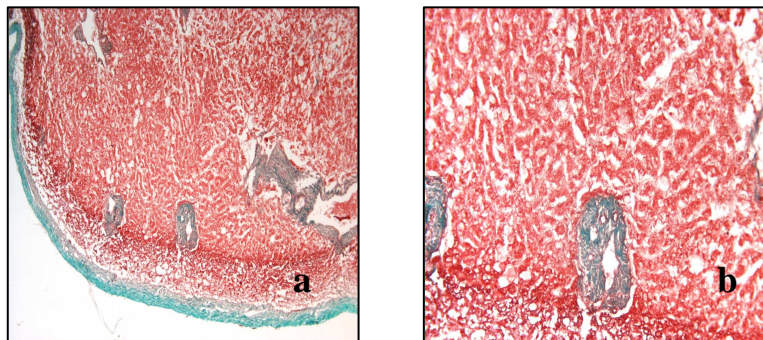


### Su matrice acellulare omologa di fegato

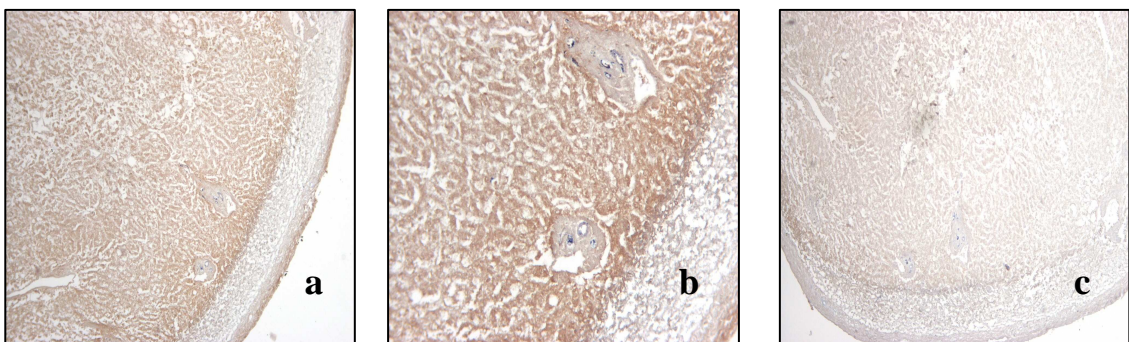
La matrice ottenuta da sezioni di fegato umano è risultata completamente acellularizzata con un solo ciclo di trattamento detergente-enzimatico come evidenziato dall'analisi istochimica (**Fig. 20**); dalla colorazione Masson tricromica inoltre è risultato evidente che la matrice conservava la componente fibrillare (**Fig. 21**), mentre l'immunoistochimica ha dimostrato che la matrice manteneva l'espressione di HLA-A (**Fig. 22**).



**Fig. 20.** Matrice acellulare di fegato umano in seguito a trattamento detergente-enzimatico. Colorazione ematossilina-eosina. a, ingrandimento x40, b, ingrandimento x100.

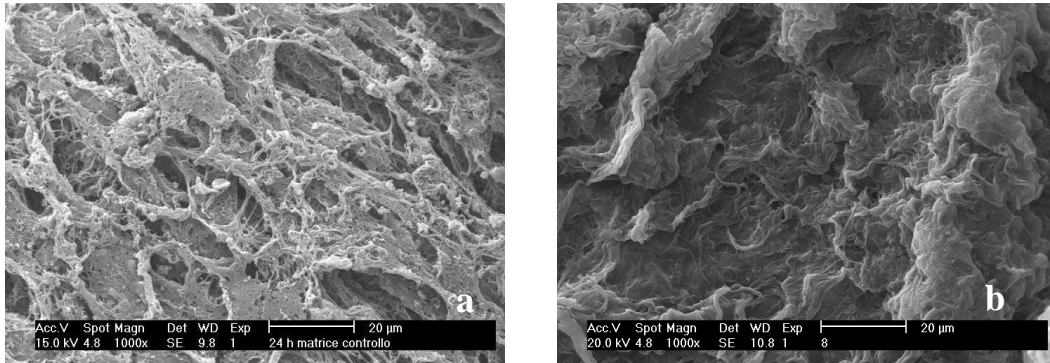


**Fig. 21.** Matrice acellulare di fegato umano in seguito a trattamento con un ciclo detergente-enzimatico. Colorazione Masson-Tricromica. a, ingrandimento x40, b, ingrandimento x100.



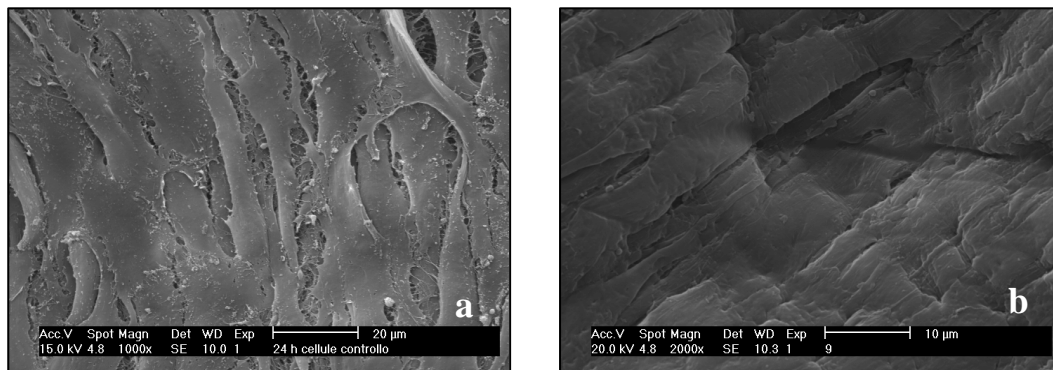
**Fig. 22.** Immunoistochimica con anticorpo anti-HLA-A su matrice acellulare di fegato umano (a, b); controllo negativo (c). a, c ingrandimento x40; b ingrandimento x100.

La matrice incubata sia con terreno proliferativo che con terreno differenziativo manteneva inalterate le sue caratteristiche morfologiche fino a 14 giorni, come osservato al microscopio elettronico a scansione (**Fig. 23**).



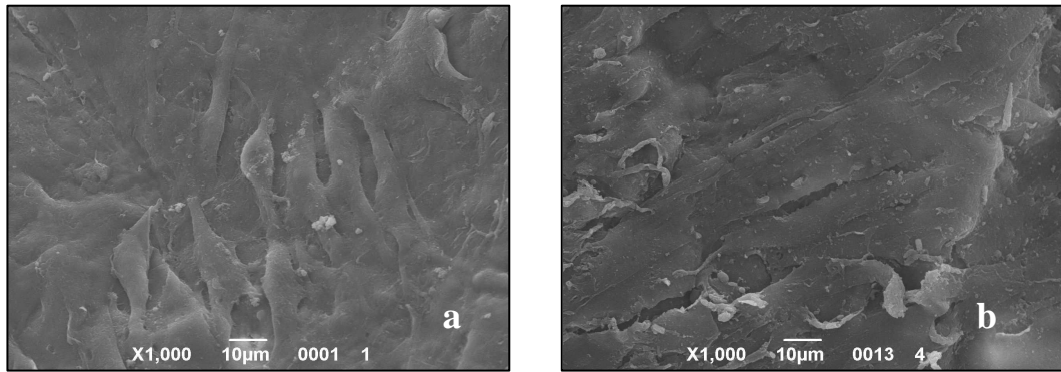
**Fig. 23.** Microscopia elettronica a scansione di matrice acellulare di fegato umano a 24 ore (a) e 14 giorni (b) di coltura. Ingrandimenti x1000.

Le cellule CD105 positive da UCB seminate sulla matrice e trattate con terreno proliferativo sono state in grado di aderire già a 24 ore dalla semina e a 14 giorni formavano un rivestimento compatto, disponendosi in maniera orientata (**Fig. 24**).



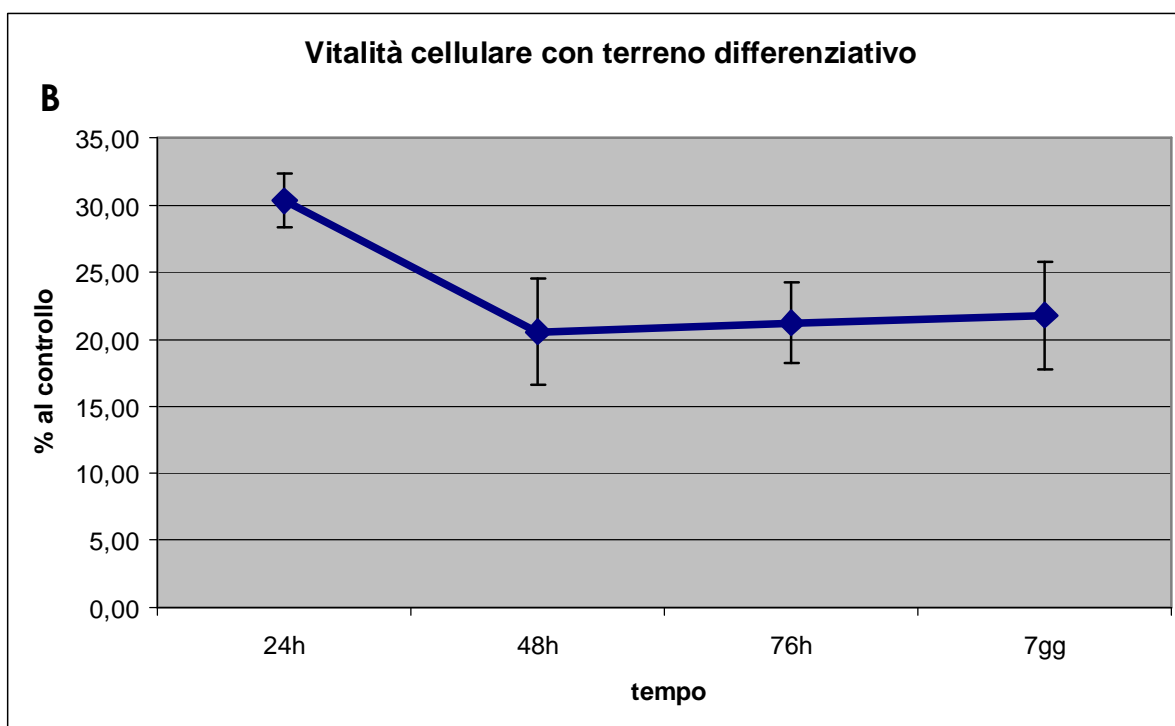
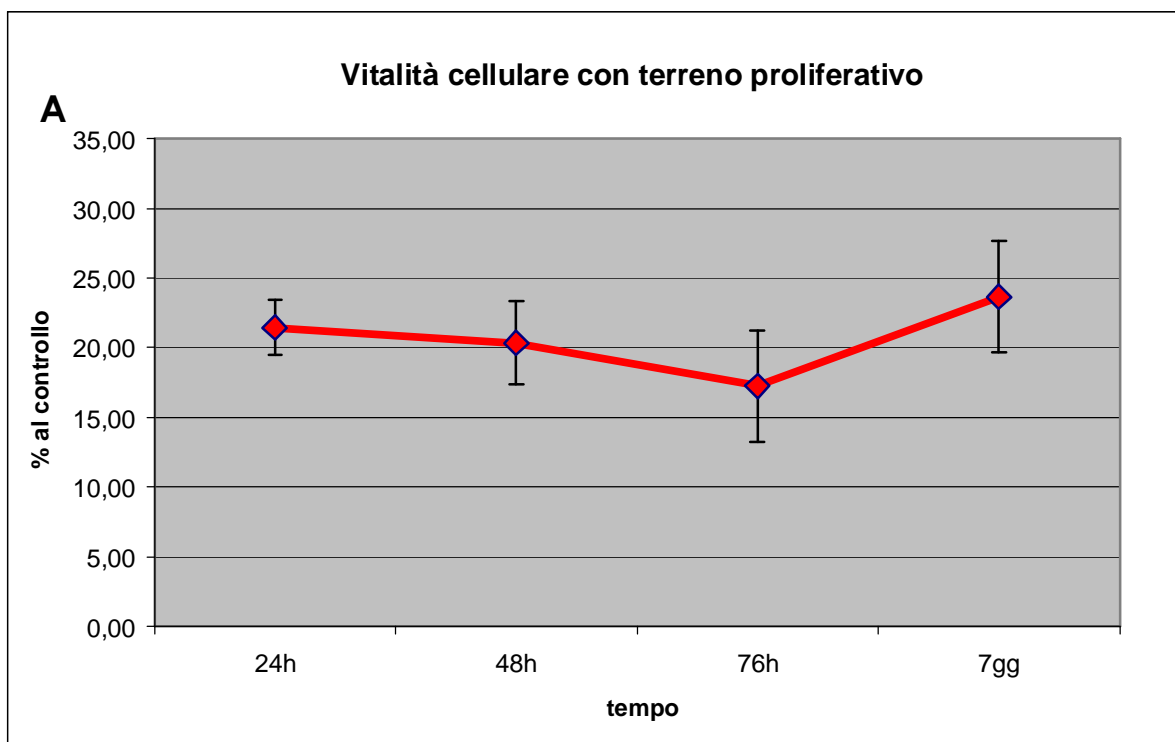
**Fig. 24.** Microscopia elettronica a scansione di cellule CD105 positive da UCB su matrice acellulare di fegato umano a 24 ore (a) e 14 giorni (b) dalla semina con terreno proliferativo. Ingrandimenti: a, x1000, b x2000.

Analogamente le cellule CD105 positive da UCB seminate sulla matrice e trattate con terreno differenziativo aderivano alla matrice a 24 ore dalla semina, arrivando a disporsi in maniera orientata e a rivestirla completamente dopo 14 giorni. Esse inoltre apparivano più rugose e dotate di estroflessioni di membrana, caratteristica riscontrabile in cellule epatiche (**Fig. 25**).



**Fig.25.** Microscopia elettronica a scansione di cellule CD105 positive da UCB su matrice acellulare di fegato umano a 24 ore (a) e a 14 giorni (b) dalla semina con terreno differenziativo. Ingrandimenti: x1000.

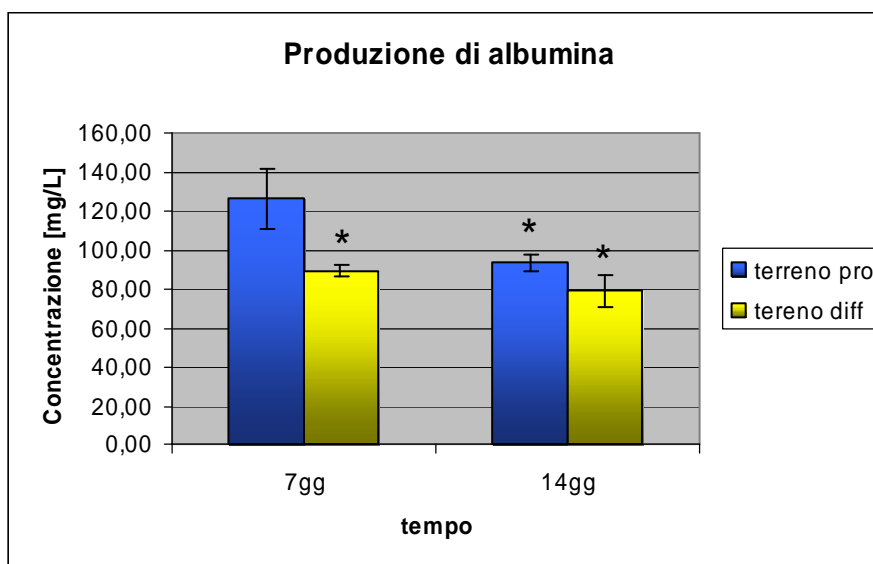
Il saggio per la vitalità cellulare eseguito su cellule CD105 positive da UCB seminate sulla matrice ha rivelato che in caso di coltura con terreno proliferativo la vitalità cellulare si riduceva fino a 76 ore dopo la semina sulla matrice per poi tornare ad aumentare fino a 7 giorni (**Fig. 26 A**); invece nel caso di coltura con terreno differenziativo si poteva notare un considerevole calo di vitalità nelle prime 48 ore dalla semina per poi notare una ripresa e un leggero aumento fino a 7 giorni (**Fig. 26 B**).



**Fig. 26.** Saggio di vitalità eseguito su cellule CD105 positive da UCB seminate su matrice acellulare di fegato umano con terreno proliferativo (A) e con terreno differenziativo (B). Valori in percentuale rispetto al controllo rappresentato da cellule su piastra.

Il saggio per la produzione dell'albumina eseguito su cellule CD105 positive da UCB seminate su matrice ha messo in evidenza produzione di albumina sia da parte di cellule

trattate con terreno proliferativo che da parte di cellule trattate con terreno differenziativo. A 7 giorni dalla semina su matrice si osservava una produzione di albumina significativamente maggiore da parte di cellule in terreno proliferativo rispetto a quella di cellule in terreno differenziativo; tale differenza andava a ridursi a 14 giorni dalla semina, in quanto mentre le cellule in terreno proliferativo diminuivano la produzione, quelle in terreno differenziativo la mantenevano pressochè invariata (**Fig. 27**).

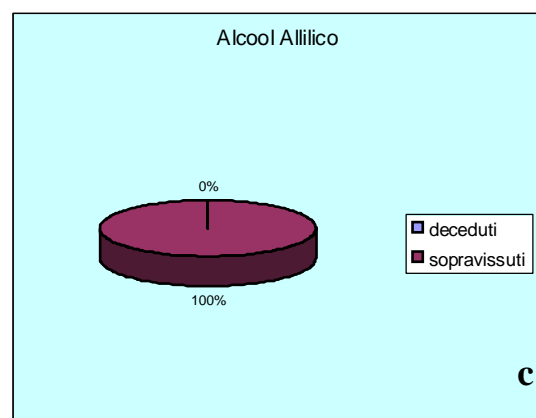
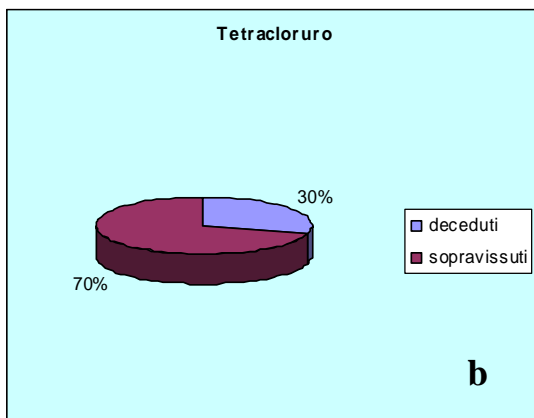
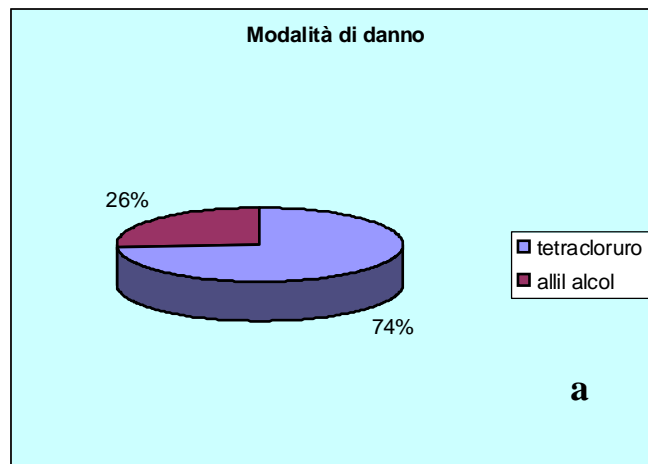


**Fig. 27.** Saggio per la produzione di albumina da parte di cellule CD105 positive da UCB su matrice acellulare di fegato trattate con terreno proliferativo (terreno pro) e con terreno differenziativo (terreno diff) a 7 e 14 giorni dalla semina. \* =  $p < 0,05$  vs cellule in terreno proliferativo a 7 giorni.

## Differenziamento epatocitario *in vivo* di cellule CD105 positive da UCB e da UC

In totale per la sperimentazione *in vivo* sono stati utilizzati 27 ratti: di questi 20 sono stati trattati con una dose di tetracloruro di carbonio iniettata per via intraperitoneale, 7 con una dose di alcool allilico iniettata sempre intraperitonealmente. Dei 20 ratti trattati con tetracloruro di carbonio, 6 sono deceduti spontaneamente (5 non si sono mai svegliati dall'anestesia, 1 è deceduto dopo 5 giorni dall'iniezione), mentre tutti i ratti trattati con alcool allilico sono sopravvissuti fino al momento del sacrificio (**Fig. 28**).

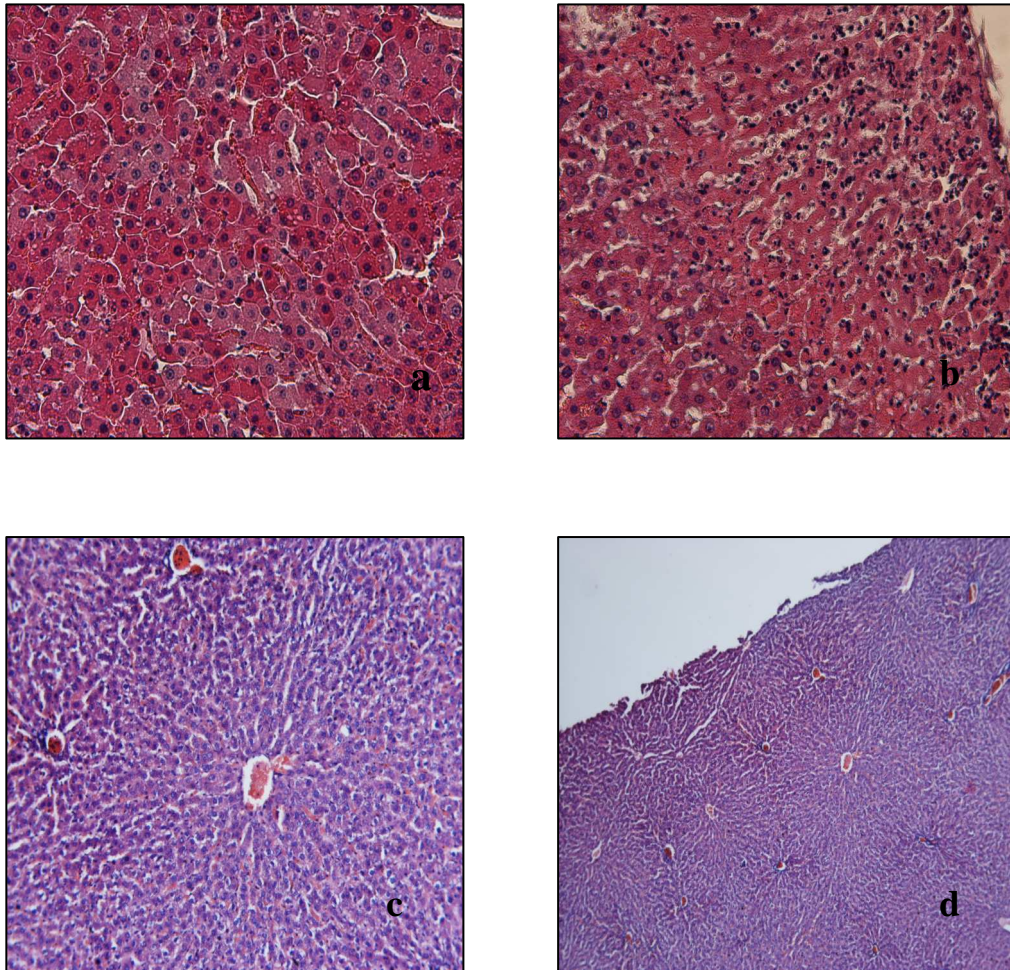




**Fig. 28.** Percentuale di ratti trattati con tetracloruro di carbonio e con alcool allilico (a); percentuale di ratti sopravvissuti in seguito a trattamento con tetracloruro di carbonio (b); percentuale di ratti sopravvissuti in seguito a trattamento con alcool allilico (c).

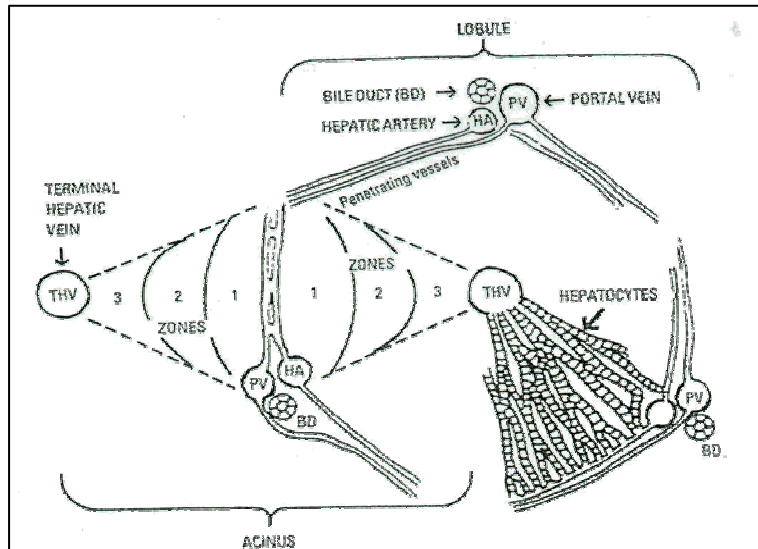
### **a. Modello animale di danno epatico da tetracloruro di carbonio**

Al fine di individuare il momento più opportuno per la somministrazione delle cellule, gli animali sono stati sacrificati a vari tempi dalla somministrazione di tetracloruro di carbonio, i fegati sono stati prelevati e le sezioni relative sono state colorate con ematossilina-eosina. A 24 ore dal danno il fegato si presentava piastrellato con steatosi microvescicolare diffusa e dilatazione dei sinusoidi. Inoltre era presente una zona di ischemia sottocapsulare e abbondante infiltrato infiammatorio (**Fig. 29, a e b**), condizioni assenti nel fegato di un ratto sano (**Fig. 29, c e d**).

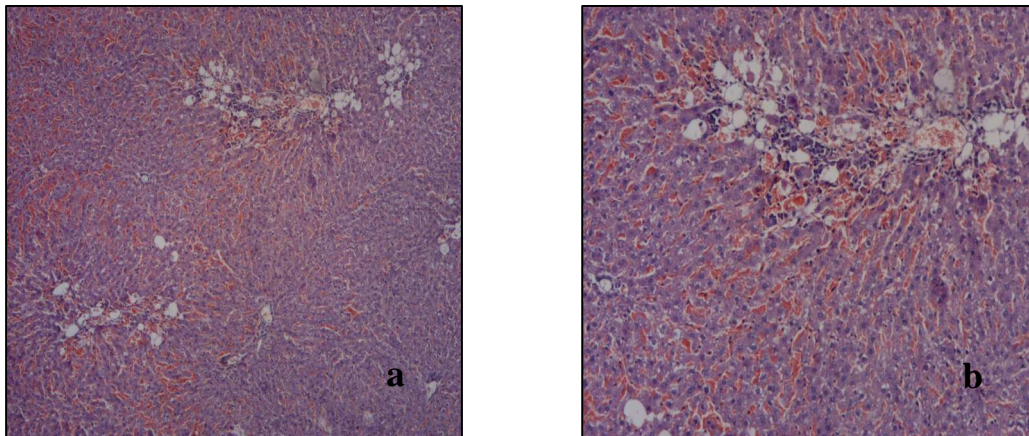


**Fig. 29.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto a 24 ore dalla somministrazione intraperitoneale di tetracloruro di carbonio (a, b). Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto sano, controllo (c, d). Ingrandimenti: a e b x200, c x100, d x50.

A 48 ore dal danno si notava presenza di necrosi e danno citotossico elevato in zona 3 (**Fig. 30**); inoltre erano visibili segni di degenerazione balooniforme e di congestione, nonchè infiltrato infiammatorio richiamato dalla necrosi (**Fig. 31**).



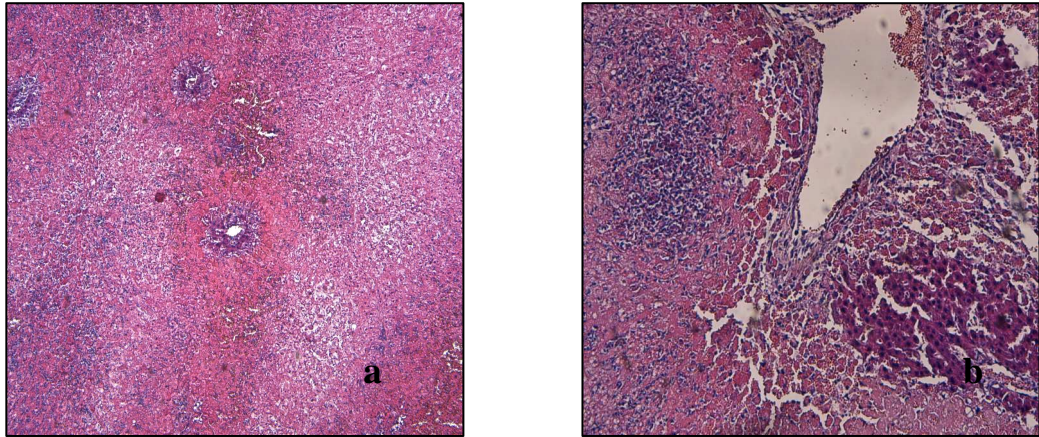
**Fig. 30.** Rappresentazione schematica dell'acino e del lobulo epatico



**Fig. 31.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto a 48 ore dalla somministrazione intraperitoneale di tetracloruro di carbonio (a, b). Ingrandimenti: a, x50, b x100.

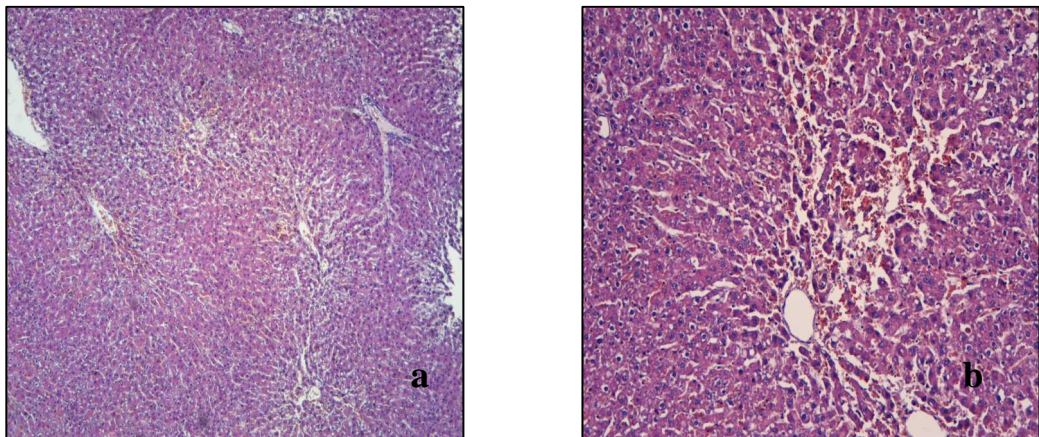
A 5 giorni dal danno si poteva notare steatosi diffusa, dilatazione dei sinusoidi e presenza di ampia zona necrotica esterna visibile anche macroscopicamente, con infiltrato infiammatorio centrale e a foci, circondato da aree vacuolizzate e prive di nuclei (**Fig. 32**).





**Fig. 32.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto a 5 giorni dalla somministrazione intraperitoneale di tetracloruro di carbonio (a, b). Ingrandimenti: a x50, b x100.

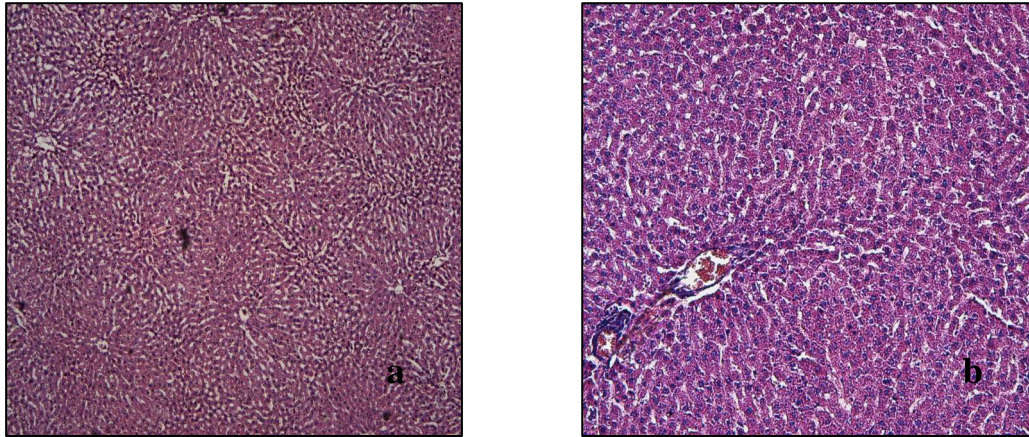
A 9 giorni dal danno i sinusoidi risultavano ancora dilatati con infiltrato emorragico; inoltre permaneva steatosi diffusa (**Fig. 33**).



**Fig. 33.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto a 9 giorni dalla somministrazione intraperitoneale di tetracloruro di carbonio (a, b). Ingrandimenti: a x50, b x100.

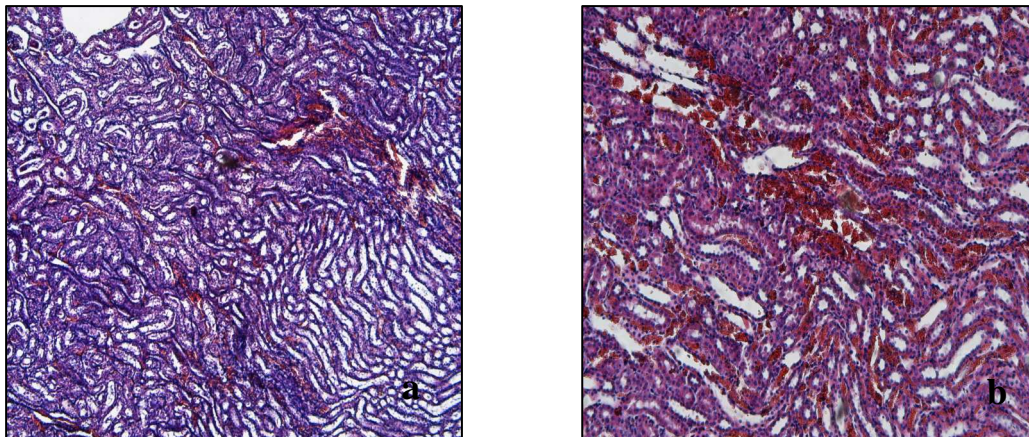
A 16 giorni dal danno il parenchima epatico si presentava pressochè fisiologico e privo di fibrosi; solo in alcune zone era ancora presente dilatazione dei sinusoidi (**Fig. 34**).





**Fig. 34.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto a 16 giorni dalla somministrazione intraperitoneale di tetracloruro di carbonio (a, b). Ingrandimenti: a x 50, b x100.

Negli stessi intervalli di tempo sono stati analizzati anche altri organi della cavità addominale e toracica. L'analisi istologica ha evidenziato che cuore, polmoni e milza si presentavano fisiologici, mentre all'interno dei reni si notava un importante infiltrato emorragico sia a livello glomerulare che tubulare (**Fig. 35**), danno che permaneva fino a 16 giorni.

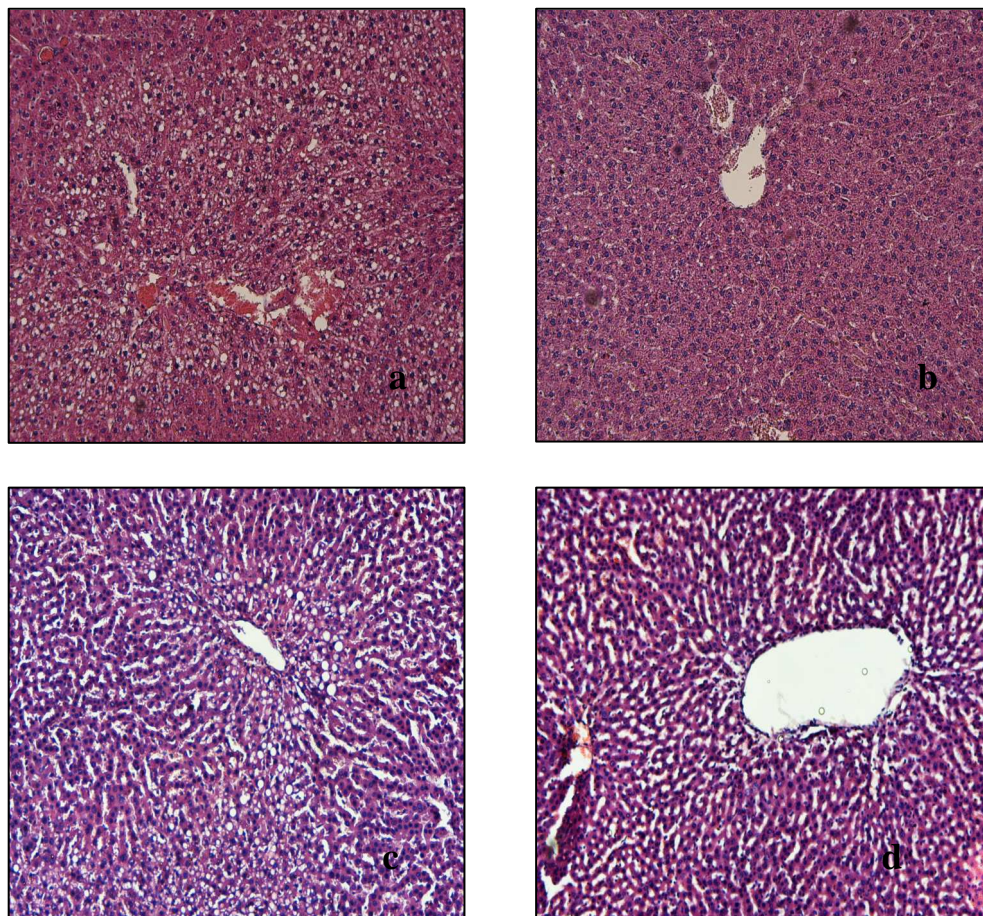


**Fig. 35.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di rene di ratto a 9 (a) e 16 (b) giorni dalla somministrazione intraperitoneale di tetracloruro di carbonio. Ingrandimenti: a x50, b x100.

Sulla base di questi risultati, è stato scelto di trapiantare le cellule CD105 positive dopo 48 ore dalla somministrazione di tetracloruro di carbonio, momento in cui si osservavano gravi alterazioni del normale quadro istologico, che, almeno fino a 5 giorni, peggiorava ulteriormente.

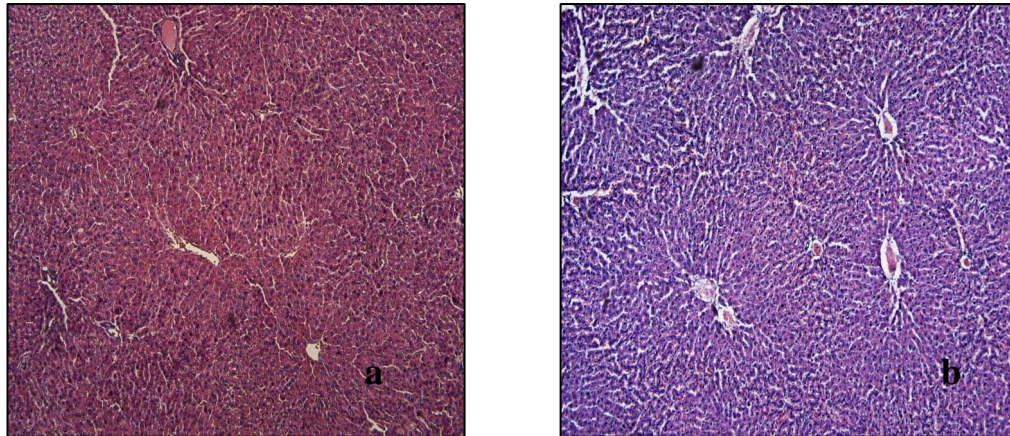


A 7 giorni dalla somministrazione delle cellule CD105 positive sia da UCB che da UC (corrispondenti a 9 giorni dall'induzione del danno), si poteva notare ancora presenza di steatosi, degenerazione in zona 3 e dilatazione dei sinusoidi, tuttavia alcune zone di parenchima si presentavano pressochè integre (**Fig. 36**), rivelando un quadro istologico in parte migliorato rispetto al controllo (**Fig. 33**).



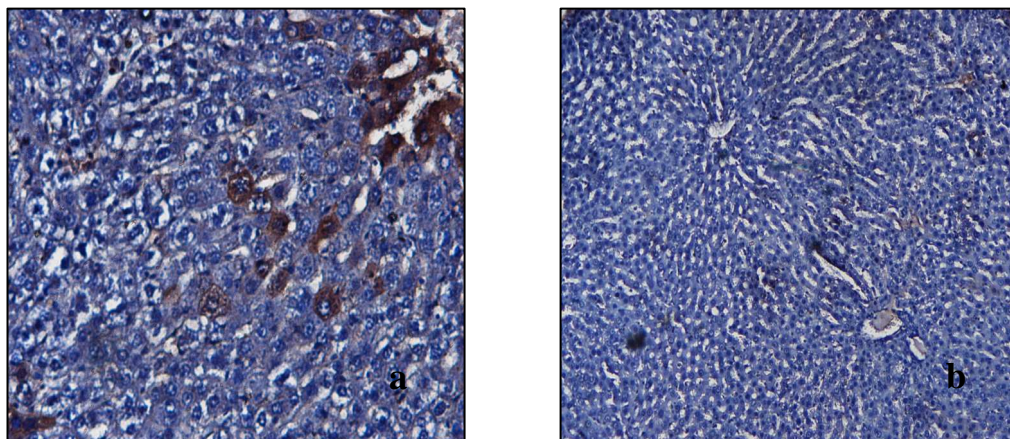
**Fig. 36.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto a 9 giorni dalla somministrazione intraperitoneale di tetracloruro di carbonio e a 7 giorni dalla somministrazione delle cellule CD105 positive da UC (a, b) e da UCB (c, d). Ingrandimenti x100.

Analogamente a quanto osservato negli animali di controllo (**Fig. 34**), a 14 giorni dalla somministrazione delle cellule (corrispondenti a 16 giorni dall'induzione del danno), il parenchima del fegato si presentava pressochè ricostituito e privo di fibrosi anche se in alcune zone erano tuttavia ancora presenti segni di steatosi e dilatazione dei sinusoidi (**Fig. 37**).



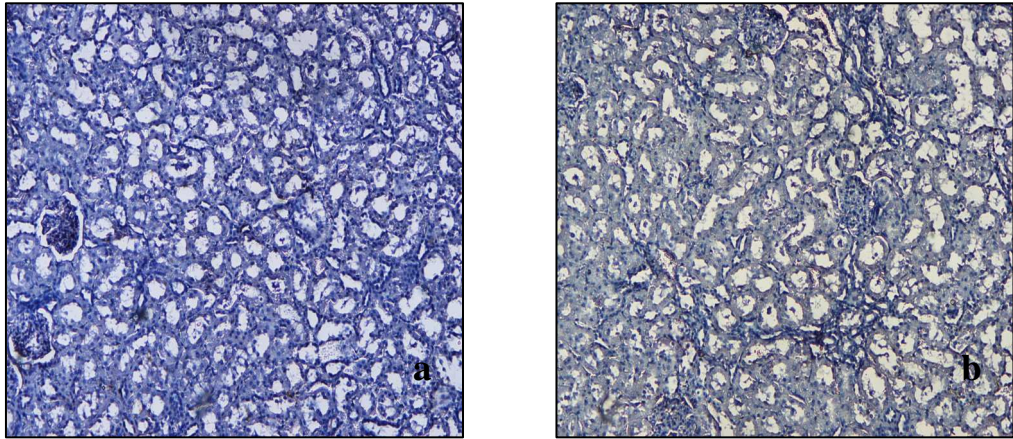
**Fig. 37.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto a 16 giorni dalla somministrazione intraperitoneale di tetracloruro di carbonio e a 14 giorni dalla somministrazione delle cellule CD105 positive da UC (a) e da UCB (b). Ingrandimenti x50.

In seguito al trapianto solo le cellule CD105 positive da UCB, ma non da UC, permanevano all'interno del fegato per 7 giorni, come dimostrato dall'immunoreattività all'anticorpo anti-HLA-A (**Fig. 38**). Inoltre, entrambe le popolazioni cellulari non si localizzavano a livello renale (**Fig. 39**), escludendo l'ipotesi che le cellule fossero state attratte dal grave danno renale piuttosto che da quello epatico.



**Fig. 38.** Immunoistochimica per HLA-A di sezioni di fegato di ratto a 9 giorni dall'induzione del danno e a 7 giorni dalla somministrazione delle cellule CD105 positive da UCB (a); controllo negativo dello staining (b). Ingrandimenti: a x 100, b x50.

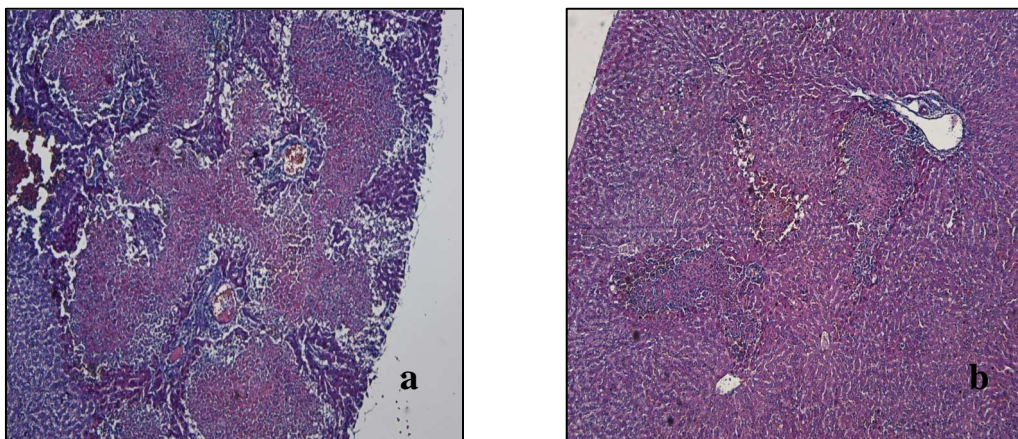




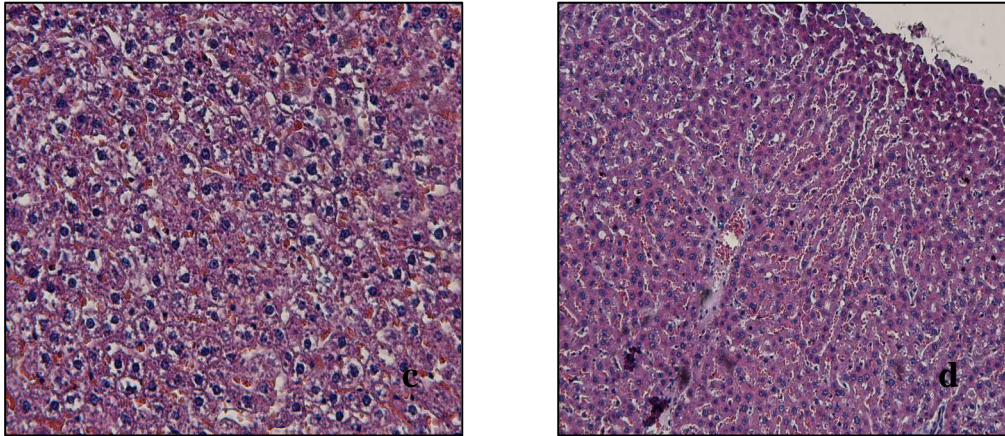
**Fig. 39.** Immunoistochimica per HLA-A di sezioni di rene di ratto a 9 giorni dall'induzione del danno e a 7 giorni dalla somministrazione delle cellule CD105 positive da UCB (a); controllo negativo dello staining (b). Ingrandimenti x 100.

**b. Modello animale di danno epatico da alcool allilico**

La colorazione ematossilina-eosina eseguita su sezioni di fegato dopo 48 ore dall'induzione del danno tramite somministrazione intraperitoneale di alcool allilico (0,93 mmol/kg peso corporeo) permetteva di notare la presenza di sinusoidi molto dilatati, di aree multiple di necrosi coagulativa, che in alcune sezioni si estendeva anche alle zone periportali con più focolai di necrosi dalla zona 3 alla zona 1. Inoltre, si osservavano zone di steatosi centroacinare, ma anche zone di parenchima integro (**Fig. 40**).



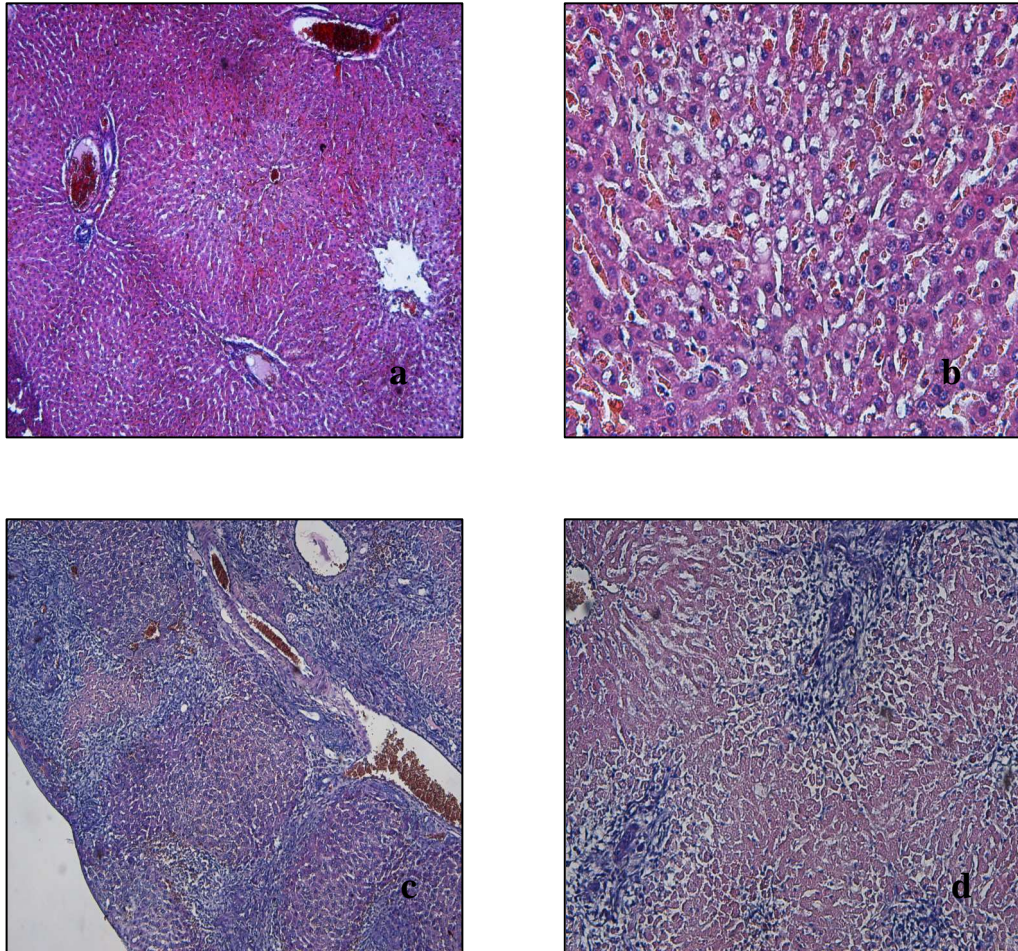




**Fig. 40.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto a 48 ore dalla somministrazione intraperitoneale di alcool allilico. Ingrandimenti: a e b x50, c e d x100.

Dato l'elevato grado di danno riscontrato a 48 ore dalla somministrazione dell'alcool allilico, anche in questa sperimentazione si è scelto di trapiantare le cellule CD105 positive da UCB e da UC a tale tempo. Inoltre, considerando la capacità rigenerativa intrinseca del fegato che nel caso della sperimentazione con tetracloruro di carbonio portava a una rigenerazione pressochè completa dopo 16 giorni dall'induzione, si è scelto di valutare il quadro istologico dopo il trapianto di cellule a tempi più brevi cioè a 48 ore e a 7 giorni dal danno massimo.

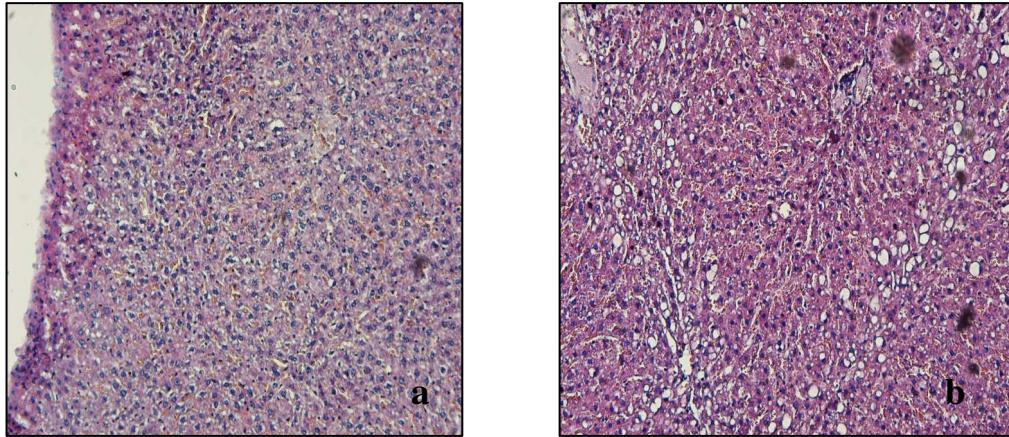
A 4 giorni dal danno e a 48 dal trapianto di entrambi i tipi cellulari si poteva osservare un quadro istologico sostanzialmente invariato rispetto a quanto osservato negli animali trattati solo con alcool allilico (dati non mostrati). Infatti, a 48 ore dal trapianto, si poteva notare la permanenza di steatosi e di dilatazione dei sinusoidi e, negli animali che avevano ricevuto cellule da UC erano evidenti ampie zone di necrosi con abbondante infiltrato emorragico (**Fig. 41**).



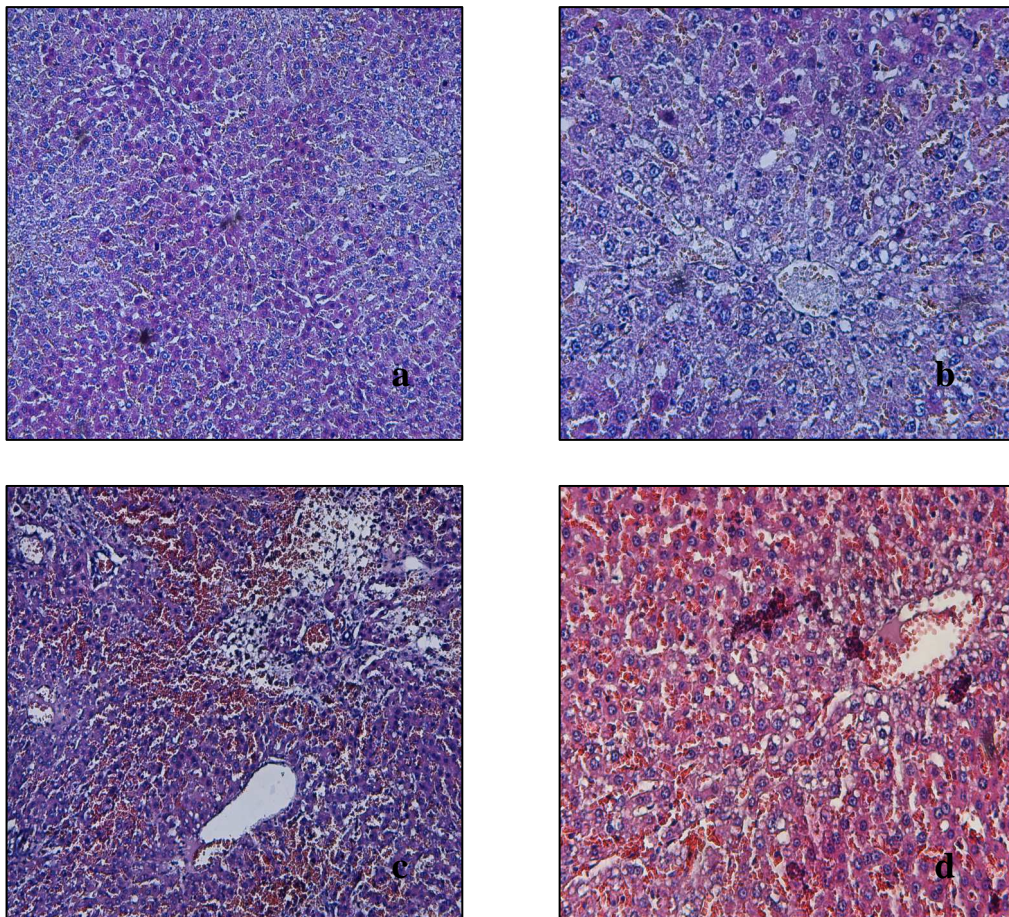
**Fig. 41.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto a 4 giorni dalla somministrazione intraperitoneale di alcool allilico e a 48 ore dalla somministrazione delle cellule CD105 positive da UCB (a, b) e da UC (c, d). Ingrandimenti: a e c x50, b e d x100.

Rispetto al controllo (**Fig. 42**), a 7 giorni dal trapianto delle cellule la steatosi epatica appariva ridotta in seguito a somministrazione di cellule da UCB, mentre rimaneva evidente la dilatazione dei sinusoidi e l'infiltrato emorragico negli animali trattati con cellule da UC (**Fig. 43**).





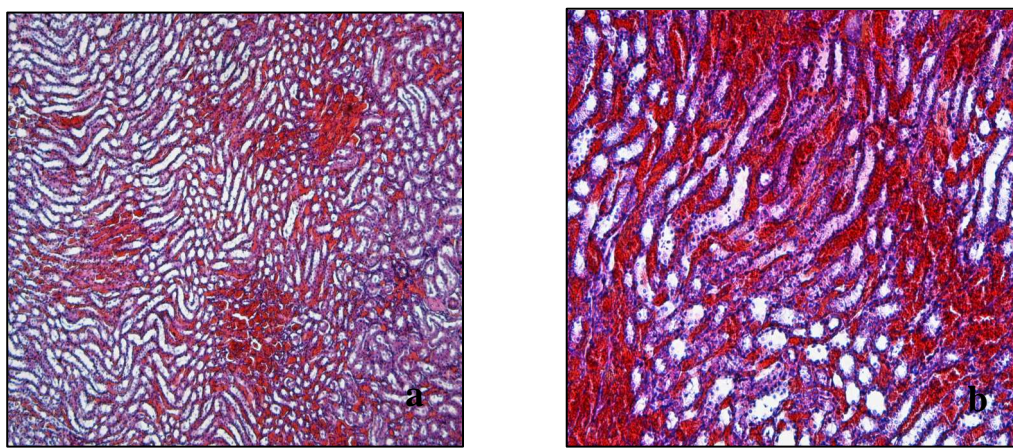
**Fig. 42.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto a 9 giorni dalla somministrazione intraperitoneale di alcool allilico. Ingrandimenti: a x50, b x100.



**Fig. 43.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di fegato di ratto a 9 giorni dalla somministrazione intraperitoneale di alcool allilico e a 7 giorni dalla somministrazione delle cellule CD105 positive da UCB (a, b) e da UC (c, d). Ingrandimenti a e c x50, b e d x100.

Come già evidenziato negli animali trattati con tetracloruro di carbonio, l'alcool allilico non induceva alterazioni microscopiche a livello di cuore, polmoni e milza, ma provocava un danno renale severo, caratterizzato da un importante infiltrato emorragico sia a livello glomerulare che tubulare (**Fig. 44**). Tale danno tuttavia non è stato tale da mobilitare cellule in quanto non è stata mai riscontrata immunoreattività verso HLA-A in sezioni di reni di ratti trattati con le cellule.

Analogamente non è stata mai riscontrata positività a tale marcatore in sezioni di fegato di ratti trattati con cellule escludendo la mobilitazione anche verso questo organo.



**Fig. 44.** Colorazione ematossilina-eosina di sezioni di rene di ratto a 4 (a) e 9 (b) giorni dalla somministrazione intraperitoneale di alcool allilico. Ingrandimenti a x 50, b x100.





## DISCUSSIONE

Negli ultimi anni gli studi riguardanti le cellule staminali e le loro possibili fonti si sono intensificati, date le promettenti possibilità di una applicazione clinica, in modo particolare nella medicina rigenerativa [Stocum DL, 2001]. Numerose evidenze sperimentali indicano le ESC come le migliori candidate per fungere da strumento terapeutico, data la loro pluripotenzialità, ossia la capacità di differenziarsi in linee cellulari appartenenti a tutti i tre foglietti embrionali [Thomson JA et al., 1998].

Tuttavia, problemi di natura etica, connessi all'utilizzo di embrioni umani, nonché i rischi di insorgenza di tumore in seguito a utilizzo *in vivo* delle ESC [Reya T et al., 2001], hanno portato i ricercatori a verificare la presenza di cellule staminali nei tessuti adulti. Tra questi, il midollo osseo contiene, accanto alle HSC, una popolazione di cellule multipotenti, le MSC [Pittenger MF et al., 1999]. Fino a oggi molti sono stati gli studi che hanno dimostrato come il midollo osseo sia una buona fonte di MSC, in grado di differenziare in numerose linee cellulari non solo di origine mesodermica, ma anche endo- ed ecto-dermica. Tuttavia, poiché l'ottenimento del midollo osseo comporta una procedura invasiva e il numero di cellule staminali contenuto in esso sembra diminuire con l'avanzare dell'età del donatore [D'Ippolito G et al., 1999], la ricerca si è indirizzata all'identificazione di fonti alternative di MSC. Sono stati pertanto presi in considerazione i tessuti di derivazione fetale, quali placenta, liquido amniotico e cordone ombelicale in quanto proprio per la loro origine come annessi embrionali si ritiene possano contenere cellule in stato maggiormente indifferenziato. Anche se esistono molte evidenze riguardo la possibilità di ottenere MSC da UC e da UCB, la reale capacità proliferativa e differenziativa delle cellule ottenute da tali fonti deve essere ancora del tutto chiarita.

Da qui lo scopo della presente ricerca, nella quale sono state studiate sottopopolazioni cellulari isolate da UC e da UCB umano per valutarne l'espressione fenotipica, la capacità replicativa e la potenzialità differenziativa *in vitro* verso linee cellulari di origine mesodermica ed endodermica, quale la linea epatocitaria. Infine, si è valutata la capacità di engraftment *in vivo* di tali cellule in un modello animale di danno epatico, aspetto molto importante per un possibile futuro impiego clinico di queste cellule.

Per questo scopo sono stati processati 72 unità di UCB e 76 campioni di UC provenienti da parti a termine. Colture cellulari sono state ottenute a partire dalle MNC estratte dall'UCB e dalla frammentazione della gelatina di Wharton per quanto riguarda l'UC. In particolare si sono ottenute colture di cellule fibroblastoidi, morfologia riconosciuta come tipica delle MSC,

dal 13% dei campioni di UCB e dal 36% dei campioni di UC. In entrambi i casi si trattava di cellule in grado di replicarsi almeno fino alla diciassettesima generazione.

L'analisi fenotipica delle colture fibroblastoidi da UCB ha evidenziato un profilo compatibile con quello delle MSC. Infatti in queste cellule erano assenti marcatori tipici della linea ematopoietica quali CD14, CD34 e CD45. CD14 è una proteina di membrana espressa dai monociti e dai macrofagi [Haziot A et al., 1988]. CD34 fa parte della famiglia delle sialomucine ed è implicata nell'adesione cellulare e nel mantenimento dello stato indifferenziato dei progenitori ematopoietici, inibendo il processo di differenziamento ematopoietico negli stessi [Fackler et al., 1995]. CD45 è una glicoproteina di superficie con funzione di fosfatasi tirosinica espressa ad alti livelli in tutte le cellule ematopoietiche [Trowbridge IS et al., 1993]. Inoltre le cellule derivate da UCB non esprimevano CD133, un marcatore di cellula staminale ematopoietica molto precoce tanto da essere considerato un marcatore di cellule progenitrici multipotenti e anche di cellule tumorali [Mizrak D et al. 2008], come non esprimevano SMA, marcatore comune di cellula fibroblastica matura, e CD31, marcatore di linea endoteliale [DeLisser HM et al., 1997]. D'altra parte, erano positive a marcatori considerati spesso tipici delle MSC quali CD54, CD73, CD90, CD105, CD166 e nestina.

Anche le colture cellulari ottenute da UC presentavano, all'analisi fenotipica, un profilo compatibile con quelle delle MSC, in quanto negative per l'espressione di CD34, CD38, CD40 e CD45 (marcatori ematopoietici) e per l'espressione di CD31 (marcatore di linea endoteliale) e positive per CD105 e CD90 (marcatori mesenchimali). L'espressione del fattore di von Willebrand, un marcatore di linea endoteliale matura, rivelava tuttavia un'eterogeneità di composizione cellulare dovuta alla presenza di cellule endoteliali rimaste nonostante l'asportazione della vena e delle arterie ombelicali.

Intendendo ottenere colture cellulari arricchite nella componente mesenchimale è stata isolata sia dalle colture primarie di UCB che da quelle di UC una sottopopolazione cellulare esprime l'antigene di superficie CD105. CD105 o endogлина fa parte del complesso dei recettori di TGF-beta e, oltre ad essere espresso dalle cellule endoteliali e dai macrofagi, è presente sulla membrana delle cellule stromali del midollo osseo; è noto anche come SH-2 dall'anticorpo monoclonale che ne riconosce un epitopo [Barry FP et al., 1999].

Le colture cellulari da UC sono state sottoposte oltre alla selezione positiva per CD105 anche alla selezione negativa per CD31 e KDR in modo da eliminare le cellule endoteliali e i loro precursori.

Le cellule CD105 positive selezionate mediante immunoseparazione da colture cellulari sia da UCB che da UC presentavano morfologia fibroblastoide e proliferavano almeno fino alla diciassettesima generazione. Lo studio di population doubling delle cellule CD105 positive da UCB ha evidenziato come queste cellule siano state in grado di raddoppiare di numero a ogni passaggio di generazione, dimostrando quindi una buona capacità proliferativa. L'indagine fenotipica ha evidenziato che le cellule CD105 positive da UCB erano negative per i marcatori della linea ematopoietica CD14, CD34, CD38, CD45 e c-kit, noto anche come CD117 e considerato uno dei principali marcatori di precursori ematopoietici [Ashman LK et al., 1991]; inoltre erano negative per l'espressione di CD31 e positive invece per CD105, CD90 e parzialmente anche per CD166, tutti considerati marcatori di cellule mesenchimali. Un profilo fenotipico simile è emerso dalla caratterizzazione delle cellule CD105 positive da UC: queste sono infatti risultate da una parte negative per CD34, CD38, CD45 e SMA, dall'altra positive per CD90, CD54 oltre che per CD105 stesso. Inoltre non è stata più riscontrata positività al fattore di von Willebrand, a indicazione dell'avvenuta eliminazione della componente cellulare endoteliale conseguente all'immunoseparazione. Confrontando tali dati con quelli riportati in tabella 1 dell'introduzione possiamo notare come il profilo fenotipico delle cellule CD105 positive da UCB e da UC sia compatibile con un profilo di MSC.

Lo studio dell'espressione del gene Sry mediante RT-PCR rappresenta una tecnica sensibile e specifica per determinare la presenza di DNA maschile in una popolazione cellulare mista [Muller-Ehmsen J et al., 2002]. L'espressione del gene Sry da parte di cellule CD105 positive da UCB di neonato maschio ha evidenziato la presenza di cellule fetali in tale sottopopolazione cellulare, confermando l'ipotesi di un'origine fetale delle MSC da UCB e quindi la possibilità che queste si trovino in uno stato maggiormente indifferenziato. Di notevole interesse appare la presenza di cellule fetali nell'UCB in quanto esse, opportunamente isolate, conservate e manipolate a livello genetico, potrebbero trovare impiego nella cura di malattie congenite del neonato. Analogamente anche le cellule CD105 positive da UC di neonato maschio esprimevano il gene Sry, dimostrando quindi che anche esse, almeno in parte, sono di origine fetale [Conconi MT et al., 2006].

Le cellule CD105 positive da UCB e da UC hanno dimostrato plasticità verso linee cellulari di derivazione mesodermica, quali la linea adipogenica e quella osteogenica: la capacità differenziativa *in vitro* verso questi due tipi cellulari conferma il carattere "mesenchimale" di queste cellule. Infatti molti lavori pubblicati a partire da quello di Pittenger [Pittenger MF et al., 1999] hanno considerato la plasticità verso la linea adipogenica e verso quella osteogenica



come dei requisiti indispensabili per poter considerare “mesenchimale” un determinato tipo cellulare. La differenziazione adipogenica è stata confermata dal cambiamento di morfologia cellulare da fibroblastoide a rotondeggiante e dalla presenza di vacuoli lipidici evidenziata mediante colorazione Oil-Red-O dopo coltura in terreno differenziativo per 9 giorni delle cellule CD105 positive da UC e per 11 giorni delle cellule CD105 positive da UCB. Inoltre quest’ultime esprimevano adiponectina e lipoproteina lipasi a 13 giorni dall’induzione e leptina e il suo recettore, Ob-receptor, a 18 giorni dall’induzione dimostrando così il raggiungimento di un grado di differenziamento completo, in quanto adiponectina e leptina sono due ormoni considerati adipochine secrete da adipociti maturi e la lipoproteina lipasi è un enzima che interviene nel metabolismo dei trigliceridi e delle lipoproteine. La differenziazione in senso osteogenico delle cellule CD105 positive è stata confermata dal cambiamento di morfologia (da fibroblastoide a osteoblasto-simile), dall’aumento della stratificazione delle cellule in coltura e dalla deposizione di matrice mineralizzata rivelata dalla colorazione von Kossa a 7 giorni dall’inizio dell’induzione delle cellule da UC e a 14 giorni dall’induzione delle cellule da UCB. La capacità di produrre una matrice mineralizzata mediante deposizione di sali di calcio indica come queste cellule abbiano conseguito, oltre al fenotipo, la funzionalità di cellule osteoblastiche. In complesso, la capacità differenziativa *in vitro* verso queste due linee cellulari mesodermiche, nonché il profilo fenotipico presentato dalle cellule CD105 positive da UCB e da UC rientrano nei criteri minimi definiti dalla Società Internazionale per la Terapia Cellulare per essere considerate MSC [Dominici M *et al.*, 2006].

Rimane invece una questione ancora controversa la capacità delle MSC di differenziare in epatociti funzionali, anche se iniziano ad essere numerose le evidenze positive in tal senso a partire da MSC sia da midollo osseo [Schwartz RE *et al.*, 2002], che da UCB [Lee OK *et al.*, 2004].

Tali controversie sono dovute al fatto che l’induzione delle MSC verso la linea epatocitaria è più complessa. Le difficoltà sono legate innanzitutto alla diversa origine embrionale delle cellule epatocitarie, dal foglietto endodermico e non dal foglietto mesodermico da cui avrebbero origine le MSC, e in secondo luogo alle modalità di coltura degli epatociti e quindi delle cellule staminali che si intende differenziare in senso epatocitario. A tal proposito diversi studi hanno dimostrato come sia di fondamentale importanza per la coltura degli epatociti la presenza di un supporto adeguato che dia sostegno meccanico e contribuisca a creare un microambiente che mantenga le funzioni cellulari: in assenza di tali supporti gli epatociti in coltura sono destinati a perdere rapidamente le loro funzioni e a morire [Gregory

*PG et al., 2000*]. In questo studio sono stati impiegati tre diversi tipi di supporti: i) Matrigel™, una matrice extracellulare ottenuta da colture di cellule neoplastiche di topo e che contiene i componenti della lamina basale; ii) PuraMatrix™, un gel peptidico in grado di fornire un supporto tridimensionale e iii) matrice acellulare epatica omologa.

Il Matrigel™, già utilizzato con buoni esiti per la coltura di epatociti di ratto [*Runge D et al., 1997; Nagaki M et al., 1995*], si è rivelato un supporto adatto per l'induzione epatocitaria delle cellule CD105 positive da UCB: infatti le cellule, seminate su uno strato sottile e trattate con terreno contenente i fattori induttivi epatocitari, esprimevano marcatori di linea epatica quali HNF4-alfa e AFP a 14 giorni e albumina e c-met a 30 giorni dall'inizio del differenziamento. HNF4-alfa è un fattore di trascrizione espresso precocemente durante la formazione dell'endoderma e gioca un ruolo importante nello sviluppo di fegato, reni e intestino, mentre AFP è espressa oltre che dalle cellule del sacco vitellino, del fegato e del tratto gastrointestinale del feto, anche da cellule di fegato in rigenerazione. L'espressione di questi marcatori a 14 giorni dall'inizio dell'induzione è in linea con il carattere di marcatori di differenziamento precoce che essi hanno, mentre a 30 giorni dall'inizio dell'induzione le cellule sono state in grado di esprimere marcatori epatici maturi quali l'albumina e c-met. Infatti l'albumina è una proteina secreta dal fegato nel sangue (rappresenta la principale proteina circolante) e quindi la sua espressione da parte di cellule indotte verso la linea epatocitaria è indice che tali cellule non solo hanno assunto un fenotipo simil epatico, ma hanno anche assunto caratteristiche di epatociti funzionali. D'altra parte c-met, recettore di HGF, risulta importante nello stabilire, in seguito a legame col suo ligando, un via di segnale fondamentale per i processi di riparazione e di rigenerazione epatica [*Huh CG et al., 2003*]. Tuttavia, è da sottolineare che per eventuali applicazioni *in vivo* nell'uomo il Matrigel™ non rappresenta un supporto idoneo, poiché potrebbe suscitare una risposta immunitaria data la sua origine animale e poiché non è dotato di buone caratteristiche meccaniche.

Per l'induzione epatocitaria delle cellule CD105 positive da UCB è stato valutato come supporto un idrogel costituito da oligopeptidi autoassemblanti, noto con il nome di PuraMatrix™, il quale era già stato impiegato con buon esito per la differenziazione di precursori epatocitari in cellule epatiche mature [*Semino CE et al., 2003*]. Incapsulate in tale gel, che è in grado di formare una matrice tridimensionale in opportune condizioni ioniche, e mantenute in coltura con terreno differenziativo fino a un massimo di 12 giorni, le cellule CD105 positive da UCB sono state in grado di esprimere il marcatore di differenziamento precoce HNF4-alfa a indicazione dell'avvenuta differenziazione in senso epatocitario. Tuttavia valutazioni a tempi più lunghi non sono state possibili in quanto il gel peptidico

perdeva la sua struttura tridimensionale dopo due settimane di coltura. Tali problemi costituiscono una limitazione per l'impiego di tale supporto nello studio *in vitro* del processo differenziativo epatocitario, che per risultare completo necessita di tempi più lunghi.

La differenziazione in senso epatocitario è stata ottenuta anche coltivando le cellule CD105 positive su matrice acellulare di fegato umano. Ottenuta mediante un solo ciclo di trattamento detergente enzimatico, essa ha mantenuto inalterata la composizione in fibre. Tuttavia, permaneva l'immunoreattività nei confronti di HLA-A a indicazione che, nonostante la decellularizzazione completa (come risultava dall'indagine istologica), conservava la competenza immunogenica. Inoltre, una volta posta in coltura sia con terreno di proliferazione che con terreno differenziativo epatocitario conservava inalterate le caratteristiche morfologiche fino a 14 giorni di coltura.

Sulla matrice acellulare di fegato sono state seminate le cellule CD105 positive da UCB: esse sono state in grado di aderire già a 24 ore dalla semina con solo terreno proliferativo e di rivestirne in modo compatto tutta la superficie entro 14 giorni. Analogamente le cellule su matrice mantenute in coltura con terreno differenziativo aderivano dopo 24 ore dalla semina mentre dopo 14 giorni, oltre a formare un rivestimento compatto e orientato, presentavano delle estroflessioni di membrana che si possono riscontrare sulla superficie di epatociti maturi. I risultati relativi alla produzione dell'albumina indicano che la matrice da sola rappresenta uno stimolo differenziativo, il quale tuttavia risulta probabilmente rafforzato dall'uso di un terreno contenente gli specifici fattori induttivi. Da tali risultati la matrice acellulare omologa sembrerebbe il supporto più idoneo per il differenziamento epatocitario di MSC, in quanto in grado di determinare da sola uno stimolo differenziativo. Inoltre rispetto al PuraMatrix™ essa presenta il vantaggio di mantenersi integra in coltura per tempi più lunghi, mentre rispetto al Matrigel™ risulta essere un supporto più sicuro, in quanto non derivante da colture cellulari neoplastiche, e maggiormente biocompatibile in quanto di origine umana e non animale.

L'ultimo aspetto studiato è stata la capacità di engraftment e di differenziamento epatocitario *in vivo* delle cellule CD105 positive da UC e da UCB. A questo scopo sono stati allestiti due modelli animali di danno epatico acuto da agente chemiotossico.

Nel primo modello animale, a ratti Lewis è stato somministrato tetracloruro di carbonio, che si accumula nel parenchima epatico dove subisce una trasformazione citocromo P450 dipendente producendo un metabolita altamente reattivo. Questo induce perossidazione lipidica e conseguente rottura delle membrane degli epatociti, determinando una necrosi acuta pericentrale [Nakahira K et al., 2003; Pilichos C et al., 2004].

Nel secondo modello animale, il danno epatico è stato indotto mediante somministrazione in ratti Lewis di una dose di alcool allilico, che agisce a livello periportale subendo una trasformazione, dipendente dalla alcool deidrogenasi e catalizzata dalle elevate concentrazioni di ossigeno locali, ad acroleina. Questo metabolita tossico provoca perdita dei gruppi sulfidrilici da parte delle proteine neosintetizzate, perossidazione lipidica e quindi danno alle membrane cellulari con conseguente necrosi acuta periportale [Badr MZ et al., 1986].

In seguito a somministrazione di tetracloruro di carbonio la mortalità, pari al 30%, è stata elevata nelle prime ore immediatamente successive e gli animali sopravvissuti presentavano, dopo 48 ore dalla somministrazione, il massimo grado di danno, che permaneva severo fino a 5 giorni per poi diminuire a 9 giorni, fino a risolversi senza comparsa di fibrosi dopo 16 giorni, grazie alla capacità rigenerativa intrinseca del fegato. Tali risultati hanno indicato che il momento più idoneo per il trapianto cellulare era rappresentato dalle 48 ore dall'induzione, in quanto a tale tempo era presente danno di grado elevato e non era ancora iniziato il processo di rigenerazione intrinseca. Le cellule somministrate avrebbero potuto trovare quindi un microambiente, costituito da citochine e altri segnali molecolari conseguenti al danno acuto, in grado di creare un gradiente di mobilitazione delle cellule staminali somministrate verso il sito del danno stesso. Tale modalità di mobilitazione è stata già osservata *in vivo* in caso di danno ad altri tessuti, quali miocardio [Toma C et al., 2002] o tessuto muscolare [Ferrari G et al., 1998].

Il quadro istologico emerso dall'analisi dei fegati dei ratti dopo 7 giorni dalla somministrazione intraperitoneale delle cellule CD105 positive da UC e da UCB (e quindi dopo 9 giorni dal danno) è risultato in gran parte simile a quello osservato negli animali di controllo (che avevano subito il danno ma che non avevano ricevuto cellule), anche se si potevano notare zone di parenchima integro, mentre a 14 giorni dalla somministrazione delle cellule il quadro istologico era perfettamente sovrapponibile ai controlli. I risultati ottenuti indicano che il contributo alla rigenerazione epatica da parte delle cellule somministrate è stato minimo o pressochè assente. Infatti, mediante indagine per l'espressione del marcatore umano HLA-A, solo poche cellule CD105 positive da UCB sono state ritrovate nel fegato a 7 giorni dalla somministrazione.

Mentre nel nostro modello di danno da tetracloruro di carbonio non è chiaro il contributo riparativo da parte delle cellule trapiantate, in altri lavori che hanno utilizzato ratti trattati con tetracloruro di carbonio è stato riscontrato invece un effetto terapeutico da parte di MSC. Nel lavoro di Oyagi [Oyagi S et al., 2006], MSC derivanti da midollo osseo, marcate con un colorante fluorescente e quindi somministrate attraverso la vena della coda, si localizzavano a

livello epatico e miglioravano sensibilmente il quadro istologico. E' da sottolineare il fatto che nel modello proposto da Oyagi e collaboratori la somministrazione del tetracloruro di carbonio (0,5mg/kg di peso corporeo) è stata ripetuta anche dopo il trapianto delle cellule e questo potrebbe essere stato utile per limitare il processo intrinseco di rigenerazione del fegato messo in atto dalle cellule ovali (staminali intraepatiche) o dagli stessi epatociti residui. Inoltre, il fatto che le cellule somministrate fossero in numero maggiore rispetto a quello da noi utilizzato ( $3 \times 10^6$  rispetto a  $1 \times 10^6$ ) e che fossero state prima marcate ne ha facilitato la localizzazione. Infine, le cellule erano state trattate prima del trapianto con HGF e conseguentemente già indotte *in vitro* verso la linea epatocitaria; anche uno stimolo differenziativo precedente alla somministrazione potrebbe quindi aver giocato un ruolo importante nel determinare il buon esito della sperimentazione.

Anche nel secondo modello animale le 48 ore dalla somministrazione di alcool allilico rappresentavano il momento di massimo danno e quindi il momento più idoneo al trapianto delle cellule CD105 positive. In questo caso, gli animali sono stati sacrificati dopo 2 e 7 giorni dalla somministrazione delle cellule, in quanto la lesione epatica veniva riparata in un tempo minore. A 4 giorni dal danno (e 2 dal trapianto delle cellule), il quadro istologico era sovrapponibile tra fegati di ratti trattati con cellule sia da UCB che da UC e fegati di ratti controllo. A 9 giorni dal danno (e a 7 dalla somministrazione delle cellule) sembrava esserci un miglioramento nel quadro istologico dei fegati di ratti trattati con cellule da UCB rispetto al controllo. I risultati ottenuti anche in questo caso sono stati insoddisfacenti ma suggeriscono che le cellule CD105 positive da UCB, e non quelle da UC, possano, anche se in minima parte, contribuire al processo rigenerativo. Tuttavia, contrariamente a quanto osservato nell'altro modello animale di danno epatico, tali cellule non erano rilevabili all'interno del fegato dopo 2 e 7 giorni dal trapianto (corrispondenti, rispettivamente, a 4 e 9 giorni dall'induzione del danno). E' quindi ipotizzabile che il loro possibile contributo sia legato alla liberazione di fattori favorenti la rigenerazione epatica piuttosto che all'engraftment nell'organo danneggiato.

Questi risultati si discostano da altri studi in cui il contributo riparativo al danno epatico da parte di cellule da UCB umano, almeno nella frazione ematopoietica, è risultato evidente grazie all'individuazione di marcatori epatici umani come Hepar1 nel fegato dell'animale trattato [Piscaglia AC et al., 2005]. Nel lavoro di Piscaglia e collaboratori è stato indotto danno in ratti non immunosoppressi mediante somministrazione intraperitoneale di una dose di alcool allilico di concentrazione tuttavia inferiore rispetto a quella da noi utilizzata (0,62 mmol/Kg di peso contro 0,93mmol/Kg). Ad esser somministrate per via intraperitoneale sono

state però le HSC ( $6 \times 10^5$  cellule CD34+/CD45+ o CD133+/CD45+) dell'UCB e non le MSC. Tali cellule non solo raggiungevano e si localizzavano nel fegato danneggiato (presenza nel fegato di ratto del marcatore epatico umano HepPar1), ma anche assumevano un fenotipo simil-epatico (espressione di albumina umana rivelata mediante PCR). Quindi, in questo caso il danno epatico, pur essendo di entità inferiore rispetto a quello da noi indotto, è stato in grado di favorire il recruitment delle cellule somministrate e di indurle verso la linea epatocitaria, con miglioramento del quadro istologico .

E' da sottolineare il fatto che comunque in tutti i modelli animali utilizzati per testare la capacità rigenerativa epatica di MSC o staminali umane si sono potute osservare solo singole cellule o al più piccoli cluster di cellule simil-epatiche derivanti da esse, mentre non è stata ancora dimostrata la loro capacità di formare tessuto epatico vero e proprio. [Nussler A et al., 2006].

Sulla base dei risultati ottenuti in questo lavoro, va evidenziato come i due modelli animali utilizzati debbano essere ridisegnati tenendo conto delle seguenti osservazioni.

Sembra preferibile utilizzare animali immunosoppressi, in quanto si ritiene che la maggior parte delle cellule trapiantate possa aver subito l'attacco del sistema immunitario dell'ospite ancor prima di giungere all'organo danneggiato, anche se in molti lavori l'uso di animali non immunosoppressi non ha comportato problemi di engraftment delle cellule somministrate [Oyagi S et al., 2006; Piscaglia AC et al., 2005]. Per facilitare il delivery delle cellule appare opportuno scegliere una via di somministrazione alternativa all'iniezione intraperitoneale, come per esempio la via intrasplenica, tramite la vena porta oppure attraverso la vena della coda. Si ritiene altresì raccomandabile l'utilizzo di sostanze, quali l'N-2 acetilaminofluorene [Sell S, 2003], in grado di bloccare la rigenerazione intrinseca degli epatociti, che maschera l'azione riparativa delle cellule somministrate. Infine, una strategia alternativa può essere rappresentata dalla somministrazione di cellule già differenziate *in vitro* e la marcatura delle medesime per facilitare l'indagine volta al loro ritrovamento nel fegato dell'animale trattato.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano chiaramente che le cellule CD105 positive da UC e da UCB presentano delle caratteristiche di MSC per quanto riguarda la capacità proliferativa, l'espressione di marcatori e la capacità differenziativa verso linee cellulari di derivazione mesodermica (linea adipogenica ed osteogenica). Per quanto riguarda la differenziazione epatocitaria, si sono ottenuti risultati apprezzabili dall'induzione *in vitro* di entrambi i tipi di sottopopolazione cellulare, mentre gli esperimenti *in vivo* non hanno portato a esiti soddisfacenti. Attualmente, per verificare se quest'ultimo risultato sia ascrivibile ad una incapacità delle cellule CD105 positive a differenziarsi *in vivo* o sia conseguente a condizioni

sperimentali non ottimali, sono in corso ulteriori esperimenti in topi CD-1 nude, ridisegnati sulla base delle considerazioni precedentemente discusse.



## BIBLIOGRAFIA

**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.

**Alvarez-Dolado M**, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003; **425(6961)**: 968-73.

**Ashman LK**, Cambareri AC, To LB, Levinsky RJ, Juttner CA. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood*. 1991; **78(1)**: 30-7.

**Badr MZ**, Belinsky SA, Kauffman FC, Thurman RG. Mechanism of hepatotoxicity to periportal regions of the liver lobule due to allyl alcohol: role of oxygen and lipid peroxidation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986; **238(3)**: 1138–1142

**Barry FP**, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; **265(1)**: 134-9.

**Bhattacharya B**, Miura T, Brandenberger R, Mejido J, Luo Y, Yang AX, Joshi BH, Ginis I, Thies RS, Amit M, Lyons I, Condie BG, Itskovitz-Eldor J, Rao MS, Puri RK. Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood*. 2004; **103(8)**: 2956-64.

**Bianchi G**, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res*. 2003; **287(1)**: 98-105.

**Bieback K**, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004; **22(4)**: 625-34.

**Bjornson CR**, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999; **283(5401)**: 534-7.

**Boland GM**, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2004; **93(6)**: 1210-30.

**Bruder SP**, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 1997; **64(2)**: 278-94.

**Burra P**, Tomat S, Conconi MT, Macchi C, Russo FP, Parnigotto PP, Naccarato R, Nussdorfer GG. Acellular liver matrix improves the survival and functions of isolated rat hepatocytes cultured in vitro. *Int J Mol Med*. 2004; **14(4)**: 511-5.

**Campagnoli C**, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001; **98(8)**: 2396-402.

**Caplan AI**. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; **9(5)**: 641-50.

**Castro-Malaspina H**, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980; **56(2)**: 289-301.

**Chen D**, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 2004; **22(4)**: 233-41. Review.

**Colter DC**, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; **97(7)**: 3213-8.

**Colter DC**, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; **98(14)**: 7841-5.

**Conconi MT**, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, Bo P, Nussdorfer GG, Parnigotto PP. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med*. 2006; **18(6)**: 1089-96.

**Covas DT**, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res*. 2003; **36(9)**: 1179-83.

**da Silva Meirelles L**, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; **119(Pt 11)**: 2204-13.

**De Bari C**, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001; **44(8)**: 1928-42.

**De Coppi P**, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*. 2007; **25(1)**: 100-6.

**De Coppi P**, Bellini S, Conconi MT, Sabatti M, Simonato E, Gamba PG, Nussdorfer GG, Parnigotto PP. Myoblast-acellular skeletal muscle matrix constructs guarantee a long-term repair of experimental full-thickness abdominal wall defects. *Tissue Eng*. 2006; **12(7)**: 1929-36.

**DeLisser HM**, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*. 1997; **151(3)**: 671-7.

**Dennis JE**, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*. 2002; **170(2-3)**: 73-82.

**Dennis JE**, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res.* 1999; **14(5)**: 700-9.

**Di Campi C**, Piscaglia AC, Rutella S, Bonanno G, Vecchio FM, Zocco MA, Monego G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Improvement of mortality rate and decrease in histologic hepatic injury after human cord blood stem cell infusion in a murine model of hepatotoxicity. *Transplant Proc.* 2005; **37(6)**: 2707-10.

**D'Ippolito G**, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci.* 2004; **117(Pt 14)**: 2971-81.

**D'Ippolito G**, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, and Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow, *J. Bone Miner. Res.* 1999; **14(7)**: 1115–1122.

**Dominici M**, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; **8(4)**: 315-7.

**Erices A**, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000; **109(1)**: 235-42.

**Evans MJ**, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; **292(5819)**: 154-6.

**Fackler MJ**, Krause DS, Smith OM, Civin CI, May WS. Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood* 1995; **85(11)**: 3040-3047.

**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.

**Fiegel HC**, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2003; **21(1)**: 98-104.

**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.

**Fukuchi Y**, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells*. 2004; **22(5)**: 649-58.

**Gang EJ**, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Han H, Kim H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004; **22(4)**: 617-24.

**Gluckman E**, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989; **321(17)**: 1174-8.

**Goodwin HS**, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001; **7(11)**: 581-8.

**Grayson WL**, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol*. 2006; **207(2)**: 331-9.

**Gregory PG**, Connolly CK, Toner M, Sullivan SJ. In vitro characterization of porcine hepatocyte function. *Cell Transplant*. 2000; **9(1)**: 1-10.

**Hansen-Smith FM**, Carlson BM. Cellular responses to free grafting of the extensor digitorum longus muscle of the rat. *J. Neurol. Sci*. 1979; **41(2)**: 149-173.

**Haziot A**, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R and Goyert SM. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol*. 1988; **141(2)**: 547-52.

**Hong SH**, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; **330(4)**: 1153-61.

**Horwitz EM**, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99(13)**: 8932-7.

**Huh CG**, Factor VM, Sánchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; **101(13)**: 4477-82.

**Izadpanah R**, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*. 2006; **99(5)**: 1285-97.

**Jaiswal N.**, Haynesworth S.E., Caplan A.I., Bruder S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem*. 1997; **64(2)**: 295-312.

**Jensen UB.**, Lowell S., Watt F.M. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* 1999; **126(11)**: 2409-2418.

**Jiang Y**, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol.* 2002; **30(8)**: 896-904.

**Jones PH**. In vitro comparison of embryonic myoblasts and myogenic cells isolated from regenerating adult rat skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 1982; **139(2)**: 401-404.

**Kadiyala S**, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* 1997; **6(2)**: 125-34.

**Kakinuma S**, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, Teramoto K, Arai S, Sato C, Takase K, Yasumizu T, Teraoka H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells.* 2003; **21(2)**: 217-27.

**Kamolz LP**, Kolbus A, Wick N, Mazal PR, Eisenbock B, Burjak S, Meissl G. Cultured human epithelium: human umbilical cord blood stem cells differentiate into keratinocytes under in vitro conditions. *Burns.* 2006; **32(1)**: 16-9.

**Kang XQ**, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol.* 2005; **11(47)**: 7461-5.

**Koc ON**, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2000; **18(2)**: 307-16.

**Kolf CM**, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007; **9(1)**:204. Review.

**Koller MR**, Manchel I, Palsson BO. Importance of parenchymal:stromal cell ratio for the ex vivo reconstitution of human hematopoiesis. *Stem Cells.* 1997; **15(4)**: 305-13.



**Kong KY**, Ren J, Kraus M, Finklestein SP, Brown RH Jr. Human umbilical cord blood cells differentiate into muscle in sjl muscular dystrophy mice. *Stem Cells*. 2004; **22(6)**: 981-93.

**Lee KD**, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004; **40(6)**: 1275-84.

**Lee OK**, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004; **103(5)**: 1669-75.

**Ma N**, Stamm C, Kaminski A, Li W, Kleine HD, Muller-Hilke B, Zhang L, Ladilov Y, Egger D, Steinhoff G. Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res*. 2005; **66(1)**: 45-54.

**Mareschi K**, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001; **86(10)**: 1099-100.

**Mayani H**, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*. 1998; **16(3)**:153-65. Review.

**Meezan E**, Hjelle JT, Brendel K. A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life Sci*. 1975; **17(11)**: 1721-32.

**Metcalf D**. The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells*. 2003; **21(1)**:5-14. Review.

**Mezey E**, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000; **290(5497)**: 1779-82.

**Mizrak D**, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment. *J Pathol*. 2008; **214(1)**: 3-9.

**Müller-Ehmsen J**, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, Laird PW, Kedes L. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; **34(2)**: 107-16.

**Nagaki M**, Shidoji Y, Yamada Y, Sugiyama A, Tanaka M, Akaike T, Ohnishi H, Moriwaki H, Muto Y. Regulation of hepatic genes and liver transcription factors in rat hepatocytes by extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; **210(1)**: 38-43.

**Nakahira K**, Takahashi T, Shimizu H, Maeshima K, Uehara K, Fujii H, Nakatsuka H, Yokoyama M, Akagi R, Morita K. Protective role of heme oxygenase-1 induction in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 2003; **66(6)**: 1091-105.

**Noth U**, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res.* 2002; **20(5)**: 1060-9.

**Nussler A**, König S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, Brulport M, Gabelein G, Schormann W, Schulze M, Ellis E, Kraemer M, Nocken F, Fleig W, Manns M, Strom SC, Hengstler JG. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol.* 2006; **45(1)**: 144-59. Review.

**Nuttall ME**, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol.* 2004; **4(3)**: 290-4.

**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.

**Oyagi S**, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl<sub>4</sub>-injured rats. *J Hepatol.* 2006; **44(4)**: 742-8.

**Palmer TD**, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 1997; **8(6)**: 389-404.

**Parnigotto PP**, Gamba PG, Conconi MT, Midrio P. Experimental defect in rabbit urethra repaired with acellular aortic matrix. *Urol Res.* 2000; **28(1)**: 46-51.

**Parnigotto PP**, Marzaro M, Artusi T, Perrino G, Conconi MT. Short bowel syndrome: experimental approach to increase intestinal surface in rats by gastric homologous acellular matrix. *J Pediatr Surg.* 2000; **35(9)**: 1304-8.

**Petite H**, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol.* 2000; **18(9)**: 959-63.

**Pilichos C**, Perrea D, Demonakou M, Preza A, Donta I. Management of carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats by syngeneic hepatocyte transplantation in spleen and peritoneal cavity. *World J Gastroenterol.* 2004; **10(14)**: 2099-102.

**Piscaglia AC**, Di Campli C, Zocco MA, Di Gioacchino G, Novi M, Rutella S, Bonanno G, Monego G, Vecchio FM, Michetti F, Mancuso S, Leone G, Gasbarrini G, Pola P, Gasbarrini A. Human cordonal stem cell intraperitoneal injection can represent a rescue therapy after an acute hepatic damage in immunocompetent rats. *Transplant Proc.* 2005; **37(6)**: 2711-4.

**Pittenger MF**, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; **284(5411)**: 143-7.

**Polak JM**, Bishop AE. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; **1068**:352-66. Review.

**Portmann-Lanz CB**, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; **194(3)**: 664-73.

**Prockop DJ.** Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997; **276(5309)**: 71-4. Review.

**Quirici N,** Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol*. 2002; **30(7)**: 783-91.

**Report NHI** (National Institute of Health), 2001. Stem cell information. <http://stemcells.nih.gov>.

**Reya T,** Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature* 2001; **414 (6859)**: 105–11.Review.

**Reyes M,** Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001; **98(9)**: 2615-25.

**Reynolds BA,** Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; **255(5052)**: 1707-10.

**Richert L,** Binda D, Hamilton G, Viollon-Abadie C, Alexandre E, Bigot-Lasserre D, Bars R, Coassolo P, LeCluyse E. Evaluation of the effect of culture configuration on morphology, survival time, antioxidant status and metabolic capacities of cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. 2002; **16(1)**: 89-99.

**Romanov YA,** Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003; **21(1)**: 105-10.

**Runge D,** Runge DM, Bowen WC, Locker J, Michalopoulos GK. Matrix induced re-differentiation of cultured rat hepatocytes and changes of CCAAT/enhancer binding proteins. *Biol Chem*. 1997; **378(8)**: 873-81.

**Sabatini F**, Petecchia L, Tavian M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest.* 2005; **85(8)**: 962-71.

**Salingcarnboriboon R**, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, Noda M. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res.* 2003; **287(2)**: 289-300.

**Sánchez A**, Alvarez AM, Pagan R, Roncero C, Vilaró S, Benito M, Fabregat I. Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture. *J Hepatol.* 2000; **32(2)**: 242-50.

**Schwartz RE**, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest.* 2002; **109(10)**: 1291-302.

**Sell S**. The hepatocyte: heterogeneity and plasticity of liver cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; **35(3)**: 267-71. Review.

**Semino CE**, Merok JR, Crane GG, Panagiotakos G, Zhang S. Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation.* 2003; **71(4-5)**: 262-70.

**Seo BM**, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004; **364(9429)**: 149-55.

**Shu SN**, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol.* 2004; **10(19)**: 2818-22.

**Steinhoff G**, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pethig K, Haverich A, Bader A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation.* 2000; **102(19 Suppl 3)**: III50-5.

**Stocum DL.** Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen.* 2001; **9(6)**: 429-42.

**Theise ND,** Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology.* 2000; **31(1)**: 235-40

**Thomson JA,** Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; **92(17)**: 7844-8.

**Thomson JA,** Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod.* 1996; **55(2)**: 254-9.

**Thomson JA,** Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; **282(5391)**: 1145-7.

**Thorgeirsson SS.** Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J.* 1996 **10(11)**: 1249-5126. Review.

**Till JE,** McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961; **14**: 213-22.

**Toma C,** Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002; **105(1)**: 93-8.

**Tondreau T,** Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, Mortier C, Bron D, Lagneaux L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* 2005; **23(8)**: 1105-12.

**Trowbridge I.S.** and Thomas M.L. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; **12**: 85-116. Review.

**Tsutsumi S**, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; **288(2)**: 413-9.

**Wang HS**, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004; **22(7)**: 1330-7.

**Weiss ML**, Mitchell KE, Hix JE, Medicetty S, El-Zarkouny SZ, Grieger D, Troyer DL. Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. *Exp Neurol.* 2003; **182(2)**: 288-99.

**Weiss TS**, Jahn B, Cetto M, Jauch KW, Thasler WE. Collagen sandwich culture affects intracellular polyamine levels of human hepatocytes. *Cell Prolif.* 2002; **35(5)**: 257-67.

**Wexler SA**, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol.* 2003; **121(2)**: 368-74.

**Wyrsh A**, dalle Carbonare V, Jansen W, Chklovskaja E, Nissen C, Surbek D, Holzgreve W, Tichelli A, Wodnar-Filipowicz A. Umbilical cord blood from preterm human fetuses is rich in committed and primitive hematopoietic progenitors with high proliferative and self-renewal capacity. *Exp Hematol.* 1999; **27(8)**: 1338-45.

**Yoshida S**, Ishikawa F, Kawano N, Shimoda K, Nagafuchi S, Shimoda S, Yasukawa M, Kanemaru T, Ishibashi H, Shultz LD, Harada M. Human cord blood--derived cells generate insulin-producing cells in vivo. *Stem Cells.* 2005; **23(9)**: 1409-16.

**Young RG**, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res.* 1998; **16(4)**: 406-13.



**Zuk PA**, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; **7(2)**: 211-28.