



**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

**STUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DI CELLULE  
MESENCHIMALI DA SANGUE CORDONALE E  
CELLULE SATELLITE  
DA FIBRE MUSCOLARI SCHELETRICHE NELLA  
RIGENERAZIONE MUSCOLARE**

**Direttore della Scuola e Supervisore:**

Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

**Dottorando:** Dott. Enea Simonato

31 gennaio 2008

---

# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>i</b>  |
| <b>RIASSUNTO</b> .....   | <b>ii</b> |
| <b>INTRODUZIONE</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1. Difetti congeniti della parete addominale anteriore.....                      | 1         |
| a. <i>Onfalocele</i> .....   | 1         |
| b. <i>Gastroschisi</i> .....   | 3         |
| 2. Tecniche ricostruttive.....   | 4         |
| 3. Ingegneria Tessutale.....   | 8         |
| 4. Matrice acellulare nell'ingegneria tessutale.....                             | 10        |
| 5. Cellule staminali.....  | 17        |
| a. <i>Cellule staminali embrionali (ESC)</i> .....                               | 18        |
| b. <i>Cellule staminali da tessuti adulti (ASC)</i> .....                        | 19        |
| 6. Le cellule satellite del muscolo.....   | 21        |
| 7. Ingegneria Tessutale e tessuto muscolare scheletrico.....                     | 24        |
| 8. Cellule staminali mesenchimali.....   | 26        |
| <b>SCOPO DELLA TESI</b> .....  | <b>30</b> |
| <b>MATERIALI E METODI</b> .....  | <b>32</b> |
| <b>SPERIMENTAZIONE IN VITRO</b>  |           |
| 1. Mioblasti derivati da cellule satellite del muscolo scheletrico.....          | 32        |
| a. <i>Colture cellulari</i> .....  | 32        |
| b. <i>Ottenimento della matrice acellulare</i> .....                             | 33        |
| c. <i>Saggio in vitro su membrana corioallantoidea di pollo (CAM test)</i> ..... | 34        |
| d. <i>Colture in vitro di mioblasti su matrice acellulare</i> .....              | 36        |
| 2. Cellule mesenchimali da sangue cordonale.....                                 | 36        |

|  |    |
|--|----|
| a. <i>Colture cellulari</i> .....  | 36 |
| b. <i>Differenziamento in vitro di cellule mesenchimali da sangue cordonale</i> .....  | 37 |
| <b>SPERIMENTAZIONE IN VIVO</b> .....   | 40 |
| 1. Riparo di difetti sperimentali della parete addominale con matrice muscolare acellulare ripopolata <i>in vitro</i> da mioblasti ..... | 40 |
| 3. Impianto di MSC da sangue cordonale in muscolo tibialis anterior danneggiato da bupivacaina cloridrato.....                           | 41 |
| a. <i>Analisi istochimica</i> .....  | 42 |
| b. <i>Analisi immunoistochimica</i> .....  | 43 |
| c. <i>Valutazione dell'integrazione delle cellule mesenchimali nei muscoli tibialis anterior</i> .....                                   | 46 |
| d. <i>Analisi molecolare: espressione genica</i> .....   | 46 |
| <b>RISULTATI</b> .....   | 52 |
| 1. Riparo di difetti sperimentali della parete addominale .....  | 52 |
| a. <i>Colture di mioblasti da cellule satellite di muscolo scheletrico</i> .....   | 52 |
| b. <i>Matrice muscolare acellulare</i> .....   | 53 |
| c. <i>Colture di mioblasti su matrice acellulare in vitro</i> .....  | 54 |
| d. <i>Impianto in vivo</i> .....   | 54 |
| e. <i>Analisi macroscopica degli impianti</i> .....  | 55 |
| f. <i>Analisi istochimica degli impianti</i> .....   | 56 |
| g. <i>Presenza gene SRY</i> .....  | 60 |
| h. <i>Analisi immunoistochimica comparata all'analisi molecolare</i> .....   | 60 |
| 2. <i>Cellule mesenchimali da sangue cordonale</i> .....   | 67 |
| a. <i>Differenziamento miogenico in vitro di MSC</i> .....   | 67 |
| b. <i>Valutazione in vivo del potenziale differenziativo di MSC</i> .....  | 70 |

---

**DISCUSSIONE**.....77

**BIBLIOGRAFIA**.....90

---

## ABSTRACT

Previous works showed that muscle substitutes composed by acellular matrix and myoblasts may represent a promising approach for the treatment of diseases characterized by congenital absence or loss of large areas of skeletal muscle tissue. Here, the regeneration process occurring *in vivo* within the prosthetic material has been studied verifying the expression, as mRNA and protein, of some skeletal muscle and nerve tissue markers during three months after reconstructive surgery. The experimental evidences indicate that a progressive muscle remodelling within the implants exists and it is not completed after three months. Indeed, the simultaneous presence of markers belonging to both early and late differentiative stages indicates the presence of activated progenitors towards the myogenic line and cellular elements of advanced stages. Moreover, the involving of circulating precursors, probably of marrow origin, in the regeneration process it is suggested by the following observations: i) persistence of poorly differentiated cells at 3 months after surgery, ii) important cell migration from vessels without inflammatory phenomena, and iii) implanted myoblasts, that are cells already committed toward a specific fate, presumably form multinucleated elements in a short time. Finally, there is a rapid appearance of both vascular network and the nervous component. Although these promising results, in view of medical application a problem arise when the function of muscle satellite cells is impaired or their number inside the muscle fibers is low. To overcome this problem, this research has been addressed to the identification of alternative cell sources.

For this reason, it has been evaluated both *in vitro* and *in vivo* the myogenic potential of mesenchymal cells (MSCs) obtained from umbilical cord blood (UCB). There is the possibility to withdraw the umbilical cord blood at the birth time and to store it in tissue banks, and having an autologous MSC reserve to use for congenital muscular diseases. Evidence for myogenic differentiation was found when MSCs were seeded on Matrigel® coated plates and cultured with myogenic media. After 4 days Myf-5, detected by immunofluorescence, was expressed by 13% of MSCs increasing to 30% at 8 days. We used quantitative PCR for human

---

MyoD and Myogenin mRNAs to further demonstrate myogenic differentiation of MSCs. To evaluate the regenerative capacity of MSCs we used a skeletal muscle chemical injury model (bupivacaine hydrochloride), resulting in necrosis of muscle fibers in Lewis rat Tibialis Anterior. Undifferentiated green fluorescent protein (GFP)-labeled MSCs were injected into the injured muscle, without immunosuppression. The cells engrafted after 1 week and stained positive for Myf-5 and MyoD. After 2 weeks, we noted striations in fibers containing UCB-MSCs suggesting an organization of cytoskeletal proteins into sarcomeres. The skeletal muscle appeared intact by histological analysis, without signs of significant immunologic response, and the presence of MSCs was detected by immunostaining with a monoclonal antibody against human-Nuclei. In addition, these cells also expressed myosin and sarcomeric tropomyosin, a motor-protein and an actin-binding filament protein, respectively. At both time points we observed fibers with centrally located nuclei, indicating regenerated fibers. Finally, the number of GFP-positive fibers/total fibers counted in several fields was 40% for both time points and the area covered by these fibers was 20% of all fibers at 7 days increasing to 26% at 14 days, indicating a maturation of these myofibers.

Our *in vitro* and *in vivo* data indicate that human MSCs are able to differentiate towards the myogenic lineage and may be efficiently incorporated into injured skeletal muscle, supporting the muscle regenerative process.

---

## RIASSUNTO

Alcuni lavori svolti dal nostro gruppo di ricerca, hanno dimostrato che sostituti muscolari composti da matrice acellulare e mioblasti possono rappresentare un valido approccio per il trattamento di patologie caratterizzate dall'assenza congenita o perdita di massa muscolo-scheletrica. In questo lavoro è stato studiato il processo rigenerativo che avviene *in vivo* all'interno del materiale protesico, verificando la presenza, sia come RNA che come proteina, di alcuni marcatori muscolari e nervosi nei tre mesi successivi all'intervento di chirurgia ricostruttiva. Le evidenze sperimentali ottenute, anche se non in grado di fornire un quadro completo, hanno indicato che esiste all'interno dei patch un progressivo rimodellamento della componente muscolare che a 3 mesi dall'intervento non appare totalmente concluso. Infatti, la presenza contemporanea, a partire da un mese, di marcatori caratteristici sia delle prime fasi differenziative che di quelle successive, indica l'esistenza di progenitori attivati indirizzati verso la linea miogenica e di elementi cellulari a stadio di maturazione avanzato. Inoltre il coinvolgimento di precursori circolanti, probabilmente di origine midollare, nel processo rigenerativo viene suggerito dalle seguenti osservazioni: i) persistenza di cellule scarsamente differenziate a 3 mesi dall'intervento, ii) importante migrazione cellulare dai vasi non associata a fenomeni infiammatori, e iii) i mioblasti impiantati, essendo cellule già indirizzate verso un preciso destino differenziativo, presumibilmente formano, analogamente a quanto succede *in vitro*, elementi plurinucleati in tempi relativamente brevi. Infine si ha una rapida comparsa sia della rete vascolare che della componente nervosa. Prevedendo di utilizzare nella futura pratica clinica tecniche di tissue engineering per riparare difetti muscolari a tutto spessore, quali onfalocele e gastroschisi, si è voluto prendere in considerazione l'utilizzo di altre fonti cellulari. A questo proposito si è valutata la capacità miogenica *in vitro* ed *in vivo* di cellule mesenchimali (MSC) ottenute da sangue cordonale. Esiste infatti la possibilità di prelevare, all'atto della nascita, il sangue cordonale e di stoccarlo in banche di tessuti, così da avere una riserva autologa di MSC da utilizzare nel trattamento di malattie congenite muscolari. Le MSC seminate su piastre condizionate con Matrigel e terreno di induzione

---

miogenica, sono state differenziate *in vitro* verso la linea miogenica. Dopo 4 giorni il Myf-5, rilevato all'immunofluorescenza, era espresso dal 13% delle MSC e aumentava al 30% a 8 giorni. Per confermare il differenziamento in atto, si è eseguita una real time PCR (quantitativa) per human-MyoD e human-Myogenin mRNAs. Per valutare la capacità rigenerativa della MSC è stato utilizzato un modello di danno muscolare al Tibialis Anterior di ratti Lewis indotto chimicamente (bupivacaina cloridrato), che produce necrosi delle fibre muscolari. MSC indifferenziate ed esprimenti GFP, sono state iniettate nel muscolo precedentemente danneggiato, senza utilizzare terapia immunosoppressiva. Le cellule si integravano dopo 1 settimana e risultavano positive per Myf-5 e MyoD. Dopo 2 settimane, si notavano delle striature, zone chiare e scure, all'interno di fibre muscolari GFP-positive. Il muscolo scheletrico appariva intatto all'analisi istologica, senza segni di risposta immunologica significativa, e la presenza di MSC è stata anche confermata tramite immunofluorescenza utilizzando l'anticorpo monoclonale anti human-Nuclei. Inoltre, le cellule impiantate esprimevano miosina e tropomiosina sarcomerica. Ad entrambi i time point si osservavano fibre con nuclei situati in posizione centrale, indicanti fibre in fase di rigenerazione. Infine, il rapporto dato dalle fibre GFP-positive/totale delle fibre contate era del 40% per entrambi i tempi, mentre l'area totale data dalla somma delle sezioni trasversali di tali fibre era di 20% sul totale dopo 7 giorni, e saliva al 26% dopo 14 giorni, indicando un accrescimento delle fibre muscolari in questo arco di tempo.

I risultati ottenuti *in vitro* e *in vivo* indicano che MSC umane sono in grado di differenziarsi verso la linea miogenica e si possono integrare in modo efficiente nel muscolo scheletrico precedentemente danneggiato sostenendo, almeno in parte, il processo di rigenerazione muscolare.

---

# INTRODUZIONE

## 1. DIFETTI CONGENITI DELLA PARETE ADDOMINALE ANTERIORE

Le malformazioni congenite sono alterazioni della forma e della struttura del corpo umano presenti alla nascita ed originatesi durante la vita uterina.

La gastroschisi e l'onfalocele sono le due più gravi patologie eviscerative neonatali che conseguono ad un difetto di chiusura sulla linea mediana della parete addominale anteriore durante lo sviluppo embrionale.

### a) Onfalocele

L'onfalocele può essere definito come una protrusione di una parte più o meno ampia d'intestino attraverso un difetto mediano del muscolo addominale alla base dell'ombelico. Questa malformazione è dovuta alla mancata coalescenza delle pliche in corrispondenza dell'anello ombelicale primitivo tra la 6<sup>a</sup> e la 10<sup>a</sup> settimana di gravidanza. Normalmente, mentre il feto si sta sviluppando durante la gravidanza, c'è una piccola apertura nella muscolatura addominale attraverso la quale passa il cordone ombelicale. Quando il feto matura, i muscoli addominali si incontrano nel centro e crescono insieme portando alla chiusura di questa apertura iniziale. L'onfalocele si crea quando gli organi addominali non ritornano nella cavità addominale come dovrebbero.

Questa malformazione si presenta sotto forma di una tumefazione più o meno rotondeggiante, centro-addominale e del diametro variabile da 3-4 cm fino ad 8-10 cm; quest'ultimo tipo, conosciuto come onfalocele gigante, presenta al suo interno il fegato, l'intestino tenue, il crasso e, a volte, anche altri organi come la milza, il colon, lo stomaco e, raramente nella femmina, le ovaie.

I difetti addominali più piccoli, che sono più frequenti, possono presentare l'erniazione di poche anse intestinali e quindi possono essere definiti come ernie del cordone ombelicale. La cavità addominale stessa, inoltre, può essere troppo

---

piccola a causa del mancato sviluppo durante la gravidanza. Un evento particolarmente grave, che in più del 10% dei casi può avvenire già nell'utero, corrisponde alla rottura del sacco erniato esponendo i visceri al pericolo di infezioni. Quando ciò accade è difficile stabilire se si tratta di onfalocele oppure di gastroschisi. Conseguenze immediate sono la perdita di acqua da parte dell'intestino e l'ipotermia dovuta alla perdita di calore e alla disidratazione da evaporazione dell'acqua a livello delle anse intestinali scoperte. Gli organi che sono erniati, se sono stretti o contorti, possono perdere il loro rifornimento di sangue e ciò può danneggiare ancora di più questi visceri portandoli alla necrosi.

I bambini con onfalocele, oltre ad essere in genere sottopeso a causa dello stress da questa condizione prima della nascita, hanno un rischio più elevato del normale di presentare altre anomalie associate, comprese le atresie intestinali e le anomalie cardiache e renali, che devono essere ricercate e individuate prima di effettuare l'intervento chirurgico. Spesso infatti viene effettuato un ecocardiogramma per ricercare prima della nascita la presenza di anomalie.

Non è possibile, invece, effettuare la diagnosi ecografica prenatale prima della 12<sup>a</sup> settimana di gestazione, in quanto è tra la 6<sup>a</sup> e la 10<sup>a</sup> che si ha il difetto di chiusura e di sviluppo della parete addominale per il mancato ritorno dell'intestino fetale dal cordone ombelicale alla cavità addominale [Domini e Lima, 2003].

La prognosi del paziente affetto da onfalocele è fondamentalmente correlata sia alle complicanze addominali insite che alla gravità delle malformazioni associate, soprattutto cardiache, che condizionano la sopravvivenza. Questa nel complesso si stima essere del 70%. I bambini nati con un grosso difetto della parete hanno problemi a lungo termine, riguardanti soprattutto la digestione e le infezioni. Lungo un ventennio di studi [Stoll et al., 2001] si sono registrati 58 casi di onfalocele e 47 di gastroschisi su di un totale di 265858 nascite consecutive, con una prevalenza alla nascita di 2,18 su 10000 nati per l'onfalocele e di 1,76 su 10000 nati per la gastroschisi: 14 (24,1%) e 29 (61,7%) casi erano nati vivi, 14 (24,1%) e 11 (23,4%) erano casi di aborto spontaneo tardivo o nati morti e, in 30 (51,7%) e 7 (14,9%) casi si era interrotta la gravidanza a seguito di diagnosi prenatale di, rispettivamente, onfalocele e gastroschisi. Una diagnosi prenatale era stata fatta nel 61,9% dei casi e fu effettuata al momento della nascita o nella prima settimana di vita negli altri casi.

---

Ci furono 37 (35,2%) casi senza e 68 (64,8%) con altre malformazioni. Questi ultimi sono stati divisi in sindromi riconosciute (18 casi di tipo cromosomiale e 5 di tipo non cromosomiale) e sindromi non riconosciute (45 casi di malformazioni multiple).

## **b) Gastroschisi**

La gastroschisi (o laparoschisi) è una protrusione dei visceri addominali attraverso un piccolo e completo difetto della parete addominale, di dimensione di solito minore a 4 cm, localizzato alla destra del cordone ombelicale e in alcuni casi separato da esso da tessuto cutaneo [Domini e Lima, 2003].

La diagnosi avviene tramite il rilevamento, per mezzo di un'ecografia prenatale tra la 18<sup>a</sup> e la 20<sup>a</sup> settimana di gestazione, di un difetto addominale localizzato alla destra del cordone ombelicale e dalla evidenza di anse intestinali libere nel liquido amniotico. Siccome queste, diversamente dall'onfalocele, non risultano ricoperte da peritoneo, appaiono edematose e ricoperte da un essudato infiammatorio (peritonite chimica). Il contatto con il fluido amniotico causa anche la cessazione dei normali movimenti intestinali sia prima che dopo la nascita e la ripresa di questi si ha soltanto dopo diverse settimane dalla nascita.

Alcune volte la torsione dell'intestino determina una compromissione della vascolarizzazione, tale da portare a necrosi di ampi tratti intestinali e conseguentemente alla morte del feto [Jeejeebhoy, 2002].

Un'altra differenza rispetto all'onfalocele consiste nel fatto che il fegato è collocato sempre all'interno dell'addome mentre lo stomaco raramente fuoriesce. Sono eccezionali ed atipici i casi nei quali è presente l'erniazione della colecisti, dell'utero, delle tube, della vescica, dei testicoli e delle ovaie.

Clinicamente, la gastroschisi viene suddivisa in una varietà antenatale, in cui l'aspetto macroscopico delle anse risulta maggiormente alterato, ed una perinatale, in cui i segni di sierosità sono scarsi.

Diversamente dall'onfalocele, la gastroschisi non è associata ad anomalie cromosomiche o altri gravi difetti (nel 79% dei casi è una malformazione isolata, Calzolari et al., 1995) e perciò il grado di sopravvivenza è più alto. La torsione dell'intestino (volvolo) determina una compromissione della vascolarizzazione e

---

perciò può necrotizzare ampi tratti intestinali e conseguentemente portare a morte il feto. Attualmente nei centri di chirurgia neonatale la possibilità di guarigione raggiunge circa il 90% dei casi (la mortalità è legata alla misura del difetto della parete addominale, alla quantità e alle condizioni dell'intestino e al coinvolgimento di altri organi) e l'aspettativa di vita può essere considerata normale.

## **2. TECNICHE RICOSTRUTTIVE**

Nonostante i progressi compiuti dalla chirurgia pediatrica negli ultimi anni, la mortalità riguardante i difetti della parete addominale è rimasta elevata, assestandosi attorno al 25% per l'onfalocele e al 10% per la gastroschisi. Obiettivo prioritario del trattamento chirurgico per ambedue le malformazioni è il riposizionamento dei visceri nel cavo addominale e la chiusura del difetto, che può essere effettuata in un tempo unico (chiusura primaria) o in tempi successivi (chiusura in più tempi).

*Chiusura primaria.* Prevede l'escissione del sacco (onfalocele), l'ispezione della cavità addominale, la correzione di eventuali difetti di continuità intestinale (atresie), la riduzione dei visceri erniati nel cavo peritoneale e, in ultimo, la chiusura a strati della parete addominale, previo stretching delle sue componenti muscolari ed eventuale ulteriore ampliamento del cavo addominale con l'impiego di un patch di materiale protesico biologico, come dura madre, pericardio di cavallo, fascia lata, membrana amniotica, o sintetico, quale Gore - Tex, Teflon, Dacron, Vicryl (Cataliotti et Cascio, "Manuale di Chirurgia Pediatrica"); la tecnica con patch è stata utilizzata anche sull'onfalocele integro. Se, nonostante questi accorgimenti, la capacità di contenzione del cavo addominale è deficitaria, la riduzione forzata dei visceri può indurre momenti fisiopatologici compressivi endoaddominali (alterazioni emodinamiche e/o cardiorespiratorie da interessamento cavale inferiore e/o diaframmatici) ed è pertanto necessario ricorrere ad un trattamento chirurgico in più tempi.

---

*Chiusura in più tempi.* La tecnica di Gross, utilizzabile solo nell'onfalocele, prevede la chiusura del solo piano cutaneo, adeguatamente mobilizzato, con la creazione di lembi al di sopra del sacco. Quando attuabile, dà esito ad un voluminoso laparocelo ventrale, che necessita di un successivo intervento chirurgico correttivo, spesso stadiato in rapporto alla specificata capacità di correzione del cavo addominale.

Per ambedue le malformazioni, la tecnica inizialmente proposta da Schuster nel 1967 prevede la sutura di una lamina protesica (Silastic) sui margini del difetto, con copertura cutanea. In successivi reinterventi si riduce progressivamente la superficie della lamina (suo ripiegamento centrale con apposizione di punti di sutura), fino a quando non sia possibile ottenere l'affrontamento diretto dei margini del difetto (chiusura diretta della parete addominale). Viceversa, la modifica apportata da Allen e Wrenn (Cataliotti et Cascio, "Manuale di Chirurgia Pediatrica") prevede l'impiego di due lamine di materiale sintetico (Silastic) ancorate ai margini muscolo - aponeurotici della parete addominale in corrispondenza del difetto, in modo da creare un'estroffessione del cavo peritoneale (silo) che contenga i visceri che hanno perduto il diritto di domicilio. La progressiva graduale riduzione di quest'estroffessione (ottenibile in un tempo medio di 10 giorni, con apposizione di suture o ripiegamenti del suo margine superiore in modo simile ad un tubo di dentifricio) consente un completo riposizionamento dei visceri e la successiva chiusura definitiva della parete addominale. Per quanto concerne la tecnica del silo, è da segnalare l'accorgimento proposto da Fischer ("Manuale di Chirurgia Pediatrica"), che prevede l'impiego di un silo preformato, a bocca elastica (spring - loaded ring), direttamente posizionato sotto i margini del difetto, senza necessità di ancoraggio con punti di sutura, in quanto mantenuto *in situ* dalla parete addominale.

Negli ultimi decenni, quindi, l'uso di biomateriali sintetici si è sempre più sviluppato. Il biomateriale ideale da impiegarsi per intervenire sulla parete addominale dovrebbe possedere un'adeguata resistenza, non dare reazioni di ipersensibilità, essere biocompatibile per facilitare la rigenerazione dei tessuti, la quale può aiutare il mantenimento della resistenza meccanica nel lungo periodo. Pochi anni or sono Minkes et al. (2000) hanno utilizzato una struttura preformata di

---

Silastic (spring - loaded ring), che è stata posizionata e suturata al di sopra delle anse erniate.

Successivamente si è passati ad una riduzione dell'ernia, controllando la sua progressione grazie alla relativa trasparenza del materiale. A riduzione completata si è chiusa definitivamente la parete. In nessuno dei pazienti si è riscontrata necrosi del tessuto o perforazione dell'intestino. Tuttavia in alcuni dei bimbi è stata osservata infiammazione nei punti della parete addominale ancorata al Silastic. In modo analogo Kidd et al. (2001) hanno utilizzato lo stesso biomateriale. A riduzione conclusa è stato tagliato l'eccesso di materiale protesico e si è passati alla chiusura definitiva della parete addominale. In tutti i casi sono state danneggiate le anse intestinali e si sono presentati in quasi il 30% dei pazienti eritemi alla parete addominale in seguito alla chiusura definitiva. Nell'esperienza di Bhatnagar et al. (2001) si sono messi a confronto bambini affetti sia da gastroschisi sia da onfalocele, che sono stati trattati sia mediante una chiusura immediata del difetto addominale, sia tramite l'utilizzo di materiale protesico. Questo era formato da un foglio di propilene ricoperto da un film adesivo e trasparente. La mortalità è stata del 7,7% per i malati di onfalocele e del 40% per quelli affetti da gastroschisi. Tra le maggiori cause si sono riscontrate gravi infezioni, necrosi dei tessuti, perforazioni intestinali e peritoniti. Harjai et al. (2000) hanno cercato di curare un onfalocele di dimensioni importanti ricoprendo, fin dove possibile, il difetto con la cute ed inserendo un foglio di polipropilene ancorato ai margini. I fili di sutura (polene) venivano tirati ogni 24 – 36 ore in modo da permettere una chiusura più regolare del difetto. Tuttavia, dopo alcune riduzioni, si è notato che il foglio di materiale protesico iniziava a distaccarsi dai margini del difetto, rendendo più difficile la chiusura di questa erniazione.

Il tipo di materiale utilizzato risulta di grande importanza, soprattutto quando si è in presenza di difetti di notevole entità [Schwartz et al., 1983]. Le numerose applicazioni hanno reso evidenti i non pochi limiti dei materiali biocompatibili sintetici. Essi scatenano gravi risposte infiammatorie, che portano anche alla morte del paziente, soprattutto in presenza di anomalie correlate. Spesso risulta difficile l'ancoraggio al tessuto circostante e si sono verificati casi di distacco protesi – tessuto [Harjai et al., 2000]. Inoltre nei mesi successivi all'intervento, si può verificare una ricomparsa del difetto stesso nel 50 – 80% dei casi. Nel corso degli

---

anni possono insorgere scoliosi, in quanto i materiali sintetici non si integrano in modo completo e funzionale col tessuto e non crescono con la cavità toracica, che negli anni si ingrandisce.

La SIS (small intestinal submucosa) è un biomateriale acellulare riassorbibile derivante dalla matrice extracellulare della tonaca sottomucosa dell'intestino tenue ed è stata valutata come sostituto per la parete addominale in modelli animali di ratto e di coniglio [Jyn – Yao et al., 2003]. Applicando i concetti dell'ingegneria tessutale, alcuni ricercatori hanno riportato successi nell'impiego della SIS seminata con cellule per la riparazione di difetti diaframmatici su di un feto di agnello. Le cellule seminate hanno facilitato la rigenerazione e la crescita tessutale. Jyn - Yao et al. (2003) hanno applicato questo stesso concetto nella cura di vasti difetti della parete addominale, dimostrando come i costrutti tessutali ingegnerizzati, a diversità delle matrici acellulari, presentino migliore infiltrazione cellulare e una migliore performance meccanica. I tessuti ricostruiti *in vitro* possono quindi essere una scelta valida come sostituti della parete addominale. Tuttavia il materiale ideale per la riparazione dei difetti della parete addominale rimane ancora motivo di indagine e discussione nell'ambito medico - scientifico.

*Trattamento conservativo.* Trova indicazione negli onfalocele giganti con gravi complessi sindromici, eventualmente anche in presenza di difetti della canalizzazione intestinale, con ovvio ricorso alla Nutrizione Parenterale Completa. Consiste in applicazioni topiche ripetute di soluzioni antisettiche, che determinano dopo alcuni giorni la formazione di un'escara, alla cui caduta (dopo circa tre settimane) residua una superficie granuleggiante che subisce un processo di epitelizzazione dal colletto del sacco verso l'apice. Vengono oggi preferite le pennellature con soluzioni alcoliche al 70% o acquose all'1% di violetto di genziana rispetto a quelle inizialmente impiegate di mercurocromo al 2%, responsabili di livelli ematici e tessutali di mercurio al di sopra dei minimi livelli tossici (lesioni renali).

*Prognosi e follow – up.* La mortalità più alta nell'onfalocele (25%) rispetto alla gastroschisi (10%) è soprattutto da riferire alle malformazioni associate, alle infezioni e all'insufficienza respiratoria.

---

Ulteriori fattori prognostici sono legati alle possibilità ed ai tempi di ripresa funzionale dell'intestino (gastroschisi) ed alla necessità di eseguire o meno una nuova plastica della parete addominale anteriore.

### **3. INGEGNERIA TESSUTALE**

La perdita o l'insufficienza funzionale di un tessuto o di un organo a causa di incidenti, traumi, malattie o il loro deterioramento a causa dell'invecchiamento rappresentano uno dei problemi più invalidanti, frequenti e costosi nell'ambito della Sanità.

Il problema non è esclusivamente limitato alla mancanza di organi in toto come fegato, rene, cuore, pancreas ma coinvolge anche deficit tessutali localizzati e limitati a parti di non vitale importanza, ma che comunque determinano una scarsa qualità della vita. Mentre la perdita di un organo viene necessariamente compensata con un trapianto, nel caso di difetti di modesta entità il chirurgo plastico, l'ortopedico, il vascolare, l'urologo utilizzano per la ricostruzione i tessuti residui o, come alternativa, i prodotti della bioingegneria.

In questo contesto si inserisce l'ingegneria tessutale, un nuovo campo multidisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze biomediche per elaborare prodotti artificiali o biologici in grado di ripristinare o comunque mantenere la funzione di tessuti ed organi danneggiati.

Quello che caratterizza i tessuti ingegnerizzati, rispetto agli altri biomateriali, è la distinzione, durante il processo di produzione, di tre momenti fondamentali:

- prelievo del tessuto naturale
- procedure di ingegnerizzazione del tessuto
- realizzazione vera e propria del sostituto biologico ingegnerizzato.

In queste tre fasi, il passaggio innovativo ed essenziale è rappresentato proprio dalla ingegnerizzazione che determina la trasformazione sostanziale del tessuto d'origine fino ad ottenere un prodotto finale che risulti impiantabile nell'uomo e che sia in grado di favorire o determinare in modi diversi la riparazione tessutale.

---

Il campo dell'ingegneria tessutale elabora dunque prodotti di origine biologica fino a creare dei derivati completamente nuovi, con caratteristiche tali da essere usati durante la pratica clinica nella guarigione dei tessuti cutanei, nella ricostruzione ossea e, più in generale, nella espansione *in vitro* di cellule o tessuti di rivestimento.

A tutt'oggi nella chirurgia ricostruttiva si utilizzano impianti formati da polimeri sintetici, ceramiche e metalli che, tuttavia, non si rivelano in grado di fornire la qualità e la funzionalità del tessuto originale: spesso possono rompersi e indurre una risposta immunitaria. Inoltre, contrariamente ai materiali naturali, la maggior parte di essi non viene colonizzata dalle cellule del ricevente e trasformata successivamente in un tessuto vivente.

Quindi uno dei settori più promettenti, in grado di risolvere le problematiche di cui sopra e garantire maggior disponibilità di tessuti, è proprio l'ingegneria tessutale [Langer e Vacanti, 1993] che si prefigge, per l'appunto, di sviluppare sostituti biologici in grado di mantenere, sostituire e/o aumentare le funzioni vitali degli organi e dei tessuti danneggiati [Schulteiss et al., 2000], tramite l'identificazione *in vitro* di condizioni di coltura che mimino i segnali biochimici e fisici responsabili dello sviluppo e della sopravvivenza del tessuto *in vivo*.

L'impianto ottimale è costituito da tre componenti: 1) cellule autologhe; 2) un supporto, che fornisce la struttura tridimensionale per l'adesione e la proliferazione cellulare; 3) molecole segnale, quali fattori di adesione, di crescita e angiogenici, che vengono depositati nel supporto. Le strategie finora adottate sono molto varie. Si possono isolare cellule deputate a svolgere una particolare funzione, qualora impiantate come tali nell'organismo ricevente, come nel caso di sostituti cutanei contenenti cheratinociti e/o fibroblasti. Negli ultimi anni la ricerca si sta indirizzando verso l'uso delle cellule staminali, caratterizzate da un'elevata capacità proliferativa. Particolare interesse suscitano le cellule staminali presenti quasi ubiquitariamente nei tessuti dell'adulto, in quanto il loro utilizzo non implica problematiche di tipo etico, come invece avviene nel caso delle cellule staminali derivate da embrione.

I supporti sui quali vengono seminate le cellule possono essere formati da materiale sintetico, quale propilene (Marlex, Prolene), politetrafluoroetilene (Teflon e Gore - Tex), poliestere (Dacron) e poliammide (Nylon), oppure naturali, quali collagene

---

[Werkmeister et al., 1998], gel di fibrina e acido ialuronico. I fattori di crescita, eventualmente legati al supporto, sono in grado di attivare in modo differenziale i geni, i cui prodotti sono responsabili per la crescita e il differenziamento del tessuto.

Attualmente, è entrato nella pratica clinica comune l'impiego di lamine di cheratinociti umani coltivati *in vitro* e supportate da biomateriali, in modo da ottenere un prodotto finale pratico e di facile applicazione. L'introduzione dell'uso di un supporto bioattivo derivato dall'acido ialuronico, ha reso possibile la creazione *in vitro* di un tessuto originale nel quale le cellule epiteliali interagiscono attivamente con l'acido ialuronico stesso, costituendo così in laboratorio un vero tessuto ingegnerizzato.

Nell'esperienza di Bonferraro (Istituto di Chirurgia Plastica, Università di Milano), l'impiego di sostituti cutanei nella riparazione di lesioni a tutto spessore ha permesso di velocizzare i tempi di riparazione. Questo è giustificato dal rilascio fisiologico di fattori ad azione farmacologica, quali citochine, interleuchine, fattori di crescita propriamente detti, la cui azione sui processi di riparazione tissutale è fatto ormai consolidato. Se la guarigione di una ferita difficile con metodiche tradizionali può richiedere sei – otto mesi di tempo, con l'impiego di sostituti cutanei si riesce a ridurre questo periodo a tre – quattro mesi.

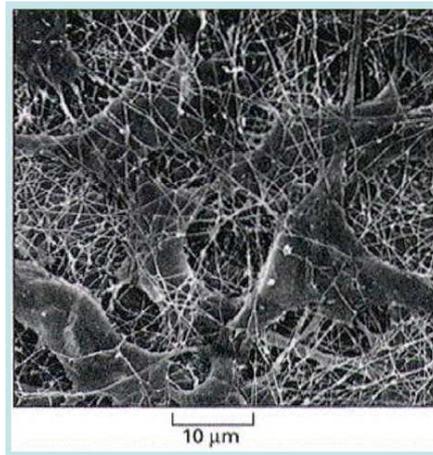
In ogni modo, sebbene notevoli progressi siano stati raggiunti nell'isolamento e nella coltura *in vitro* di grandi quantità di cellule, e nella progettazione e nell'ottenimento di biomateriali [Fontane et al., 1995], il successo dell'impianto di un tessuto ingegnerizzato *in vitro* dipende dalla sopravvivenza *in vivo* delle cellule seminate per il maggior tempo possibile.

#### **4. MATRICE ACELLULARE NELL'INGEGNERIA TESSUTALE**

La formazione di un tessuto è garantita da un'interazione dinamica tra le cellule che lo costituiscono e il loro microambiente che risulta essere sostanzialmente costituito dalla matrice extracellulare e da altri citotipi (fibroblasti, macrofagi, mastociti e plasmacellule) con i quali la popolazione cellulare interagisce.

---

Fino a non molto tempo fa veniva ipotizzato che la matrice extracellulare avesse un ruolo inerte, di semplice impalcatura per la stabilizzazione fisica dei tessuti viventi. In realtà è stato dimostrato che, oltre ad avere funzioni di sostegno meccanico, possiede un ruolo attivo nella regolazione del comportamento delle cellule che entrano in contatto con essa, influenzandone sopravvivenza, sviluppo, migrazione, proliferazione, forma e funzione [Alberts et al., 1995].



La matrice extracellulare

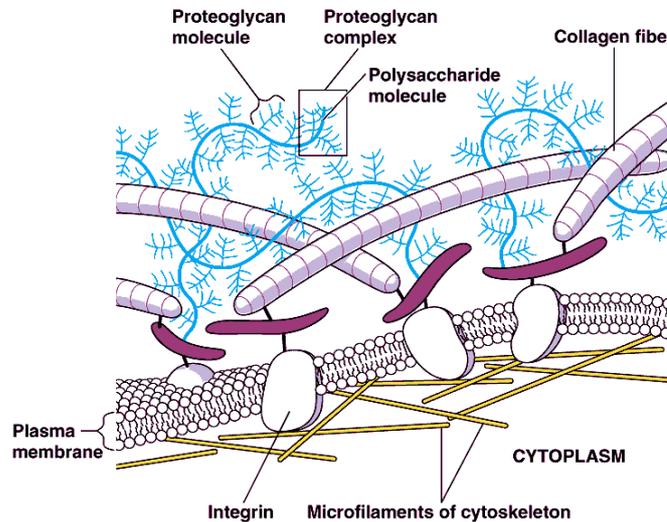
La matrice extracellulare animale è composta da una varietà di proteine e polisaccaridi che sono secreti localmente e assemblati in una rete organizzata in stretta associazione con la cellula che li ha prodotti. Nella maggior parte dei tessuti connettivi le macromolecole della matrice sono secrete dai fibroblasti.

Le variazioni nelle quantità relative dei diversi tipi di molecole e la diversa struttura terziaria, danno origine a una diversità stupefacente di forme molecolari, ciascuna adatta alle necessità funzionali di un particolare tessuto.

Tre classi principali di macromolecole extracellulari compongono la matrice:

- catene polisaccaridiche della classe chiamata glicosamminoglicani (GAG), che si trovano di solito uniti covalentemente a proteine sotto forma di proteoglicani;
- proteine fibrose, il cui rappresentante più indicativo è il collagene;

- proteine di adesione come fibronectina e laminina, che hanno funzioni sia adesive che strutturali.



Componenti principali della matrice extracellulare

Nella matrice extracellulare sono inoltre presenti citochine e fattori di crescita, che sono generalmente complessati in forma inattiva a componenti della matrice e che possono essere resi disponibili in una forma funzionalmente attiva per azione di enzimi proteolitici. La matrice regola l'attività di fattori, quali PDGF (*Platelet-derived growth factor*), TGF- $\alpha$  (*Transforming growth factor*), EGF (*Epidermal growth factor*) e HGF (*Hepatocyte growth factor*), controllando il loro rilascio e la loro attivazione. Una volta attivati, essi sono in grado di indurre la proliferazione ed il differenziamento cellulare.

Recentemente si è pensata e proposta l'utilizzazione di matrici extracellulari acellulari di varia provenienza come sostituti tissutali per la rigenerazione di numerosi tipi di tessuto [Badylak et al., 2007].

Opportuni trattamenti con specifici detergenti ad enzimi permettono l'ottenimento di biomateriali formati da sola matrice acellulare, di per sé priva di potere antigenico, e quindi incapace di scatenare una reazione di rigetto, in quanto preventivamente privata della componente cellulare responsabile dell'immunogenicità. L'efficienza della rimozione della componente cellulare

---

dipende da vari fattori tra cui l'origine del tessuto stesso e i metodi utilizzati [Gilbert T et al., 2006]. Tali matrici funzionano come un'impalcatura, all'interno della quale migrano le cellule dell'ospite ed, essendo composte essenzialmente da collagene e da altre proteine strutturali, vengono rimodellate *in vivo* con la formazione di un tessuto simile a quello nativo del ricevente. Grazie alla loro composizione, infatti, sono in grado di favorire la crescita cellulare e la neovascolarizzazione. Inoltre una volta impiantate *in vivo* vi è solamente una piccola reazione infiammatoria che si risolve in una decina di giorni ed è dovuta principalmente a una modesta infiltrazione di polimorfonucleociti e monociti.

A tutt'oggi matrici acellulari sono state utilizzate con successo come sostituti vescicali [Sutherland et al., 1996], cutanei [Takami et al., 1996] e dell'intestino tenue [Parnigotto et al., 2000].

Il gruppo di ricerca del professor Parnigotto (1997) ha sviluppato e caratterizzato un modello di matrice acellulare omologa di cute di ratto, ottenendo così un valido ed efficace sostituto dermico di lesioni cutanee a tutto spessore. La matrice innestata veniva ripopolata dalle cellule del ricevente e, integrandosi nel tessuto cutaneo dell'ospite, preveniva in modo efficiente la contrazione della cicatrice.

Un esempio di matrice acellulare eterologa che attualmente è già utilizzata sull'uomo, risulta essere la *SIS* (*small intestinal submucosa*) che deriva dalla matrice extracellulare della tonaca sottomucosa dell'intestino tenue di maiale.

Questa è disponibile in commercio in diverse configurazioni (Surgisis<sup>TM</sup>, Stratasix<sup>TM</sup> e Durasis<sup>TM</sup>, CookSIS, Spencer, Indiana-USA) e si è dimostrata applicabile in diversi modelli animali come sostituto della parete addominale (roditori e cani), di vasi sanguigni (cani), di tendini (cani), dell'epidermide (ratti) e del diaframma (ratti).

MacLeod *et al.* (2004) hanno ottenuto risultati rilevanti nella prevenzione della contrazione secondaria di innesti cutanei, utilizzando come sostituti dermici, matrici acellulari dermiche di origine porcina e utilizzando tessuto ingegnerizzato ottenuto dalla *SIS*.

Il gruppo di ricerca di Palminteri (2006) del Centro di Chirurgia Ricostruttiva dell'Uretra, di Arezzo, ha eseguito un intervento di uretroplastica peniena in tempo unico con innesto di *SIS* in 21 pazienti dell'età media di 39 anni con stenosi dell'uretra anteriore. A 22 mesi si è avuto l'81% di successi, mentre il 19% di

insuccessi si è verificato con le stenosi lunghe peno-bulbari o peniene, più difficili da appriciare.

In un altro lavoro è stata utilizzata matrice acellulare ricavata da aorta toracica omologa, come sostituto uretrale in conigli, nei quali si era provveduto ad indurre sperimentalmente un difetto [Parnigotto et al., 2000]. Nessun animale ha rigettato l'impianto, né ha presentato problemi clinici post-operatori. Dopo un anno dagli impianti è stata dimostrata una completa integrazione della matrice nel tessuto dell'ospite: la zona sottoposta ad impianto appariva ampiamente vascolarizzata e l'orientamento delle fibre collagene e delle fibre muscolari era simile a quella dell'uretra del ricevente.

La maggior parte degli studi su supporti composti da matrice acellulare utilizzati in urologia confermano comunque l'ampio successo della SIS per la cura di malattie dell'apparato urinario. E' da notare però che sono in fase di studio altri tipi di matrici acellulari di diversa provenienza che sembrano dare altrettanti risultati positivi.

Confronto di diversi tipi di ECMs commerciali e sperimentali [Santucci e Barber, 2005]

|                                       |   | Resorbable | Source                           | Uses  | Currently Available? |
|---------------------------------------|---|------------|----------------------------------|---|----------------------|
| SIS™                                  | Bard  | Yes        | Porcine small intestine          | Multiple, "intelligent remodeling"  | Yes                  |
| FortaGen™, FortaPerm™                 | Organogenesis                                       | Partially  | Porcine small intestine          | Support such as sling, possible replacement via "intelligent remodeling"      | No                   |
| Repliform™                            | Lifecell, marketed by Boston Scientific-Microvasive | No         | Human dermis                     | Pubovaginal sling   | Yes                  |
| Pelvicol™ (Permacol™ in the UK)       | Bard  | Partially  | Porcine dermis                   | Pubovaginal sling   | Yes                  |
| Acell Urinary Bladder Submucosa (UBS) | Acell   | Yes        | Porcine bladder                  | Veterinary only at this time (possibly multiple via "intelligent remodeling") | No                   |
| Acellular Matrix Grafts               | Experimental  | Yes        | Various human (bladder, urethra) | Multiple, "intelligent remodeling"  | No                   |
| Tutogen™                              | Tutogen   | No         | Bovine pericardium               | Peyronie's repair   | Yes                  |

---

Un potenziale miglioramento di un *patch* biologico costituito da matrice acellulare consiste nella semina prima dell'impianto di cellule uroteliali e muscolari lisce del paziente stesso, ricavate da una biopsia vescicale od uretrale. La capienza della vescica è stata in questo caso significativamente migliorata rispetto il solo supporto senza cellule seminate [Yoo et al., 1998].

Un altro campo di applicazione in cui possono essere utilizzate matrici acellulari è nell'ingegneria vascolare e, in particolare, nella creazione di "arterie artificiali" per la cura di deficienze vascolari.

Kaushal *et al.* (2001) hanno ottenuto risultati positivi utilizzando tubi acellulari di matrice extracellulare (collagene) ricoperti con l'arteria iliaca decellularizzata di maiale su cui erano state seminate cellule progenitrici endoteliali. Questo tipo di *patch*, impiantato nella carotide di pecora, ha mostrato una significativa colonizzazione da parte delle cellule dell'ospite; in particolare si è osservata una infiltrazione di cellule muscolari lisce.

Alcuni lavori hanno riportato inoltre l'utilizzo dell'ingegneria tessutale per la ricostruzione di valvole cardiache, in casi di stenosi e insufficienza, mediante l'uso di protesi valvolari biologiche che possono essere eterologhe, composte da tessuto porcino o bovino, oppure omologhe, ossia valvole umane prelevate da espanti. In entrambi i casi il vantaggio rispetto alle protesi meccaniche sta nel fatto che il paziente non necessita di ulteriori terapie, come quella anticoagulante.

Inoltre si è visto che questo tipo di matrice contiene la struttura ed i componenti ottimali per ospitare le cellule dell'organismo ricevente, fornendo un ambiente ideale per i recettori cellulari di superficie e una riserva per i fattori di crescita che modulano i processi biologici, quali angiogenesi, migrazione e proliferazione cellulare.

Ad esempio si sono ottenuti da maiali condotti valvolari aortici acellulari, che sono stati impiantati con buoni risultati in pecore. Dopo un mese dall'intervento, il condotto impiantato era stato completamente riendotelizzato e colonizzato dalle cellule del ricevente [Rocco et al., 2004]. Da studi *in vitro* condotti presso l'Istituto Superiore di Sanità, è stato verificato che i condotti acellulari mantenevano una buona funzione emodinamica, paragonabile a quella dei condotti non trattati. Nonostante ciò, in un altro lavoro, Conconi *et al.* (2004) hanno dimostrato che allo stato attuale i condotti valvolari acellulari, ottenuti con un trattamento detergente-

---

enzimatico, non sono ancora adatti per applicazioni cliniche a causa della risposta infiammatoria persistente che provoca il fallimento dell'impianto.

Un esempio di valvola cardiaca ottenuta da maiali è il SynerGraft (Cryolife Inc, Kennesaw, GA) che impiantato in pecore [Goldstein et al., 2000] ha mostrato una crescita di miofibroblasti del ricevente all'interno della matrice acellulare da cui è formato dopo il trattamento. Questo costrutto è stato inoltre già impiantato in esseri umani affetti da deflusso nel ventricolo destro, risultando sicuro, stabile con caratteristiche morfologiche ed emodinamiche promettenti [Sievers et al., 2003].

Infine anche per i difetti della parete addominale sono state utilizzate matrici acellulari di diversa provenienza. Buinewicz *et al.* (2004), ad esempio, hanno proposto l'utilizzo di una matrice acellulare dermica proveniente da cadaveri umani: AlloDerm (Lifecell Corporation, Branchburg, NJ).

Questo costrutto, formato dalla matrice extracellulare e dai componenti della membrana basale, ha dimostrato un particolare successo nella ricostruzione della parete con una notevole resistenza all'infezione nei casi di difetti complessi e infetti.

Sempre per questo tipo di difetti è stato proposto l'utilizzo della matrice acellulare ricavata dal tessuto muscolare omologo. Si è visto che, nonostante non fosse stata rigettata, una volta impiantata, causava una forte risposta infiammatoria e rapidamente veniva sostituita da tessuto fibroso [Gamba et al., 2002].

L'efficienza di questo costrutto come sostituto muscolare è stata migliorata attraverso la coltura di questa con cellule satellite autologhe isolate dal muscolo dorsale del ratto [Marzaro et al., 2002].

Si è dimostrato perciò che la presenza di cellule autologhe costituisce un importante fattore per preservare l'integrità strutturale e per migliorare *in vivo* la biocompatibilità degli impianti costituiti da matrice acellulare muscolare omologa.

---

## 5. CELLULE STAMINALI

Il concetto di cellula staminale esiste da più di un secolo [Robey, 2000], ma solo recentemente la ricerca sulle proprietà e sulle caratteristiche di queste cellule è diventata di interesse generale in tutti i campi scientifici. Questo non solo per la loro potenziale capacità di originare diversi tipi cellulari e per tutte le questioni etiche che circondano l'argomento, ma soprattutto per il loro possibile utilizzo in un vasto campo di procedure cliniche finalizzate al trattamento di malattie fortemente invalidanti, quali il Parkinson, il diabete, l'Alzheimer e la sclerosi multipla, nonché per migliorare la salute e la qualità della vita [Triffitt, 2002]. Sebbene l'interesse verso queste cellule sia molto elevato, manca tuttora un pieno accordo tra i diversi gruppi di ricerca sulla definizione, sul marker specifico di identificazione universale e sulle proprietà di una cellula staminale. Esistono diversi modi per definire una cellula staminale, come numerose sono le procedure usate per caratterizzare la popolazione di partenza e le popolazioni cellulari mature risultanti dalle molteplici differenziazioni.

In generale una cellula staminale possiede alcune caratteristiche principali che la distinguono da tutti gli altri tipi cellulari. E' 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 [Weissman, 2000; Preston et al., 2003; Heslop et al., 1996]. Inoltre, ogni singola cellula staminale deve essere capace di generare una linea cellulare geneticamente uguale, chiamata clone.

Importante è sottolineare che le cellule staminali possiedono un diverso grado di potenzialità. 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 (Embryonic Stem Cells, ESC) derivanti dalla Massa Cellulare Interna della blastocisti, 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, 2001; Report NHI, 2001].

---

### ***a. Cellule staminali embrionali (ESC)***

Le cellule staminali embrionali possono derivare sia dal blastoderma che dalle linee germinali primordiali e alcune colture di cellule embrionali di pesci, uccelli e alcune varietà di mammiferi sono già di uso comune nella ricerca [Pain et al., 1996; Hong et al., 1998]. Tali cellule 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. Ogni singola cellula embrionale staminale può originare colonie di cellule geneticamente uguali (cloni) che mantengono inalterate le proprietà della cellula da cui originano. Le ESC si differenziano in modo casuale *in vitro*, ma se iniettate in una blastocisti contribuiscono alla formazione di tutti i tessuti indicando che, durante lo sviluppo, rispondono a tutti i segnali di migrazione, proliferazione e differenziazione [Smith, 2001].

Il mantenimento della pluripotenzialità richiede l'espressione di alcuni fattori di trascrizione e, in particolare, di quelli della famiglia POU (Pit-1/GHF-1, Oct-2 e Unc-86), quali OCT-3 e OCT-4 (Octamer - binding transcription factor), che sono presenti solo in coltura di cellule indifferenziate derivanti dall'embrione.

Nei mammiferi queste cellule sono localizzate nella Massa Cellulare Interna e precisamente nell'epiblasto. ESC umane sono state stabilizzate in coltura, da blastocisti derivanti da fecondazioni *in vitro* e da cellule primordiali germinali di embrioni di 5 - 9 settimane di vita [Thomson et al., 1998; Shambloott et al., 1998]. Queste cellule esprimono marker specifici della pluripotenzialità quali SSEA-3 e SSEA-4 (Stage - Specific Embryonic Antigens), TRA-1-60 e TRA-1-81 (Tumor Rejection Antigen), fosfatasi alcalina e alti livelli dell'enzima telomerasi, responsabile del mantenimento della lunghezza delle sequenze telomeriche durante le divisioni cellulari. Queste linee umane differenziano occasionalmente *in vitro*, ma se iniettate in blastocisti di topi immunodepressi partecipano alla formazione di tessuti come il muscolo [Thomson et al., 1998].

L'utilizzo delle ESC risulta essere di fondamentale interesse per la comprensione dei geni coinvolti durante lo sviluppo embrionale: tramite il loro impiego si

---

possono identificare gli eventi genetici, molecolari e cellulari che stanno alla base di molte patologie congenite e malformazioni placentari che causano aborti spontanei e studiare anomalie cromosomiche responsabili dello sviluppo di tumori nei bambini. Poiché l'uso di queste cellule è legato a non pochi problemi di natura etica, la ricerca scientifica si è indirizzata alla scoperta di nuove fonti di cellule staminali, quali ad esempio i tessuti dell'adulto.

### ***b. Cellule staminali da tessuti adulti (ASC)***

Sono cellule non specializzate reperibili tra cellule specializzate di un tessuto specifico, quale midollo osseo, sangue periferico, fegato, cervello, milza, tessuto adiposo, muscolo scheletrico, placenta, cordone ombelicale, sangue cordonale [Markov et al., 2007] e, secondo quanto recentemente scoperto, anche nel liquido amniotico [De Coppi et al., 2007]. Sono prevalentemente multipotenti e, prima di raggiungere la differenziazione completa, passano attraverso uno stadio intermedio, nel quale vengono definite come progenitori "committed" e cominciano a differenziarsi seguendo una via già stabilita. Tali cellule sono poco numerose e localizzate in diversi tessuti del corpo umano, dove si comportano in vari modi a seconda dell'ambiente circostante. Importante è anche sottolineare che non si conosce ancora esattamente quale sia la loro origine. Le cellule staminali adulte si dividono in cellule staminali derivanti da tessuti di origine mesodermica, ectodermica ed endodermica.

Alla prima categoria appartengono le cellule staminali ematopoietiche che hanno la capacità di ricostruire l'intero sistema ematopoietico, in quanto da esse derivano tutti gli elementi corpuscolati del sangue: eritrociti, piastrine, granulociti, monociti e linfociti (B, T, NK). Possono venire isolate dal sangue periferico, dal midollo osseo o dal sangue proveniente dal cordone ombelicale. Le cellule staminali adulte provvedono al mantenimento dei tessuti e alla loro eventuale riparazione in seguito ad un danno, ma le loro capacità non sono illimitate, e quando vengono a mancare inevitabilmente i tessuti e gli organi tendono a decadere. Per quanto riguarda l'uso terapeutico vi sono ancora delle difficoltà nella crescita e nella coltivazione *in vitro*, e pertanto sono necessarie ulteriori sperimentazioni.

---

Da recenti studi sembra che abbiano una particolare plasticità, ovvero la capacità di differenziarsi in cellule di tessuti distanti e non correlati grazie alla loro capacità di cambiare le caratteristiche fenotipiche: è noto che cellule staminali nello stroma del midollo osseo, le cellule staminali mesenchimali [Caplan, 1991] possono trasformarsi in cellule epatiche [Petersen et al., 1999], neurali, muscolari scheletriche, renali, adipociti [Jiang *et al.*, 2002], condrociti, osteoblasti [Pittenger et al., 2000]. e cardiomiociti [Lin et al., 2000; Orlic et al., 2001].

La plasticità delle cellule staminali derivanti da tessuti dell'adulto potrebbe rivelarsi utilissima per la ricostruzione di tessuti specifici, spostando l'attenzione più su questo tipo di cellule che su quelle embrionali. Per lungo tempo si è creduto che le cellule staminali adulte potessero differenziarsi esclusivamente nella linea cellulare dell'organo in cui risiedono. Esistono, tuttavia, delle eccezioni in cui le cellule di un tessuto si differenziano in cellule di un altro, probabilmente mediante processi metaplastici, di plasticità cellulare e di transdifferenziazione [Tosh et al., 2002, Caplan, 2007].

Altrettanto importante è assicurarsi che le cellule differenziate siano in grado di funzionare secondo i parametri fisiologici e che quindi esprimano i geni della cellula matura verso la quale si è indotto il differenziamento. E' indispensabile quindi analizzare tutte le condizioni di coltura quali la tensione di ossigeno, il pH, la concentrazione di glucosio, la concentrazione dei fattori di crescita e delle citochine, i componenti del siero, la frequenza del cambio di terreno durante la coltura, in quanto questi fattori possono influenzare la variabilità e il turnover di specifici stadi di espressione genica dei diversi tipi di cellule staminali.

In conclusione, quindi, l'analisi e il monitoraggio di tutti questi parametri possono permettere di affinare ed approfondire delle nuove tecniche e strategie atte ad aumentare la plasticità delle cellule staminali di derivazione non embrionale.

---

## 6. LE CELLULE SATELLITE DEL MUSCOLO

Le cellule satellite del muscolo scheletrico – scoperte da Katz e Mauro nel 1961- sono cellule miogeniche, multinucleate e quiescenti, localizzate sulla superficie delle fibre muscolari differenziate in modo terminale, tra il sarcolemma e la membrana basale [Morgan et Partridge, 2002]. Tali cellule sono normalmente quiescenti nel muscolo adulto, ma fungono da popolazione cellulare di riserva in grado di proliferare a seguito di eventuali danni, dando così origine alla rigenerazione del muscolo scheletrico e ad altre cellule satellite.

Il numero di queste particolari cellule varia anche con l'età, in quanto al momento della nascita è stimato essere attorno al 32% ma poi diminuisce con l'età, mantenendosi ad un livello di 1-5% nell'adulto [Gibson et al., 1982; Schultz et al., 1994]. In realtà sembra essere più un declino funzionale nell'attivazione, relazionata all'attività contrattile, all'influenza ormonale e alle malattie, che una vera perdita nel numero di cellule [Conboy et al., 2003].

La recente scoperta di numerosi marker espressi dalle cellule satellite ha evidenziato come queste cellule, le quali per lungo tempo erano state considerate come una popolazione omogenea di cellule staminali del muscolo, possano non essere equivalenti: vi è la possibilità che una sub - popolazione di cellule satellite possa essere derivata da una cellula staminale ancor più primitiva. Le cellule precursori muscolari derivate da cellule satellite possono essere impiegate per riparare e rigenerare il muscolo scheletrico danneggiato o miopatico, oppure possono essere usate come vettori nella terapia genica.

Le cellule satellite compaiono ai margini delle fibre muscolari a circa diciassette giorni e mezzo "*postcoitum*", dopo che si sono formate le fibre muscolari primarie. La loro origine non è tuttora conosciuta, ma c'è evidenza che esse derivino dall'aorta dorsale [Seale et Rudnicki, 2000]. Fino a poco tempo fa, per identificare le cellule satellite c'era bisogno di un'accuratezza estrema nell'uso della microscopia elettronica; la scoperta di fattori proteici espressi dalle cellule satellite, ma non dai micronuclei nelle fibre muscolari postmitotiche, ha semplificato il loro studio. La M-caderina, una molecola di adesione cellulare calcio – dipendente, la C-met, recettore per il fattore di crescita epatocitico (HGF), il fattore nucleare

---

miocitico (MNF) e la Pax-7, fattore di trascrizione di tipo “paired box”, sono tutti fattori espressi dalle cellule satellite [Hawke et Garry, 2001].

Una nuova metodologia di preparazione di fibre muscolari isolate, vitali, con la sola presenza delle loro cellule satellite e di nessun altro tipo cellulare, ha reso più semplice ricercare i markers che sono presenti su queste cellule. Usando queste preparazioni, si è dimostrato che le cellule satellite quiescenti su singole fibre muscolari di ratto esprimono entrambi i fattori di crescita miogenica Myf-5 e CD 34, il quale è anche presente nelle cellule staminali ematopoietiche attivate. Questo ha suggerito che il CD 34 può bloccare in uno stato quiescente i precursori “committed”, pronti per una susseguente attivazione. Tutti i mionuclei contenuti nelle fibre muscolari, ottenute dal muscolo *extensor digitorum longus* di ratti transgenici, nei quali il promotore di miosina 3f porta alla produzione di  $\beta$ -gal, esprimono la  $\beta$ -gal ma questo non avviene per le cellule satellite. Si presumeva che le cellule  $\beta$ -gal negative presenti in tali fibre fossero cellule satellite e che la maggior parte di esse esprimesse sia M-caderina che CD34.

Comunque, un piccolo numero di cellule satellite  $\beta$ -gal negative non esprimono Myf-5, CD 34 o M-caderina, indicando così la possibilità che non tutte le cellule satellite siano equivalenti; le cellule non marcate possono rappresentare un tipo di cellula precursore / staminale minormente impegnato [Beauchamp et al., 2000; Zammit et Beauchamp, 2001].

Durante lo sviluppo postnatale, le cellule satellite proliferano e la loro progenie si unisce alle fibre muscolari in crescita; qualche altra dà origine a nuove cellule satellite. A dispetto di tal rifornimento del pool di cellule satellite durante la crescita muscolare, il loro numero, che è molto elevato nel muscolo subito dopo la nascita, diminuisce con l'età [Bischoff, 1997].

Benché studi sulla lunghezza dei telomeri abbiano mostrato come il ricambio di cellule satellite sia molto piccolo o addirittura assente nel muscolo scheletrico adulto non danneggiato e non miopatico [Decary et al., 1997], le cellule satellite si rendono attive in seguito a lesioni. Cellule satellite quiescenti possono essere attivate da HGF [Tatsumi, et al., 1998].

Le cellule satellite attive esprimono fattori attivatori miogenici, in modo simile alle cellule precursori del muscolo durante lo sviluppo del muscolo scheletrico. Esse proliferano e quindi si fondono sia le une con le altre a formare miotubi, che si

---

sviluppano in miofibre, oppure si uniscono ai segmenti lesionati delle fibre muscolari. Si è visto che cloni di cellule satellite hanno la capacità di dare origine a nuovo tessuto muscolare e di auto rinnovarsi per generare *in vivo* altre cellule satellite [Blaveri et al., 1999]. Queste cellule sono anche mantenute nel muscolo ospite come precursori “long – lived”, capaci di dar origine a nuovo muscolo in caso di bisogno [Gross et Morgan, 1999]. Tali cloni soddisfano quindi tutti i criteri caratterizzanti una cellula staminale, sebbene in modo specifico per quel tessuto.

C'è un'evidenza di tipo funzionale che mostra come le cellule satellite siano una popolazione eterogenea. A seguito di un danno, di una lesione alcune si moltiplicano prima di differenziarsi in muscolo o di generare altre cellule satellite; altre, attivate, non proliferano prima di fondersi con le fibre muscolari danneggiate e si ritiene che queste siano maggiormente impegnate come precursori [Zammit et Beuchamp, 2001].

Molti fattori di crescita sono implicati nella chemiotassi, nella proliferazione e nella differenziazione delle cellule satellite. Fibre muscolari volutamente schiacciate producono numerosi fattori mitogenici per le cellule progenitrici del muscolo, alcuni dei quali sono stati identificati, quali il fattore basico di crescita dei fibroblasti (bFGF) e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF-BB).

I macrofagi, che invadono l'area lesionata e fagocitano il tessuto danneggiato, producono anch'essi fattori di crescita, quali PDGF, TGF- $\beta$ , basic-FGF che sono mitogenici per le cellule progenitrici del muscolo. Anche fattori di crescita come HGF, basic-FGF e il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1), TGF- $\beta$  promuovono la chemiotassi di cellule satellite nel tessuto in coltura [Bischoff, 1997].

Le cellule satellite vicine al sito lesionato sono quindi indotte a replicarsi e a migrare, tuttavia è evidente che le cellule satellite penetrano nel luogo ove è presente una lesione da ogni parte all'interno del muscolo o, in circostanze critiche, anche dai muscoli attigui [Hawke et Garry, 2001; Seale et Rudnicki, 2000].

---

## 7. INGEGNERIA TESSUTALE E TESSUTO MUSCOLARE SCHELETRICO

L'ingegneria tessutale del muscolo scheletrico presenta importanti applicazioni in patologie congenite acquisite che possono portare spesso ad una morte precoce i bambini che ne sono colpiti.

Nel neonato, il trattamento dei difetti della parete addominale e del diaframma presentano caratteristiche particolari in quanto l'intervento deve tenere conto della crescita del soggetto; va quindi riparata la situazione anatomica senza interferire con i successivi processi di accrescimento. Le tecniche chirurgiche sono molteplici, certamente la procedura più semplice è la riparazione per prima intenzione utilizzando il muscolo residuo. Quando non esiste questa possibilità vengono usati materiali protesici sintetici, quali ad esempio fogli di silicone rinforzati con Dacron (Silastic), reti di Vicryl ricoperte di collagene, politetrafluoro etilene espanso (PTFE), poliesteri fluorinati. Questi però non permettono la crescita cellulare e non seguono lo sviluppo dell'organismo ricevente, offrendo solamente una soluzione transitoria al problema. Spesso sono associati anche a diverse complicazioni post-operatorie come infezioni della ferita, fistole dell'intestino, estrusione dalla rete dei polimeri e una ricomparsa del difetto in circa il 25% dei casi [Luijendijk et al., 2000].

Al contrario, i materiali biologici, oltre a favorire l'adesione e la proliferazione cellulare *in vitro* e *in vivo*, sono meno suscettibili alle infezioni e causano minori reazioni di rigetto. Un esempio di questi biomateriali è la *SIS* (*Small Intestinal Submucosa*) che deriva dalla matrice extracellulare della tonaca sottomucosa dell'intestino tenue di suino ed è stata valutata come sostituto della parete addominale in modelli animali di ratto e di coniglio.

Applicando i concetti dell'ingegneria tessutale, alcuni ricercatori [Fauza et al., 2001] hanno riportato risultati positivi nell'impiego della *SIS* seminata con mioblasti fetali per la riparazione di difetti diaframmatici su feti di agnello. Le cellule seminate hanno facilitato la rigenerazione e la crescita tessutale, a differenza dello scaffold naturale senza cellule seminate che è stato utilizzato come controllo negativo.

---

Nell'esperienza di Jyn-Yao *et al.* (2003), per la cura di vasti difetti della parete addominale in ratti Lewis, sono stati utilizzati costrutti tessutali ingegnerizzati costituiti da un gel di collagene, su cui sono state seminate cellule muscolari e fibroblasti, e questo è stato collocato tra due strati di SIS. I risultati positivi per questo tipo di patch protesico sono dovuti sia ad una maggiore performance meccanica sia alla neovascolarizzazione come supporto delle nuove cellule garantendo così, a differenza delle matrici acellulari, una maggiore infiltrazione.

I tessuti ricostruiti *in vitro* possono quindi essere una scelta valida come sostituti della parete addominale.

Esperimenti effettuati inizialmente hanno evidenziato che la matrice acellulare muscolare omologa, utilizzata *in vivo* per riparare un difetto nella parete muscolare addominale, non veniva ripopolata dalle cellule muscolari scheletriche dell'ospite ed era progressivamente rimodellata in tessuto fibroso. Pertanto essa, sebbene non fosse stata rigettata e non avesse indotto un'importante risposta infiammatoria, non rappresentava un valido sostituto tissutale [Gamba *et al.*, 2002]. Successivamente è stato utilizzato lo stesso tipo di matrice, ma preventivamente ripopolata da mioblasti autologhi, in grado di migliorare la biocompatibilità *in vivo* degli impianti [Marzaro *et al.*, 2002].

Per il riparo di estesi difetti muscolari, viene riportato in bibliografia l'utilizzo di differenti tipi di supporti per l'adesione e la crescita di mioblasti, quali ad esempio maglie di acido poliglicolico o di collagene di tipo I [Saxena *et al.*, 1999], soluzione di calcio-alginato, fibre di acido poliglicolico e idrogeli di acido ialuronico, [Kamelger *et al.* 2004], gel di fibrina iniettato direttamente nel difetto muscolare con il sistema di iniezione Duploject [Beier *et al.*, 2004]. Nonostante i risultati positivi, bisogna sottolineare che in tutti questi lavori la sperimentazione *in vivo* era di durata limitata, non superando mai il periodo di 6 settimane.

In un altro lavoro [Conconi *et al.*, 2005] con sostituti muscolari, formati da matrice acellulare e mioblasti ottenuti da ratti Sprague-Dawley, abbiamo dimostrato che tutti gli impianti, oltre ad essere ben integrati nel tessuto del ricevente, venivano ripopolati da cellule muscolari scheletriche e rispondevano in modo positivo in studi elettrofisiologici. Dopo 3 mesi dall'impianto, però, il *patch* risultava essere circondato da tessuto adiposo e fibroso e il suo spessore era diminuito così come l'attività elettrica, suggerendo una perdita delle fibre muscolari. Ciò era dovuto al

---

sito anatomico dell'impianto, in quanto questo era stato inserito tra il muscolo obliquo esterno e interno dell'addome, interrompendo così la continuità funzionale con il muscolo dell'organismo ricevente.

Partendo da questi presupposti, abbiamo utilizzato ratti Lewis singenici dotati, cioè, di un patrimonio genetico uguale o molto simile, rendendo possibile il trapianto di organi e/o tessuti da un individuo all'altro senza pericolo di rigetto [De Coppi et al., 2006]. I sostituti muscolari ottenuti *in vitro* formati da mioblasti ricavati da ratti di cariotipo XY e matrice acellulare sono stati utilizzati *in vivo* per riparare difetti a tutto spessore della parete addominale in ratti di cariotipo XX. In questo caso è stato accertato che i sostituti muscolari venivano ripopolati *in vivo* da strutture dotate di innervazione e simili alle fibre muscolari scheletriche, in grado di mantenere nell'ospite la loro integrità strutturale fino a 9 mesi, senza andare incontro ad atrofia o ad altri segni di degenerazione. Tutti gli animali erano sopravvissuti all'intervento senza contrarre infezioni; gli impianti apparivano ben conservati rispetto alle dimensioni originali, ben integrati nel tessuto del ricevente e vascolarizzati. La valutazione degli esiti degli impianti è avvenuta dopo 1, 2, 3 e 9 mesi dall'intervento tramite analisi istochimica, immunoistochimica e molecolare. Gli impianti sono stati sottoposti ad analisi molecolare per verificare l'espressione del gene SrY, marcatore del cromosoma Y e ad analisi immunoistochimica con l'anticorpo anti-VACHT (*vesicular acetylcholine transporter*). È risultato che questo trasportatore veniva espresso sulla superficie delle fibre muscolari neoformate a partire dal primo mese successivo all'intervento. Visti questi risultati positivi, in un altro lavoro [Conconi et al., accepted] si è verificato che tale approccio può essere applicabile anche al trattamento dell'ernia diaframmatica congenita (CDH).

## **8. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI**

Benchè i risultati ottenuti siano molto promettenti, in vista di possibili future applicazioni mediche, emerge un problema quando le cellule satelliti del muscolo abbiano una funzionalità compromessa o il loro numero sia esiguo

---

all'interno delle fibre muscolari. Per superare questo problema, abbiamo rivolto parte del nostro studio all'identificazione di fonti alternative di cellule e loro utilizzo nella rigenerazione muscolare, come le cellule staminali di derivazione fetale. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono cellule self-renewal, con caratteristiche di pluripotenzialità, inizialmente identificate nel midollo osseo e, più recentemente, in molti altri tessuti fetali e adulti, compreso il tessuto osseo, il liquido sinoviale, il tessuto muscolare, il tessuto adiposo e il sangue del cordone ombelicale [Baksh et al., 2004; Barry et al., 2003; Prockop et al., 2003]. Le MSC poste in coltura, formano colonie di cellule aderenti caratterizzate da morfologia fibroblastoide. Esse sono in grado di differenziarsi *in vitro* in vari tipi di cellule di origine mesodermica, quali condrociti, osteoblasti, adipociti e mioblasti [Dominici et al., 2006].

Le MSC sembrano essere anche in grado di differenziarsi in cellule non appartenenti alla linea mesodermica come, ad esempio, le cellule neuronali [Munoz et al., 2005]. Le MSC hanno attirato l'attenzione per sviluppare future terapie cellulari e geniche per diversi motivi: 1) sono facilmente ottenibili da tessuti adulti, e quindi sono slegate da problematiche di carattere etico, a differenza delle cellule staminali embrionali; 2) possono essere rapidamente espanse, senza perdere il fenotipo o la capacità differenziativa; 3) sono in possesso di un fenotipo superficiale scarsamente riconosciuto da cellule di tipo T (assenza di MHC II) [Devine et al., 2000; Majumdar et al., 2003; Gotherstrom et al., 2004]. La loro natura ipo-immunogenica consente il trapianto allogenico [Ryan et al., 2005; Caplan, 2007], che viene ben tollerato [Liechty et al., 2000; Grinnemo et al., 2004; Mansilla et al., 2005]. Il potenziale terapeutico delle MSC è già stato dimostrato non solo su modelli animali, ma anche in studi su un piccolo numero di pazienti. Per esempio, MSC sono state utilizzate in pazienti affetti da osteogenesis imperfecta, sindrome di Hurler, leucodistrofia metacromatica e malattia di Buerger, e nei pazienti che avevano subito lesioni del midollo spinale o post-infarto al miocardio [Fouillard et al., 2003; Wollert et al., 2004; Kim et al., 2006].

MSC umane, isolate dalla membrana sinoviale, sono state trapiantate in topi dopo degenerazione muscolare indotta con cardiotoxina (CTX), e in topi *mdx* affetti da distrofia muscolare di Duchenne [De Bari et al., 2003]. Dopo l'impianto nel muscolo, le MSC hanno contribuito alla formazione di miofibre e hanno

---

contribuito alla conservazione di cellule satellite a lungo termine. Questo studio ha dimostrato che un piccolo numero di MSC, iniettato nel flusso sanguigno, sono in grado di integrarsi in diversi tessuti. Tuttavia, le MSC possono acquisire il fenotipo muscolare solo quando si trovano all'interno del muscolo scheletrico, ma non in altri tessuti, suggerendo che il differenziamento *in vivo* delle MSC è sensibile ai segnali ambientali. Inoltre, alcune delle cellule trapiantate persistevano come cellule satelliti funzionanti e continuavano a ripristinare le fibre muscolari dell'ospite senza ripetere il trapianto [Dezawa et al., 2005].

Il sangue del cordone ombelicale umano (UCB), è stato sempre più oggetto di studio come fonte alternativa al midollo osseo per ottenere cellule staminali multipotenti. Oggi, il sangue cordonale è una fonte ampiamente accettata di cellule staminali ematopoietiche, e trapianti di cellule staminali di derivazione cordonale sono stati eseguiti con successo per una serie di malattie ematologiche e oncologiche [Chao et al., 2004]. Inoltre, esso contiene oltre che cellule ematopoietiche, anche cellule staminali mesenchimali, aprendo la strada verso nuovi potenziali [Erices et al., 2000; Mertelsmann, 2000]. Rispetto al sangue periferico, il sangue del cordone ombelicale ha una quantità di cellule staminali dieci volte maggiore, e leggermente inferiore a quella delle staminali derivanti da midollo osseo (10:15 rispettivamente), ma dotate di maggiore capacità proliferativa [Murohara, 2001].

Sembra che la graft-versus-host disease (GVHD), una terribile complicanza immunitaria legata ai trapianti, si verifichi meno frequentemente quando le cellule utilizzate derivano da UCB, rispetto alle cellule ottenute da tessuti adulti [Schmitz et al. 2002]. La contaminazione materna delle cellule ha dimostrato di non essere un grave problema [Lu et al., 1996]. Inoltre, la corrispondenza immunologica e il potenziale engraftment positivo di cellule staminali del sangue cordonale può richiedere soltanto un matching di 3 su 6 marcatori di classe MHC, mentre il midollo osseo di solito richiede una corrispondenza non inferiore a 5 su 6 per un simile risultato [Kurtzberg et al., 1996].

Le MSC risultano essere pertanto una possibile alternativa alle cellule satellite delle fibre muscolari nella riparazione della muscolatura scheletrica. Esiste infatti la possibilità di prelevare, all'atto della nascita, il sangue cordonale e di stoccarlo in banche di tessuti, così da avere una riserva autologa di MSC da utilizzare nel

---

trattamento di malattie congenite muscolari, quali ad esempio la gastroschisi e l'onfalocele.

---

## SCOPO DELLA TESI

Per la riparazione di difetti muscolari a tutto spessore, sono stati proposti numerosi approcci sperimentali, che prevedono l'utilizzo di differenti tipi di supporti per l'adesione e la crescita di mioblasti, quali ad esempio maglie di acido poliglicolico o di collagene di tipo I, alginato e idrogeli di acido ialuronico, gel di fibrina. Tuttavia, i risultati ottenuti non sono stati pienamente soddisfacenti sia per una mancata o incompleta ricostruzione di tutte le componenti muscolari, che per la durata limitata della sperimentazione *in vivo*. In precedenti lavori il gruppo di ricerca, presso il quale è stata svolta questa tesi, ha evidenziato come la sola matrice cellulare omologa del muscolo scheletrico non sia in grado di riparare difetti muscolari [Gamba *et al.*, 2002] e che la presenza di cellule satellite autologhe all'interno del sostituto muscolare rappresenti un fattore essenziale per migliorare la biocompatibilità *in vivo* degli impianti [Marzaro *et al.*, 2002]. Successivamente, è stato dimostrato che, dopo 9 mesi dall'impianto in ratti, sostituti muscolari formati da matrice acellulare e mioblasti mantenevano lo spessore e le dimensioni originali e venivano completamente ripopolati da cellule muscolari scheletriche e da elementi del sistema nervoso [Conconi *et al.*, 2005; De Coppi *et al.*, 2006].

Partendo da questi risultati incoraggianti, è apparso interessante chiarire i parametri e i meccanismi molecolari coinvolti nel processo rigenerativo che avviene in tale modello sperimentale. In questo contesto si inserisce questo lavoro sperimentale nel quale è stata valutata l'espressione dei geni coinvolti nella rigenerazione del muscolo scheletrico e delle fibre nervose mediante procedure immunoistochimiche e di RT-PCR effettuate sugli impianti a 1 settimana, 1 mese, 2 mesi e 3 mesi dall'intervento.

Benchè i risultati ottenuti siano molto promettenti, in vista di possibili future applicazioni mediche, emerge un problema quando le cellule satelliti del muscolo abbiano una funzionalità compromessa o il loro numero sia esiguo all'interno delle fibre muscolari. Per superare questo problema, abbiamo rivolto parte del nostro studio all'identificazione di fonti alternative di cellule e loro utilizzo nella rigenerazione muscolare, come le cellule staminali di derivazione fetale.

---

Si è quindi voluto studiare quindi l'utilizzo di cellule mesenchimali ottenute dal sangue cordonale che sono state differenziate *in vitro* verso la linea miogenica. Inoltre, sono state impiantate *in vivo* nel muscolo *tibialis anterior* di ratto Lewis, precedentemente danneggiato, così da valutarne l'eventuale ruolo e apporto nella rigenerazione muscolare.

---

# MATERIALI E METODI

## SPERIMENTAZIONE *IN VITRO*

### 1. Mioblasti derivati da cellule satellite del muscolo scheletrico

#### a. Colture cellulari

Le cellule satellite sono state estratte dal muscolo *flexor digitorum brevis* (FDB) della zampa posteriore di ratti Lewis di sesso maschile di circa 100g di peso. I ratti sono stati sacrificati e, in seguito, è stata effettuata un'incisione longitudinale alla pianta della zampa, distaccando il muscolo dalle sue connessioni tendinee e prestando attenzione che la lama del bisturi non andasse a ledere il tessuto muscolare per non rovinare le fibre in esso contenute.

Il muscolo estratto è stato immerso per un lavaggio in soluzione salina tamponata (PBS, Posphate Buffer Saline costituito da 80g NaCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , 2g KCl e 2g  $\text{KHPO}_4$  in 1000ml di acqua distillata) contenente antibiotico/fungizone (AF, Streptomicina e Anfotericina B, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). In condizioni sterili sotto cappa a flusso laminare, il muscolo è stato trasferito in una piastra da 6 pozzetti (Falcon) contenente 2 ml di una soluzione allo 0,2% (wt/vol) di collagenasi tipo I (Worthington Biochemical, Lakewood, N.J., USA) in DMEM (Dulbecco Modified Eagles Medium, Sigma) e incubato a 37°C per 2 ore e 45 minuti. La collagenasi opera una digestione enzimatica della struttura generale del muscolo (endomisio e perimisio), permettendo alle fibre muscolari di staccarsi le une dalle altre.

Successivamente, il muscolo è stato trasferito in un secondo pozzetto contenente *terreno di semina*, prestando attenzione a trasportare la totalità del muscolo e la minor quantità di soluzione enzimatica.

Il *terreno di semina* era composto da Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ad alto tenore di glucosio [4500 mg/l], Sigma) contenente il 10% di Horse Serum (HS, Invitrogen Italia, San Giuliano Milanese, Italy), 1%

---

Antibiotico/Fungizone (AF) e 0,5% Chick Embryo Extract (CEE ultrafiltrate, Invitrogen).

L'Horse Serum disattiva la collagenasi interrompendo così la digestione enzimatica.

A questo punto sono stati condizionati dei pozzetti tramite l'utilizzo di Matrigel (MATRIGEL® Basement Membrane Matrix, Becton Dickinson, Bedford, MA, USA) e DMEM in rapporto 1:10 (v/v). In ogni pozzetto sono state seminate le fibre che precedentemente sono state separate con una Gilson da 200 µl e isolate al microscopio ottico.

Il Matrigel per essere pronto all'uso è stato scongelato in ghiaccio a 4°C e tutte le operazioni sono state eseguite velocemente per evitare la gelificazione.

Le fibre muscolari sono state lasciate con la minima quantità di terreno per 72 ore in incubatore a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>.

Al termine dei 3 giorni sono stati aggiunti lentamente per pozzetto circa 2 ml di terreno di semina. Dopo circa 48 ore il terreno di semina è stato eliminato e, in seguito ad un lavaggio con PBS, le colture sono state staccate con 0,002 % EDTA (Sigma) e 0,25% tripsina (Sigma) in PBS, in rapporto 1:1 (v/v). Sono state quindi centrifugate per 5 minuti a 1500 rpm, il pellet è stato risospeso in *terreno di proliferazione* e le cellule seminate in piastre Petri da 10 ml (Falcon) precedentemente condizionate con Matrigel e DMEM, in rapporto 1:20 (v/v).

Il *terreno di proliferazione* era composto da DMEM (high glucose) contenente 20% FBS, 10% HS; 1% CEE e 1% AF .

Il terreno di proliferazione è stato cambiato a giorni alterni, eseguendo prima un breve lavaggio in PBS.

#### **b. Ottenimento della matrice acellulare**

La matrice acellulare omologa è stata ottenuta in condizioni sterili dai muscoli della parete addominale di ratti Lewis di sesso femminile. Il tessuto è stato immerso in PBS contenente l'1% di AF per un lavaggio preliminare e successivamente trattato, secondo il metodo di Meezan *et al.* (1975), con:

- 
- Acqua MilliQ autoclavata contenente AF in rapporto 10:1 per 72 ore a 4°C, per ottenere l'osmolisi cellulare;
  - Soluzione al 4% di deossicolato di sodio (Sigma) in acqua MilliQ per 4 ore sotto agitazione, a temperatura ambiente. Essendo un detergente tensioattivo disgrega la componente lipidica delle membrane cellulari;
  - Lavaggio in PBS;
  - 2000 kU di deossiribonucleasi I (DNAsi, Sigma) in soluzione di NaCl 1M (Sigma), per 3 ore sotto agitazione a temperatura ambiente al fine di distruggere gli acidi nucleici che si liberano;
  - Lavaggio in PBS.

Per ottenere la matrice acellulare sono stati effettuati due cicli del trattamento sopra descritto. Alla fine del primo e del secondo ciclo si è ripulito, sempre in condizioni sterili, il tessuto muscolare da eventuali parti connettivali residue.

L'assenza di elementi cellulari è stata confermata mediante analisi istologica per mezzo della colorazione con ematossilina-eosina (l'ematossilina, basica, colora il nucleo in blu; l'eosina, acida, colora il citoplasma in rosa). La matrice acellulare è stata conservata in PBS con aggiunta di AF a 4°C fino al momento del suo utilizzo.

### **c. Saggio *in vivo* su membrana corioallantoidea di pollo (CAM test)**

La membrana corioallantoidea è una struttura extrauterina altamente vascolarizzata che delimita internamente il guscio delle uova di uccelli e rettili, mentre in molti mammiferi è identificabile con la placenta. Si forma dalla fusione tra la membrana allantoidea e il corion dopo quattro giorni dall'avvenuta fertilizzazione dell'uovo. Mentre l'allantoide è una componente extraembrionale di derivazione mesodermica, in cui già a partire dal terzo giorno inizia a prendere forma una rete vascolare primitiva, il corion è invece un epitelio di origine ectodermica.

Il primo abbozzo vascolare continua a proliferare e a differenziare fino ad originare un sistema capillare arteriovenoso che dall'allantoide si estende fino alla zona

---

subito al di sotto del corion, e in questo modo media gli scambi gassosi con l'ambiente esterno. Il rapido sviluppo capillare cessa al giorno 11°, con arresto e decremento della proliferazione delle cellule endoteliali, per lasciar posto a fenomeni di maturazione e arrangiamento dell'apparato vascolare, che terminano poco prima (18° giorno) della schiusa dell'uovo [Ausprunk *et al.*, 1974].

Il test è stato condotto presso il laboratorio del Prof. Ribatti, docente di Anatomia Umana, Istologia ed Embriologia; Dip. di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana, dell'Università di Bari.

Uova di pollo *White Leghorn* fertilizzate, sono state poste in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata. Dopo 3 giorni con una siringa senza ago, a livello dell'estremità più appuntita dell'uovo, si è aspirato un volume di 2-3 mL di albume, in modo da favorire il distacco della membrana corioallantoidea dal guscio. Una porzione di quest'ultimo è stata rimossa con l'aiuto di forbici a creare un'apertura da cui fosse visibile la CAM. La finestra è stata poi chiusa con un vetrino e il tutto è stato riposto nuovamente in incubatore. All'8° giorno, sulla superficie esposta della membrana, sono state impiantate le matrici acellulari da testare e delle spugne sterili di gelatina di circa 1mm<sup>3</sup>, con adsorbito b-FGF (500ng/embrione) disciolto in 1 µL di PBS [Ribatti *et al.*, 2006].

Il fattore di crescita pro-angiogenico b-FGF è stato impiegato come controllo positivo, mentre il solo PBS, usato come veicolo, è servito da controllo negativo. Le uova riposte in incubatore, sono state esaminate giornalmente fino al 12° giorno e fotografate *in ovo* (direttamente sull'uovo, senza la rimozione dell'impianto) con uno stereomicroscopio dotato di fotocamera, Camera System MC 63 (Zeiss, Oberkochen, Germany), ad ingrandimento 50x.

La quantificazione della risposta angiogenica indotta, è stata valutata contando i vasi sanguigni che dalla CAM sono migrati all'interno dell'impianto e della spugna. La conta è stata effettuata da due diversi esaminatori, in modalità a doppio cieco. L'analisi statistica dei dati di ciascun campione, media di 20 esperimenti, è stata effettuata con t-test di Student.

---

#### **d. Colture *in vitro* di mioblasti su matrice acellulare**

Colture primarie di mioblasti sono state staccate e le cellule ( $10^4/\text{cm}^2$ ) sono state seminate sulla matrice acellulare, e coltivate con terreno di proliferazione. A distanza di 1, 2 e 7 giorni dalla semina, le cellule sono state fissate in glutaraldeide (Merk) al 3% in tampone cacodilato (Merk) 0,1M, pH 7,2 a 4 °C. Dopo disidratazione tramite la scala ascendente degli alcoli, Critical Point Drying e metallizzazione con oro, i preparati sono stati osservati con un microscopio elettronico a scansione, SEM (Cambridge Stereoscan).

Per l'impianto i mioblasti sono stati coltivati per 3 giorni in terreno di semina e per 4-5 giorni in terreno di proliferazione, controllati ogni giorno al microscopio ottico, avendo cura che non raggiungessero la confluenza e non iniziassero *in vitro* il processo di differenziamento in miotubi. Il terreno è stato cambiato a giorni alterni. Il giorno prima dell'impianto *in vivo*, dopo aver tolto il terreno di proliferazione ed aver fatto un lavaggio in PBS, le colture sono state staccate dalle piastre con 0,002% EDTA e 0,25% tripsina in PBS, in rapporto 1:1 (v/v), e centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti. Il pellet è stato risospeso in *terreno di proliferazione* e le cellule seminate sulla matrice acellulare ( $50\text{-}60 \times 10^6/\text{cm}^2$  contate tramite camera di Burker) precedentemente tagliata in quadrati di dimensioni pari a circa 2,5 x 2,5 cm. Le colture sono state quindi incubate a 37°C in presenza di terreno di proliferazione.

## **2. Cellule mesenchimali da sangue cordonale**

### **a. Colture cellulari**

Il sangue cordonale umano è stato ottenuto dalla Banca nazionale del sangue del New Jersey, USA (NJCBB), stoccato presso il Coriell Institute for Medical Research. I campioni di sangue cordonale (UCB) sono stati trattati secondo il protocollo approvato dall' Institutional Review Board. Entro 10 minuti dal distacco

---

dalla placenta, il sangue cordonale è stato drenato dalla parte distale e versato in una soluzione di citrato-fosfato e anticoagulante. Questi campioni sono stati processati entro le 12-24 ore dopo le operazioni di routine che comprendono analisi ematologiche, immunologiche e test microbiologici. I campioni sono stati trattati con HISTOPAQUE-1077 (Sigma; St. Louis, MO) per separare secondo gradiente le cellule mononucleate. I campioni sono poi stati centrifugati a 1250 rpm per 25 min a 20°C e la frazione contenente le cellule nucleate (buffy coat) è stata prelevata, lavata con 1X PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA) e centrifugata a 500 rpm per 10 minuti. Le cellule sono state lavate nuovamente in PBS e centrifugate a 350 rpm per 5 minuti. Le UCB-MSC sono state poi coltivate in piastre condizionate con fibronectina (5 ng/ml) in DMEM low glucose con 10% FBS. Dopo i primi 5 giorni di coltura, il mezzo è stato sostituito e le cellule non aderenti alla piastra sono state rimosse. Dopo ulteriori 10 giorni in coltura, sono state evidenziate singole colonie di cellule aderenti e di forma allungata, isolate utilizzando una soluzione a bassa concentrazione di tripsina (0.05%), e mantenute in mezzo di coltura, sostituito due volte a settimana. Le cellule aderenti sono state ulteriormente selezionate per 2-3 settimane così da poter permettere l'espansione di colonie derivanti di una singola cellula mesenchimale (Markov et al, 2007). Le cellule utilizzate per gli esperimenti sono state cresciute sino al 90-95% di confluenza in DMEM low-glu con aggiunta del 10% di FBS.

Le MSC sono poi state trasdotte dal dott. Xu con un vettore SIN lentivirus esprime "enhanced Green Fluorescent Protein" (E-GFP) (Xu et al. 2001). Le cellule sono state sottoposte a selezione con cell sorting mediante FACS e seminate alla densità di 6000 cellule/cm<sup>2</sup> in DMEM low glu con 10% FBS.

#### **b. Differenziamento *in vitro* di cellule mesenchimali da sangue cordonale.**

Le MSC sono state seminate (10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>) su piastre Petri condizionate con Matrigel 1:10 in DMEM low glucose (1 h a 37 °C di incubazione prima della semina) e coltivate in terreno composto da DMEM low glucose contenente 10% FBS e 1% AF. Dopo 24 ore il differenziamento miogenico è stato eseguito cambiando il mezzo di coltura con *terreno di induzione miogenica*, composto da DMEM low

---

glucose contenente 2% HS, 1% AF, 1% CEE per 8 giorni. Il terreno è stato cambiato ogni 3 giorni. Come controllo, sono state utilizzate le medesime cellule coltivate con il solo terreno proliferativo. A 4 e 8 giorni è stata eseguita una analisi a immunofluorescenza sulle colture cellulari di MSC con marker della linea miogenica quali anti-Myf5 (Sigma) e anti-Desmin (Iowa Hybridoma Bank); al time point desiderato le cellule sono state sciacquate con PBS e fissate con una soluzione 1:1 di metanolo e acetone, per 10 minuti a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sciacquate nuovamente con PBS, sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con soluzione di blocking composta da PBS contenente il 5% BSA. Poste poi in incubazione con l'anticorpo primario (1:500 anti-Myf5 e 1:20 anti-Desmin; soluzione di PBS contenente il 3% di BSA) overnight a  $+4^{\circ}\text{C}$ , dopo ulteriore risciacquo con PBS, si è aggiunto l'anticorpo secondario Alexa Fluor 594 (1:1000 in soluzione di PBS con 1,5% di BSA) per 30 minuti. I vetrini sono stati montati con DAPI (Vector) e coperti con un vetrino coprioggetti per essere osservati al microscopio a fluorescenza. Le immagini sono state acquisite mediante fotocamera Nikon (Digital Sight DS-MSc).

Inoltre, si è eseguita una analisi Real Time PCR (7700 Sequence Detector, Applied Biosystem) utilizzando primer human-MyoD e human-Myogenin specifici (Tebella 2) per confermare il differenziamento. L' RNA totale è stato estratto utilizzando l' RNAeasy Mini Kit (Qiagen), e il cDNA è stato sintetizzato mediante il kit Super Script III (Invitrogen). La PCR real-time PCR (o quantitativa), è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee del DNA (mix utilizzata in Tabella 3). Sono state utilizzate sonde SYBR Green I dye (SYBR Green PCR master mix, Applied Biosystems) che si intercalano nella doppia elica del DNA. Quando nella reazione di polimerizzazione si ha un'amplificazione delle sequenze target, dette ampliconi, la sonda SYBR Green I dye si lega alle doppie eliche neo formate, andando ad aumentare la fluorescenza, che viene quantificata e rapportata per via indiretta (normalizzazione) rispetto ad un gene housekeeping come GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). L'incremento della fluorescenza è quindi proporzionale al prodotto della PCR, ovvero ai primers analizzati. La reazione di amplificazione prevedeva le seguenti condizioni: 10 minuti a  $95^{\circ}\text{C}$  la AmpliTaq Gold DNA Polymerase; 40 cicli a  $95^{\circ}\text{C}$  per 15 secondi e 1 minuto a  $60^{\circ}\text{C}$ .

**Tabella 2:** Primer impiegati nelle reazioni di amplificazione

| Primer    | Sequence   | Product (bp) |
|-----------|--|--------------|
| GAPDH     | S: 5'-CCTCCCGCTTCGCTCTCT-3'<br>A: 5'-CTGGCGACGCAAAGAAGA-3'     | 64           |
| hMyoD     | S: 5'-TAGGAGAGGCGGAGAACTGAAG-3'<br>A: 5'-GGAAAAACCGCGCTGTGT-3' | 67           |
| hMyogenin | S: 5'-GCTCACGGCTGACCCTACA-3'<br>A: 5'-CACTGTGATGCTGTCCACGAT-3' | 70           |

**Tabella 3:** Componenti mix Real Time PCT

| Componenti mix Real Time PCR | Volume per pozzetto $\mu$ l |
|------------------------------|-----------------------------|
| SYBR Green Master Mix        | 12.5                        |
| Primer Forward               | 1(18uM)                     |
| Primer Reverse               | 1(18uM)                     |
| cDNA                         | 1                           |
| ddH2O                        | 9.5                         |
| Totale                       | 25                          |

---

## SPERIMENTAZIONE *IN VIVO*

### **1. Riparo di difetti sperimentali della parete addominale con matrice muscolare acellulare ripopolata *in vitro* con mioblasti**

Sono stati utilizzati n° 12 ratti Lewis di sesso femminile di circa 100 g di peso e di età compresa tra 1 e 3 mesi. I ratti sono stati pre-anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale con 35 mg/Kg di Zoletil (Tiletamina cloridrato e Zolazepam cloridrato) e 2 mg/Kg di Rompum (miorilassante). L'addome è stato rasato e la cute è stata disinfettata con Betadine. E' stata eseguita un'incisione lungo la linea mediana, separando la cute dal muscolo sottostante. Si è quindi creato chirurgicamente un difetto di 2,5 × 2,5 cm, nella muscolatura della parete addominale anteriore, a destra della linea mediana (tale è la sede più frequente della gastroschisi, infatti) ed in tale sede è stato impiantato il nostro costrutto costituito da matrice muscolare acellulare e mioblasti ottenuti da ratti maschi. Sono stati utilizzati punti di sutura non riassorbibili di tipo 6/0 in modo da identificare la zona dove è stato impiantato il *patch* al momento del suo recupero per l'analisi istologica. La cute è stata, invece, richiusa con punti di sutura riassorbibili di tipo 4/0 e la sutura nuovamente disinfettata con Betadine. Tutti gli animali sono stati trattati con antibiotici nei quattro giorni successivi all'intervento e nessun animale ha presentato infezione o deiscenza della ferita od altre complicanze post-operatorie. Non è stata inoltre utilizzata nessuna terapia immunosoppressiva. Gli esiti degli impianti sono stati valutati dopo 1 settimana (n=3), 1 mese (n=3), 2 mesi (n=3) e 3 mesi (n=3) dall'intervento.

---

## **2. Impianto di MSC da sangue cordonale in muscolo tibialis anterior danneggiato da bupivacaina cloridrato**

Sono stati utilizzati n° 12 ratti Lewis di circa 100 g di peso e di età compresa tra 1 e 3 mesi e così suddivisi: n=2 per valutazione danno indotto da soluzione bupivacaina cloridrato, n=4 trattati a 7 giorni, n=4 trattati a 14 giorni, n=1 controllo a 7 giorni e n=1 controllo a 14 giorni.

Dopo aver anestetizzato l'animale mediante iniezione intraperitoneale di Zoletil (35 mg/kg) e Rompum (2mg/kg), è stata effettuata l'incisione degli strati cutaneo e sottocutaneo fino a mettere in evidenza la fascia muscolare del tibialis anterior. Il muscolo è stato trattato con 0,5 ml di soluzione di bupivacaina cloridrato 0,5% in soluzione fisiologica, mediante tre somministrazioni fatte alle due estremità e nella parte mediana del muscolo, come descritto da Hill M. (Journal of Physiology, 2003). Dopo l'intervento gli animali sono stati trattati con antibiotico (Baytril 0,2 ml/Kg per due giorni) e antidolorifici (Contramal 3-5 mg/Kg 2-3 volte al dì intramuscolo per 2-3 giorni).

Dopo 48 ore l'animale è stato sacrificato tramite utilizzo di CO<sub>2</sub> per valutare istologicamente l'entità del danno provocato dalla soluzione di bupivacaina. Le MSC (10<sup>6</sup>) sono state iniettate per via intramuscolare a distanza di due giorni dall'iniezione di bupivacaina, mediante tre somministrazioni fatte alle due estremità e nella parte mediana del muscolo. Agli animali di controllo sono stati iniettati 0,5 ml di soluzione fisiologica. Gli animali sono stati trattati con antibiotico (Baytril 0,2 ml/Kg per due giorni) e antidolorifici (Contramal 3-5 mg/Kg 2-3 volte al dì intramuscolo per 2-3 giorni) e sono stati sacrificati tramite utilizzo di CO<sub>2</sub> dopo 7 e 14 giorni dalla somministrazione della sospensione cellulare.

---

### 3. Analisi istochimica, immunoistochimica e molecolare

#### *a. Analisi istochimica*

Al termine del tempo prestabilito dopo l'impianto, i ratti sono stati sacrificati e sia gli impianti addominali che i muscoli tibialis anterior, sono stati recuperati e inseriti in celle porta tessuto e fissati in formalina tamponata al 10% per prevenirne la decomposizione.

I campioni sono stati disidratati e inclusi in paraffina (composto ceroso di natura lipidica che funge da sostegno) secondo il seguente protocollo:

- Alcool 70% per 2 ore
- Alcool 80% per 2 ore
- Alcool 90% per 2 ore
- Alcool 95% per 2 ore
- Alcool Assoluto per 2 ore
- Xilolo per 2 ore
- Due passaggi in Paraffina in stufa a 60° C per 2 ore

I campioni inclusi in paraffina sono stati conservati a -20° C e tagliati poi con microtomo (Histoslide 2000, Reichert-Jung) in sezioni trasversali di 5 µm, adagate su vetrini Superfrost Plus (Menzel-Glaser) e lasciati asciugare a temperatura ambiente.

Per la colorazione i vetrini sono stati sparaffinati con 2 immersioni in xilolo da 5 minuti ciascuna. Successivamente sono stati idratati con la scala degli alcoli, come di seguito riportato:

- Alcool Assoluto 5 minuti
- Alcool 95% 5 minuti
- Alcool 80% 5 minuti
- Alcool 70% 5 minuti
- Alcool 50% 5 minuti

- 
- Alcool 30%            5 minuti
  - Alcool 10%           5 minuti
  - Acqua distillata      5 minuti

Le sezioni sono state trattate con Ematossilina (Emallume soluzione secondo Mayer, Merck), colorante viola che intercala nei nuclei, precedentemente filtrata con carta da filtro, per 4 minuti. L'eccesso di colorante è stato asportato con un duplice e veloce risciacquo in acqua distillata, e i vetrini sono stati immersi in acqua di fonte per 6 minuti. I campioni sono stati trattati poi per 20 secondi con Eosina G soluzione acquosa 0.5% (Merck), un colorante citoplasmatico che fa da contrasto all'Ematossilina. Successivamente le sezioni sono state disidratate in alcool 95%, assoluto e infine in xilolo. I vetrini, asciugati a temperatura ambiente, sono stati montati con Eukitt (Carlo Erba), coperti con un vetrino coprioggetti e osservati al microscopio ottico (Leica).

#### ***b. Analisi Immunoistochimica***

I campioni di partenza sono stati ottenuti con lo stesso protocollo descritto nel punto 3a che prevede la fissazione con formalina, disidratazione, inclusione in paraffina e ottenimento di sezioni di 5  $\mu$ m che sono state adagiate su vetrini Superfrost Plus.

I campioni di muscolo addominale sono stati analizzati per la presenza dei seguenti marker: MyoD (Sigma), marker nucleare; Tropomiosina sarcomerica (Sigma), marker citoplasmatico; Miogenina (Santa Cruz), marker nucleare; AchR (Santa Cruz), marker superficiale.

Dopo aver sparaffinato i vetrini con due passaggi in xilolo di 5 minuti ognuno e aver reidratato i *patch* con la scala degli alcoli, i vetrini sono stati lavati velocemente con PBS 1X e le sezioni sono state delimitate con il Liquid Blocker (Bio-Optica).

---

La permeabilizzazione delle membrane all'anticorpo è stata ottenuta mediante trattamento con una soluzione acquosa di Triton X-100 (Sigma) all'1% per 8 minuti a temperatura ambiente.

Dopo 3 veloci lavaggi con PBS i campioni sono stati incubati per 1 ora con una soluzione di perossido di idrogeno al 30% m/m in acqua (Carlo Erba) al buio ed a temperatura ambiente, al fine di disattivare le perossidasi endogene che altrimenti provocherebbero un intenso rumore di fondo.

In seguito, sono stati lavati per 3 volte con PBS e incubati per 1 ora e 15 minuti a temperatura ambiente con una soluzione mantenuta a 4°C di PBS contenente il 10% di siero della specie animale dell'anticorpo secondario (in questo caso Horse Serum), per ottenere il blocco dei siti aspecifici che danno falso positivo.

E' stata poi effettuata un'incubazione overnight in camera umidificata a temperatura ambiente con l'anticorpo primario diluito 1:500 in PBS contenente il 3% di siero della specie animale dell'anticorpo secondario (HS). Poiché si tratta di un'incubazione per molte ore è preferibile infatti diluire molto l'anticorpo primario che si lega all'antigene da evidenziare.

Il giorno seguente, dopo 3 lavaggi con la stessa soluzione in cui era stato diluito l'anticorpo primario, i campioni sono stati quindi trattati per 30 minuti in camera umidificata a temperatura ambiente con anticorpo secondario biotinilato (Vector). Questo è stato diluito in PBS contenente l'1,5% del siero della specie dell'anticorpo secondario secondo il protocollo fornito dalla Vector Laboratories, Inc, secondo il quale 4 gocce di anticorpo secondario vengono aggiunte a 5 ml di soluzione all'1,5% di siero (HS) in PBS.

Le sezioni sono state sottoposte di nuovo a lavaggio con PBS e incubate per 30 minuti in camera umida con la soluzione A/B (Reagente A= avidina, Reagente B= perossidasi biotinilata) del kit ABC (Vector), preparata precedentemente mettendo 2 gocce di reagente A e 2 gocce di reagente B per 5 ml di PBS e lasciata riposare per 30 minuti.

Dopo un lavaggio veloce in PBS le sezioni sono state poi trattate al buio con una soluzione rivelatrice (cromogena) contenente 3,3-diaminobenzidina (DAB), substrato delle perossidasi, preparata utilizzando 1 goccia di buffer a pH=7.5 (PBS puro), 2 gocce di DAB e 1 goccia di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (Vector) in 2,5 ml di acqua distillata e mantenuta al buio.

---

Dopo un tempo variabile dai 5 ai 10 minuti la reazione è stata bloccata con acqua distillata per un paio di minuti.

Successivamente i campioni sono stati disidratati in alcool 95% e assoluto e infine diafanizzati in xilolo.

I vetrini, asciugati a temperatura ambiente, sono stati montati con Eukitt e coperti con un vetrino coprioggetti per essere osservati al microscopio ottico. Le immagini sono state acquisite mediante fotocamera Nikon (Digital Sight DS-MSc).

Come controllo negativo sono state usate sezioni che sono state trattate, invece che con l'anticorpo primario, solamente con la soluzione al 3% di siero in PBS (soluzione di diluizione dell'anticorpo primario).

I campioni muscolo tibialis anterior sono stati analizzati per la presenza dei seguenti marker: MyoD, Myf-5 e Tropomiosina sarcomerica (Sigma) diluiti 1:500 in PBS contenente il 3% di BSA e incubazione "over night" in camera umidificata a temperatura ambiente; human Nuclei (Chemicon) diluizione 1:100; miosina MF20 (Iowa Hybridoma Bank) diluizione 1:20. Come anticorpo secondario si è utilizzato l'Alexa Fluor 594 (Invitrogen), 1:1000 in PBS contenente 1,5% BSA. Come controllo negativo sono state usate sezioni che sono state trattate, invece che con l'anticorpo primario, solamente con la soluzione al 3% di siero in PBS.

I vetrini sono stati montati con DAPI (Vector) e coperti con un vetrino coprioggetti per essere osservati al microscopio a fluorescenza. Le immagini sono state acquisite mediante fotocamera Nikon (Digital Sight DS-MSc).

Per alcuni anticorpi, come lo human Nuclei, si è anche inserito nel protocollo un passaggio "antigen retrieval" con soluzione tamponata di citrato di sodio (10mM) e Tween 20 allo 0,05%, pH 6.0. Le sezioni di tessuto, dopo esser state sparaffinate e idratate, sono state immerse nella soluzione a 95-100°C per 20 minuti circa, così da permettere uno "smascheramento" dell'antigene, che risulta parzialmente mascherato utilizzando fissativi quali formalina o aldeidi, aumentando il grado di legame dell'anticorpo primario.

---

***c. Valutazione dell'integrazione delle cellule mesenchimali nei muscoli tibialis anterior***

Le fibre di muscolo tibialis anterior contenenti cellule umane (EGFP positive) sono state contate in dieci sezioni trasversali di muscolo selezionate dall'intera lunghezza. Per ogni campo si è espresso il numero delle fibre EGFP positive come percentuale sul totale, ed inoltre, tramite l'utilizzo del software Scion Image 4.0.3.2., si è calcolata l'area coperta occupata dalle fibre EGFP positive rispetto all'area totale del campo preso in esame

***d. Analisi molecolare: espressione genica***

E' stata effettuata un'analisi molecolare sui frammenti di tessuto relativi agli impianti composti da matrice e mioblasti.

Per fare un'analisi molecolare, dopo aver estratto l'RNA dal tessuto o dalle cellule di interesse, si può procedere con una tecnica di RT-PCR che consente di amplificare il DNA a partire dall'RNA tramite due tappe distinte: retrotrascrizione dell'RNA ed amplificazione del cDNA ottenuto.

***Estrazione dell'RNA totale da tessuto***

Il protocollo per l'estrazione prevedeva l'uso del reagente TRIzol (Invitrogen), una soluzione monobasica di fenolo e guanidina isotiocianato. Questo reagente è un detergente in grado di degradare le cellule e i loro componenti mantenendo l'integrità dell'RNA. Tutti i passaggi sono stati eseguiti inoltre in contenitori privi di RNasi per evitare la degradazione dell'acido ribonucleico.

L'RNA totale è stato estratto da frammenti di tessuto (circa 50 mg), precedentemente congelati in azoto liquido e conservati a - 80°C. Questi frammenti, relativi agli impianti effettuati sui ratti Lewis, sono stati prelevati a 1 settimana, 1 mese, 2 mesi e 3 mesi dall'intervento chirurgico.

Il tessuto da processare è stato pesato su una bilancia analitica agendo velocemente per evitare il suo scongelamento. I frammenti sono stati poi trasferiti in un Tubo

---

Falcon da 50 ml nel quale era già stato aggiunto il TRIzol in ragione di 1 ml ogni 50 mg di tessuto. Utilizzando un omogenatore (Ultra-Turrax; IKA-WERKE) il tessuto è stato disgregato finché non erano più visibili frammenti. Questa operazione ha richiesto, per pezzetti da omogenare di 50-60 mg, circa 5 minuti ed è stata condotta mantenendo il contenitore in ghiaccio per evitare l'eccessivo riscaldamento della soluzione.

### Analisi dell'RNA estratto e retrotrascrizione a cDNA

L'RNA è stato analizzato allo spettrofotometro per determinarne la concentrazione ed evidenziarne eventuali contaminazioni da fenolo o da proteine.

Le proteine, che sono i principali contaminanti degli estratti, vengono misurate direttamente a 280 nm, gli acidi nucleici a 260 nm; un valore di assorbanza pari a 1 è equivalente a circa 40 µg/ml di RNA.

L'interferenza dovuta a contaminanti può essere evidenziata mediante il calcolo dei "rapporti". Il rapporto A260/A280 è usato per stimare la purezza degli acidi nucleici, dal momento che le proteine assorbono a 280 nm. In genere in preparazioni pure di DNA o di RNA tale rapporto vale, rispettivamente, 1,8 e 2,0. L'assorbanza a 230 nm, invece, riflette la contaminazione del campione dovuta a sostanze come carboidrati, fenoli, peptidi o composti aromatici. Nel caso di campioni puri il rapporto A260/A230 dovrebbe essere circa 2,2.

Preparazioni in cui i rapporti sopra indicati si discostano significativamente da quelli delle preparazioni pure, sono indice di contaminazione e ciò fa sì che la stima della concentrazione di RNA ottenuto sia meno accurata.

1 µg di mRNA di ciascun campione è stato così retrotrascritto a cDNA utilizzando un mix di reagenti forniti da Applied Biosystem, Monza, Italy.

---

### *Costruzione di primer specifici*

Grazie a delle banche dati (tab.1) sono diventate disponibili sequenze di DNA o RNA necessarie per poter disegnare i primer da utilizzare in PCR, prestando attenzione che questi non contengano sequenze tra loro complementari per evitare che si formino aggregati di primer (dimeri).

**Tabella 3:** Database e programmi bioinformatici per analisi dei geni e primer design

|  |
|--|
| <b>NUCLEOTIDE DATABASE (<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>)</b> |
|--|

|  |
|--|
| Raccoglie tutte le sequenze nucleotidiche di GenBank, EMBL e DDBJ. EMBL (European Molecular Biology Laboratory) a Hinxton Hall, UK; DDBJ (DNA Database of Japan) in Mishima, Japan. Le sequenze vengono incorporate dal Genome Sequence Data Base (GSDB), Santa Fe, NM. Il numero di basi in questi database continua a crescere in modo esponenziale. |
|--|

|   |
|---|
| <b>GENOME BROWSER (<a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu</a>)</b> |
|---|

|  |
|--|
| Creato presso l'Università di California Santa Cruz (UCSC), permette la visualizzazione rapida di una qualsiasi regione del genoma di differenti organismi riportando molteplici informazioni quali: marcatori polimorfi e STS, geni, predizioni geniche, EST <i>spliced</i> ed <i>unspliced</i> , mRNAs <i>full lenght</i> , SNPs, isole CpG ed altre caratteristiche correlate con la sequenza genomica. |
|--|

---

**RAT GENOME DATABASE (<http://rgd.mcg.edu>)**

E' stato fondato dal Dr. Howard J Jacob, Medical College del Wisconsin. Il ratto viene utilizzato come organismo modello per lo studio di molteplici patologie. Negli ultimi anni sono notevolmente aumentati i dati a disposizione sul genoma di questo organismo richiedendo un DataBase per la raccolta, l'analisi e la distribuzione efficiente di tali dati.

**OMIM (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>)**

Ideato dal Dr. Victor A. McKusick e mantenuto alla *John Hopkins University* di Baltimora, questo database riporta il catalogo (aggiornato mensilmente) dei fenotipi e dei geni-malattia umani.

**GENECARDS (<http://bioinformatics.weizman.ac.il/cards/>)**

Mantenuto presso il Weizmann Institute of Science, (Israele) GeneCards è un database di geni e dei loro prodotti, costruito integrando i dati di più di 30 diversi database.

**PRIMER3 (<http://genome.wi.mit.edu/cgi-in/primer/primer3.cgi>)**

Distribuito da WI/MIT (*Whitehead Institute for Biological Research/MIT Centre for Genome Research*). Questo programma permette di costruire coppie di primer specifiche secondo le caratteristiche richieste dall'utente.

**BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)**

BLAST è un insieme di programmi in grado di eseguire ricerche di similarità tra una data sequenza (nucleotidica o aminoacidica) e quelle depositate in numerosi database quali: HTGS (*High Throughput Genomic Sequences*), dbEST, Swissprot, PDB (*ProteinDataBase*), etc.

Nella tabella 2 sono indicati i geni analizzati e i primer specifici utilizzati che sono stati costruiti in modo da escludere l'appaiamento con la sequenza di DNA genomico (ad esempio a cavallo fra due esoni). Come geni housekeeping sono stati utilizzati il GAPDH e la  $\beta$ -Actina.

**Tabella 2:** Primer impiegati nelle reazioni di amplificazione

| Primers                      | Sequence  | Annealing Temperature | Product Size (bp) |
|------------------------------|---|-----------------------|-------------------|
| Myog-5'<br>Myog-3'           | 5'- CCTTGCTCAGCTCCCTCA-3'<br>5'- TGGGAGTTGCATTCACTGG-3'           | 60 °C                 | 94                |
| Myf5-5'<br>Myf5-3'           | 5'- GCTGAGGGAGCAGGTAGAGA-3'<br>5'- GACAGGGCTGTTACATTCAGG -3'      | 60 °C                 | 112               |
| Desm-5'<br>Desm-3'           | 5'- AGAAACAACCTTGGCTGCCTTC -3'<br>5'- CTTAGCCGCAATGGTCTCAT-3'     | 60 °C                 | 248               |
| betaACTIN-5'<br>betaACTIN-3' | 5'- CCCGCGAGTACAACCTTCT-3'<br>5'- CGTCATCCATGGCGAACT -3'          | 60 °C                 | 72                |
| MyoD1-5'<br>MyoD1-3'         | 5'-ACTACAGCGGCGACTCAGAC-3'<br>5'-GTGGAGATGCGCTCCACTAT-3'          | 60 °C                 | 208               |
| GAPDH-5'<br>GAPDH-3'         | 5'- AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'<br>5'- CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'        | 60 °C                 | 207               |
| PAX3-5'<br>PAX3-3'           | 5'- GGCTTCCCACTGGAAGTGT-3'<br>5'- ATGGAGCCTGTCTCCTGGTA-3'         | 60 °C                 | 233               |
| AchR-5'<br>AchR-3'           | 5'- TGGTGCTACTCGTTACTT-3'<br>5'- ATGCCTCTGTCCCTCAAAC-3'           | 60 °C                 | 430               |
| VEGF-5'<br>VEGF-3'           | 5'- AATGATGAAGCCCTGGAGTG-3'<br>5'- TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT-3'        | 60 °C                 | 210               |
| AGRN-5'<br>AGRN-3'           | 5'- TGTGAAGGTCAACACCAACC-3'<br>5'- ATGGCCCACTACCACGTC-3'          | 60 °C                 | 241               |
| MRF4-5'<br>MRF4-3'           | 5'- TGGACCCTTACAGCTACAAACCCA-3'<br>5'-ACGATGGAAGAAAGGCGCTGAAGA-3' | 60 °C                 | 184               |
| SRY-5'<br>SRY-3'             | 5'- CAGAGATCAGCAAGCAGCTG-3'<br>5'- TGCAGCTCTACTCCAGTCTTG-3'       | 58 °C                 | 230               |

### ***Reazione di amplificazione tramite PCR (Polymerase Chain Reaction)***

Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato sottoposto ad una reazione di amplificazione *in vitro*, Polymerase Chain Reaction (PCR). Si è posto in soluzione una minima quantità di cDNA (1 µl) in un mix di volume finale di 12,5 µl, costituito da:

- 1,25 µl di soluzione MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Applied Biosystem, Monza, Italy);
- 1,25 µl di buffer 10X (Applied Biosystem, Monza, Italy);
- 7,8 µl di H<sub>2</sub>O MILLIQ
- 1 µl di dNTPs Mix 10 mM (Applied Biosystem, Monza, Italy);

- 
- 0,2 µl di Ampli Taq Gold 5U/µl (Applied Biosystem, Monza, Italy);
  - 0,5 µl di primer senso specifici e 0,5 µl di primer antisenso specifici (10 pM, Invitrogen).

Per avviare la reazione di prolungamento a partire dal primer 5' è necessario che prima avvenga una fase di denaturazione con la separazione dei filamenti del DNA e una fase di annealing dove si forma il legame tra i primers e le regioni loro complementari dei filamenti di DNA. Questo processo risulta incompatibile con la DNA polimerasi umana, che viene distrutta alle alte temperature necessarie per la denaturazione (96-99°C). Per ovviare a questo inconveniente viene utilizzata una polimerasi termoresistente di organismi termofili detta Taq polimerasi. Ciò consente di realizzare più cicli di PCR in sequenza (fino a 50 cicli max), in ciascuno dei quali viene duplicato anche il DNA sintetizzato nelle fasi precedenti. La soluzione è stata quindi posta nel termociclatore Icycler e sottoposta alle seguenti condizioni di reazione:

- CICLO 1 (1X): STEP 1: 95°C per 2 minuti
- CICLO 2 (1X): STEP 1: 95°C per 5 minuti
- CICLO 3 (40X): STEP 1: 95°C per 30 secondi  
STEP 2: 60°C per 40 secondi  
STEP 3: 72°C per 40 secondi
- CICLO 4 (1X): STEP 1: 72°C per 10 minuti
- CICLO 5 (1X): STEP 1: 4°C per 10 minuti

L'allestimento di opportuni controlli di qualità permette di identificare falsi positivi o falsi negativi. Come controllo positivo è stato utilizzato un campione di cDNA ottenuto da muscolo scheletrico; il controllo negativo consisteva in un campione in cui la sequenza bersaglio mancava e per questo motivo è stata utilizzata l'acqua che permette di evidenziare eventuali contaminazioni sia durante l'estrazione del materiale genomico, sia durante l'allestimento della PCR.

---

## Elettroforesi orizzontale su gel di agarosio al 2%

L'ultimo step prevede il controllo della presenza e dello stato degli amplificati precedentemente ottenuti tramite un'ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO al 2% contenente bromuro di etidio (Invitrogen), una molecola planare intercalante il DNA doppia elica che assorbe alla lunghezza d'onda di 260 nm (UV) e la emette a 590 nm (VIS).

Dopo aver atteso la polimerizzazione del gel in una vaschetta riempita di una soluzione tampone TBE 1X (Tris-HCl, Ac.Borico, EDTA), sono stati caricati in ogni pozzetto presente nel gel 15-20 µl di cDNA amplificato tramite la PCR.

Per fare in modo che il cDNA resti adagiato sul fondo del pozzetto occorre miscelarlo al blu di bromofenolo che permette anche di rendere visibile il fronte di migrazione. In uno dei pozzetti è stato inoltre caricato un marcatore di peso molecolare (100 bp DNA Ladder, Sigma) per verificare, in base al numero di paia di basi, se la sequenza amplificata è quella di nostro interesse.

La corsa elettroforetica è stata eseguita applicando una differenza di potenziale di circa 6 V/cm di lunghezza del gel per un tempo opportuno (l'amplificato corre verso il polo positivo essendo caricato negativamente). Il gel infine è stato osservato su un transilluminatore a luce UV e il DNA risultava visibile in bande rosso-arancio; la bontà dell'amplificazione è stata valutata in base alla presenza di una banda nitida, d'intensità consistente e la cui migrazione, rapportata al marcatore di peso molecolare, corrisponda ad un segmento di DNA della dimensione attesa.

---

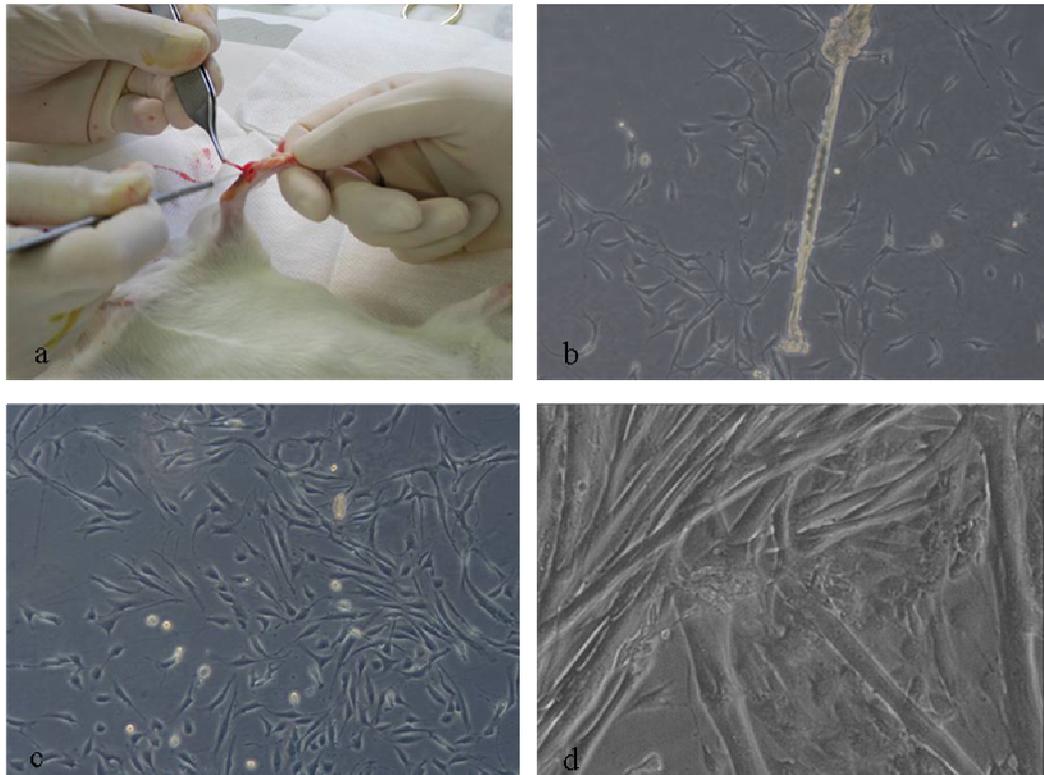
# RISULTATI

## 1. RIPARO DI DIFETTI SPERIMENTALI DELLA PARETE ADDOMINALE

### A. Colture di mioblasti da cellule satellite di muscolo scheletrico

I mioblasti sono stati ottenuti dal muscolo *flexor digitorum brevis* della zampa posteriore di ratto Lewis maschio (fig. 1a).

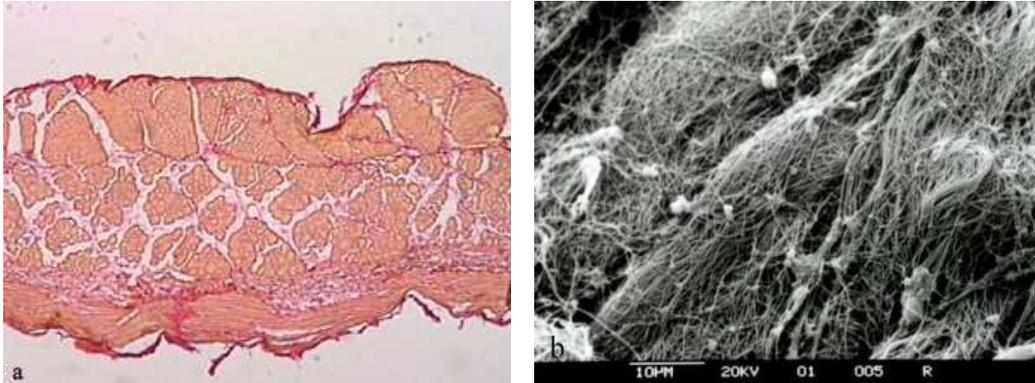
In seguito a digestione enzimatica, le singole fibre muscolari venivano separate e deposte in piastre Petri. Dopo 3 giorni, le cellule satellite migravano dalla superficie della fibra, si espandevano sulla superficie di coltura e proliferavano (fig. 1b). L'aggiunta di terreno di proliferazione causava la comparsa di cellule fusiformi, i mioblasti (fig. 1c). Quando le colture raggiungevano uno stato di subconfluenza, le cellule cominciavano a fondersi, formando dei miotubi (fig. 1d).



**Figura 1:** Estrazione del muscolo *flexor digitorum brevis* dalla zampa posteriore di ratto Lewis maschio (a) e relativa fibra muscolare separata dalle altre per digestione enzimatica (b x50). Fuoriuscita di mioblasti dalla fibra muscolare e loro adesione sulle piastre di coltura (c x50), fino a raggiungimento della confluenza e formazione di miotubi (d x100)

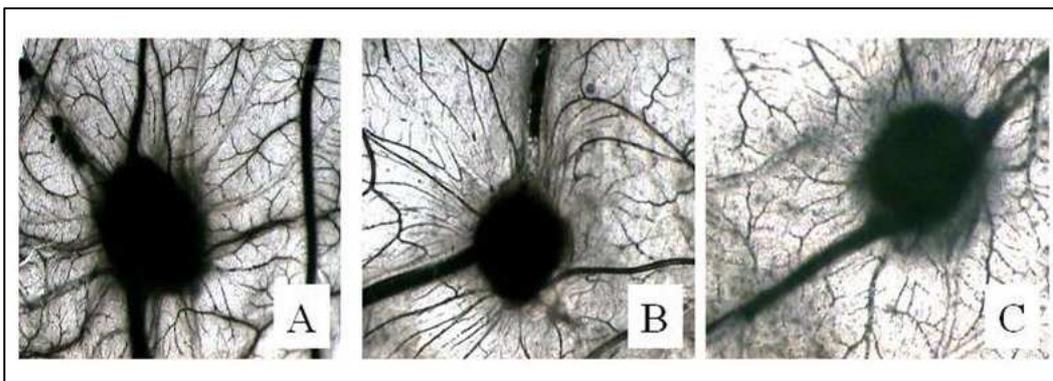
## B. Matrice muscolare acellulare

Come evidenziato in figura 2, due cicli di trattamento detergente-enzimatico erano sufficienti per ottenere una matrice completamente decellularizzata, che manteneva caratteristiche strutturali simili a quelle del tessuto nativo.



**Figura 2:** Sezione trasversale (a, x40) e microscopia elettronica a scansione (b x1200) di matrice acellulare muscolare scheletrica dopo 2 cicli di trattamento detergente-enzimatico

Da esperimenti effettuati presso il laboratorio del prof. Domenico Ribatti della Università di Bari su membrana corioallantoidea di embrione di pollo, è stato evidenziato che le matrici acellulari evocano forti risposte angiogeniche, portando alla formazione di neovasi allantoidei su tale membrana con sviluppo radiale a partire dall'impianto (fig. 3a), in modo paragonabile a quanto indotto dal b-FGF esogeno. Nel caso della spugna imbevuta di PBS, invece, non si rileva nessuna risposta neoangiogenica (fig. 3c).

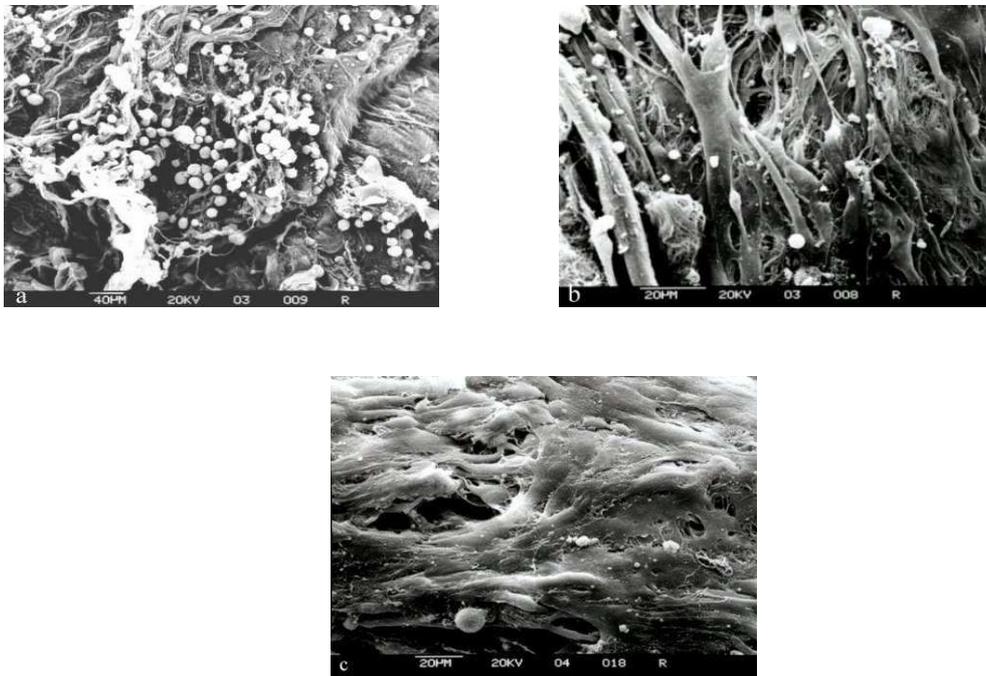


**Figura 3:** Matrice acellulare impiantata su membrana corioallantoidea (CAM) di pollo a 12 giorni d'incubazione (a); gelatina imbevuta di b-FGF (500 ng/embrione) impiantata su CAM di pollo a 12 giorni d'incubazione (b); spugna imbevuta di PBS impiantata su CAM di pollo a 12 giorni d'incubazione (ingrandimento al microscopio ottico x500)

---

### C. Colture di mioblasti su matrice acellulare muscolare *in vitro*

Dopo 24 ore dalla semina di mioblasti ottenuti da cellule satellite di muscolo scheletrico, sulla matrice erano visibili numerose cellule, che però mantenevano una forma rotondeggiante (fig. 4a). A 48 ore, i mioblasti apparivano completamente adesi e coprivano tutta la superficie del supporto. Inoltre, si osservava la formazione di lunghi elementi cellulari plurinucleati (fig. 4b). Le colture si mantenevano integre e vitali anche dopo 7 giorni dalla semina (fig. 4c).



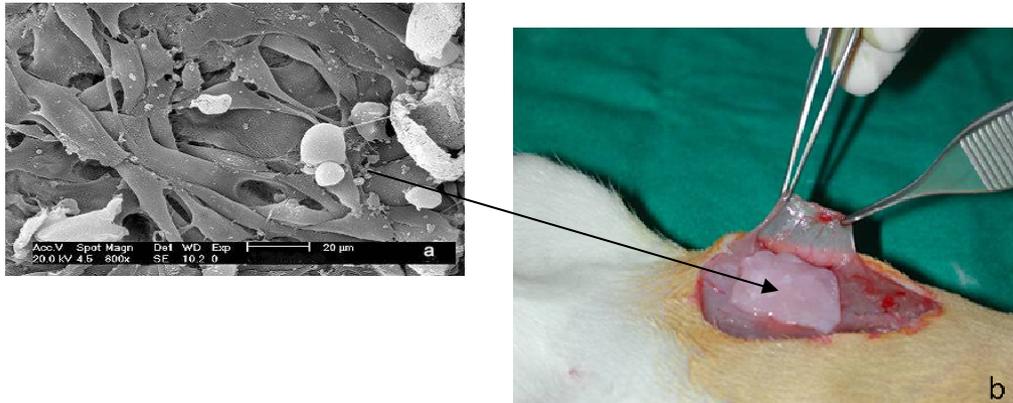
**Figura 4:** Microscopia elettronica a scansione di colture di mioblasti su matrice acellulare muscolare dopo 24 (a x160), 48 (b x600) ore e 7 giorni (c x450) dalla semina

### D. Impianto *in vivo*

I costrutti (fig. 5a), formati da matrice acellulare muscolare omologa e mioblasti prelevati da ratti di sesso maschile, sono stati impiantati in ratti femmina per riparare un difetto a tutto spessore, creato artificialmente nella porzione muscolare dell'addome (fig. 5b). L'impianto è stato eseguito a distanza di 24 ore dalla semina dei mioblasti sulla matrice perché, come risultato dall'analisi al SEM, a questo

---

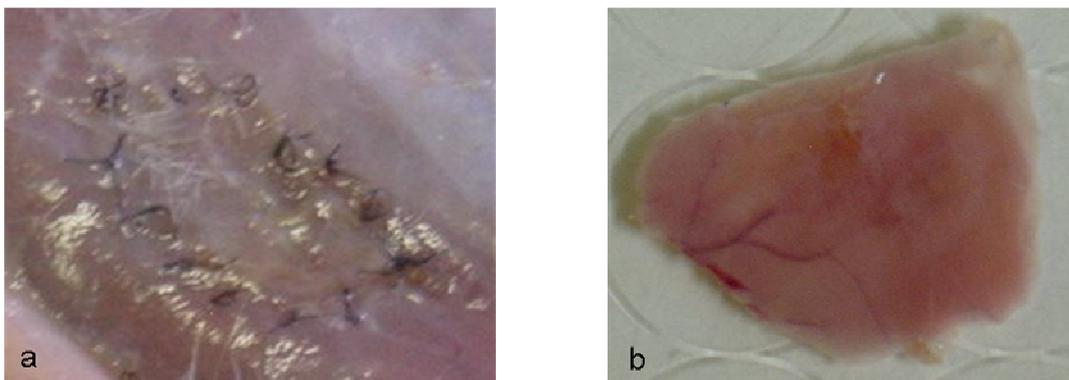
intervallo di tempo le cellule si mantenevano ancora nello stato indifferenziato. Tutti gli animali sono sopravvissuti all'intervento, non hanno contratto infezioni, non hanno manifestato reazioni di rigetto e sono stati sacrificati ai seguenti *time-points* dall'intervento: 1 settimana, 1, 2 e 3 mesi.



**Figura 5:** Costrutti (a) inseriti a livello del difetto della parete addominale (b)

### **E. Analisi macroscopica degli impianti**

Al momento dell'espianto, è stato osservato che tutti gli impianti risultavano conservati rispetto alle dimensioni originali, integrati nel tessuto del ricevente e vascolarizzati (fig. 6).

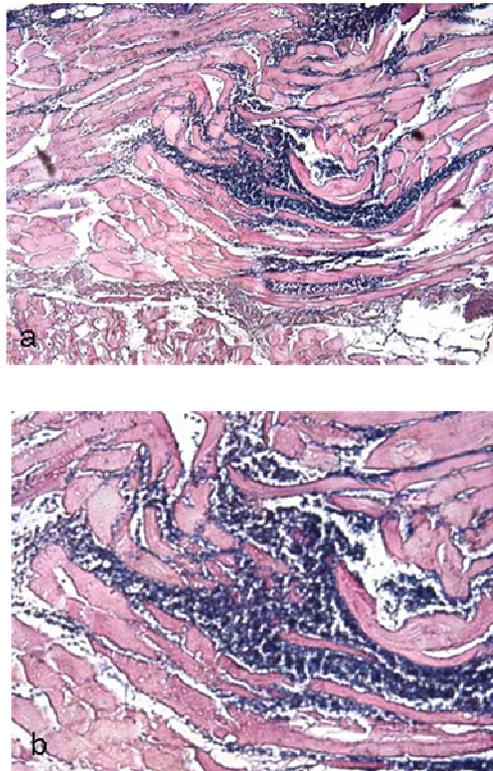


**Figura 6:** Impianto dopo 1 mese dall'intervento chirurgico

---

## F. Analisi istochimica degli impianti

Dopo 1 settimana dall'intervento chirurgico, il *patch* presentava una marcata ipocromia in quanto scarsamente cellularizzato. Era presente una moderata risposta infiammatoria e l'infiltrato costituito da granulociti e macrofagi, risultava localizzato ai bordi dell'impianto ma assente nella parte centrale (fig. 7a). Non è stato riscontrato alcun elemento plurinucleato (fig. 7b).

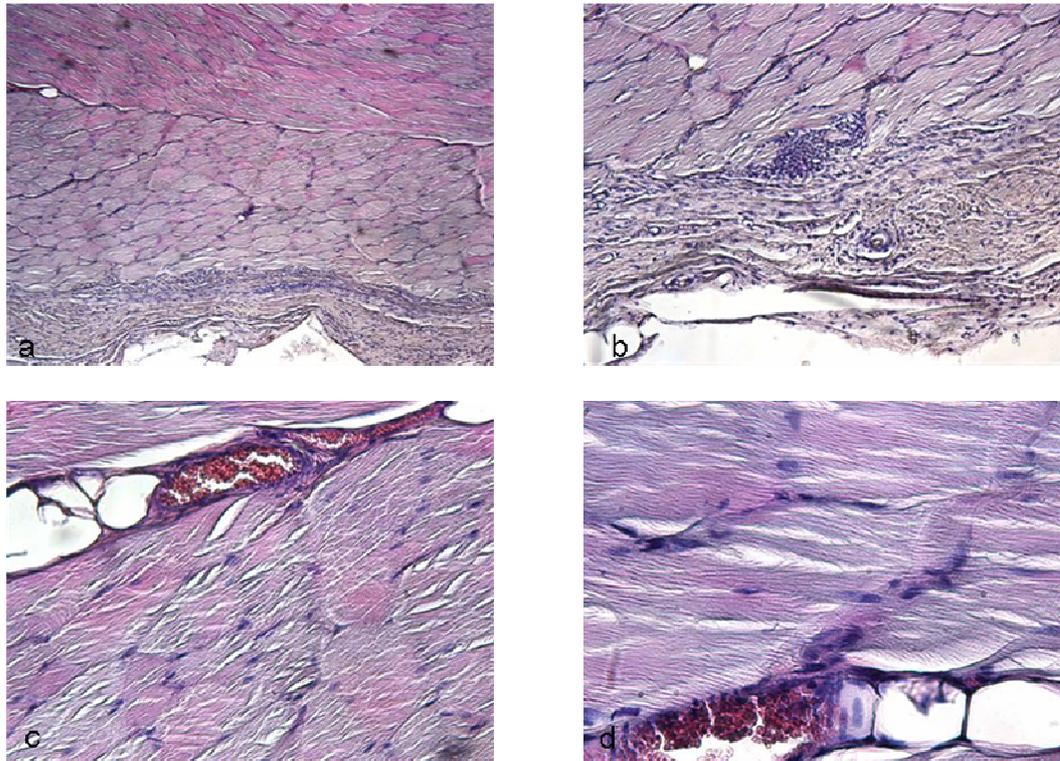


**Figura 7:** Sezioni trasversali (5  $\mu$ m) degli impianti dopo 1 settimana dall'intervento (ingrandimenti: a x50; b x100)

A 1 mese dall'intervento chirurgico, l'infiltrato infiammatorio era scomparso ai bordi dell'impianto e debolmente presente a livello della capsula fibrosa che risultava diminuita in spessore (fig. 8a-b). Si poteva notare la presenza di vascolarizzazione e di alcuni elementi non mononucleati (fig. 8c).

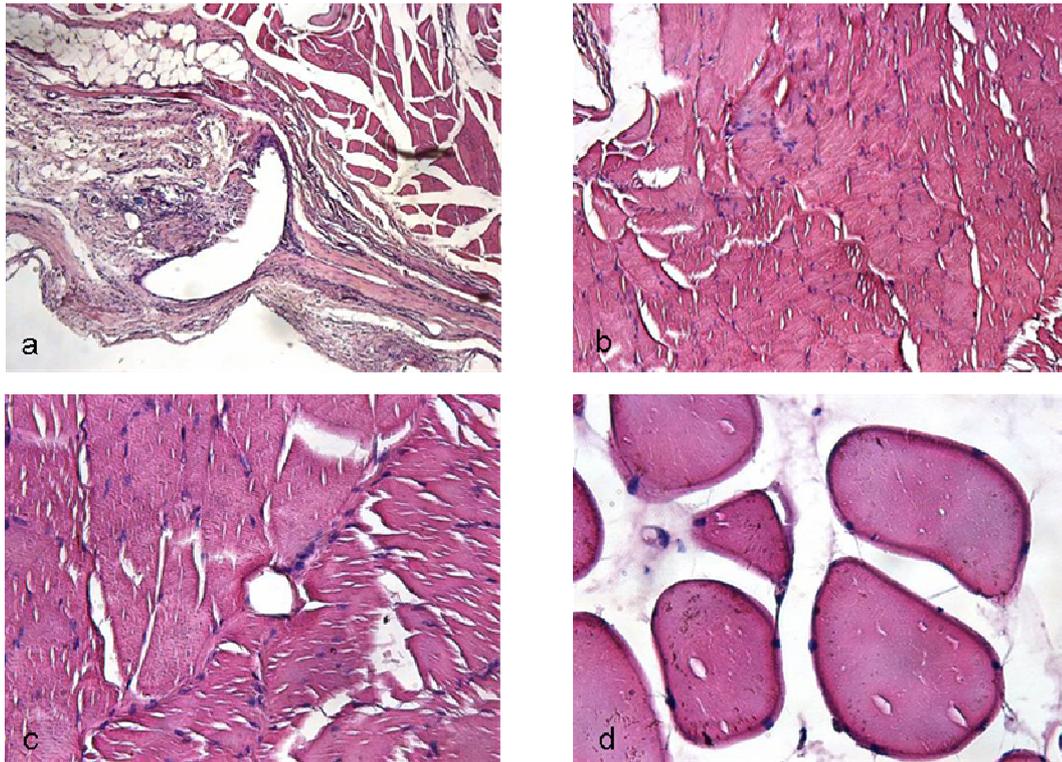
---

All'interno dell'impianto erano presenti numerose cellule, alcune delle quali cominciavano ad organizzarsi per formare elementi plurinucleati. Inoltre, era evidente una migrazione di cellule dai vasi all'interno dell'impianto (fig. 8d).



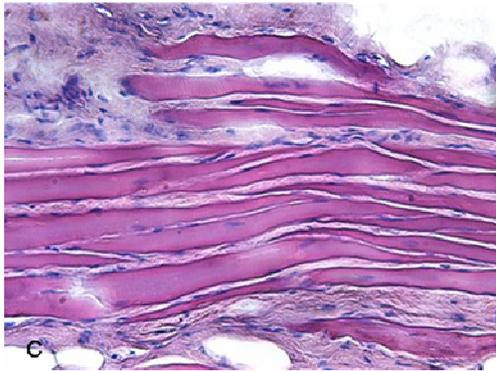
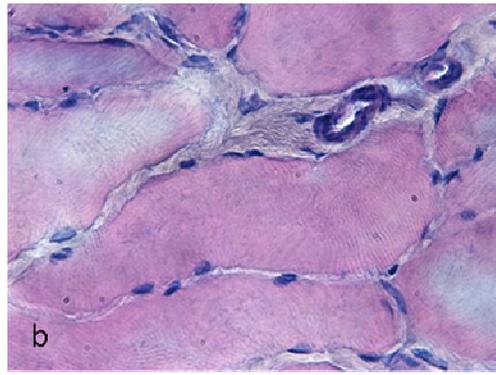
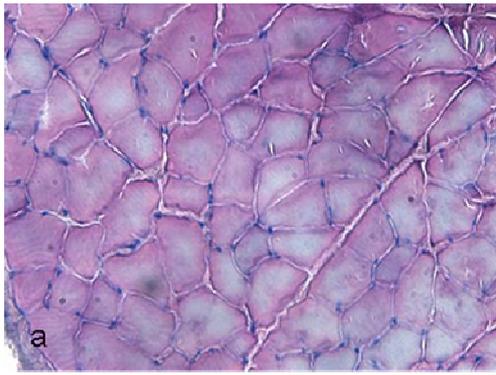
**Figura 8:** Sezioni trasversali (5  $\mu$ m) degli impianti dopo 1 mese dall'intervento  
(ingrandimenti: a x50; b x100; c x200; d x400)

A 2 mesi, permaneva un debolissimo infiltrato infiammatorio solo a livello dei punti di sutura (fig. 9a). All'interno dell'impianto erano presenti ancora molte cellule in via di fusione (fig. 9b-c), ma anche elementi plurinucleati più maturi con nuclei in posizione periferica (fig. 9d). Permaneva una ben visibile migrazione di cellule dai vasi.



**Figura 9:** Sezioni trasversali (5  $\mu$ m) degli impianti a 2 mesi dall'intervento (ingrandimenti: a x50; b x100; c x200; d x400)

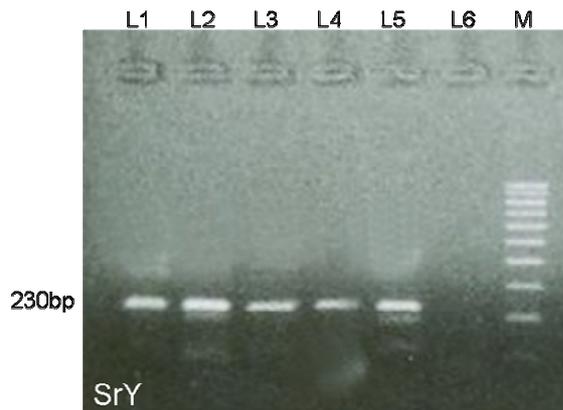
Dopo 3 mesi dall'intervento chirurgico la risposta infiammatoria era regredita del tutto. Nell'impianto, completamente cellulare (fig. 10a), si notava una grande quantità di miotubi ed un aumento del diametro dei vasi sanguigni (fig. 10b). Le fibre muscolari si organizzavano in modo ordinato, assumendo un andamento reciprocamente parallelo (fig. 10c), come accade nella fibra muscolare adulta, e si potevano notare a maggiori ingrandimenti le striature tipiche del muscolo scheletrico (fig. 10d).



**Figura 10:** Sezioni trasversali (5  $\mu\text{m}$ ) degli impianti a 3 mesi dall'intervento (ingrandimenti: a x200; b x200; c x200; d x400)

### G. Presenza del gene SRY

Per valutare la presenza dei mioblasti maschili nei costrutti impiantati, è stato preso in considerazione il cromosoma Y, ed in particolare il gene *Sry* (Yp11.3), che determina lo sviluppo dei testicoli. Muller-Ehmsen *et al.* (2002) hanno dimostrato che la RT-PCR del gene *Sry* è una tecnica sensibile e specifica per identificare il DNA maschile in una popolazione cellulare mista. In tutti i campioni esaminati veniva espresso mRNA di *Sry* (fig. 11).

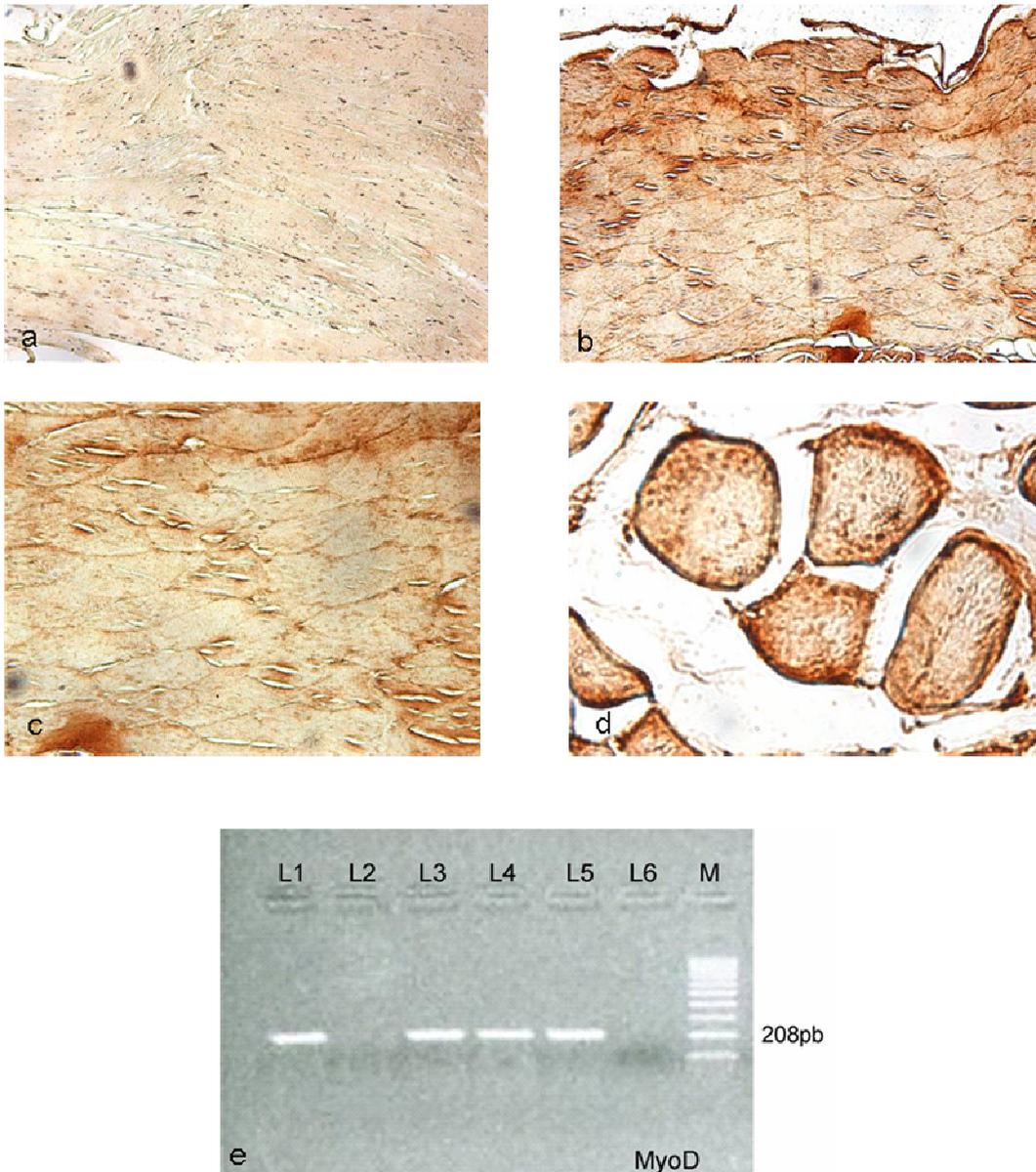


**Figura 11:** Gel di agarosio al 2% con etidio bromuro. cDNA amplificati con primer specifico per SrY ottenuti da RNA da mioblasti di ratto Lewis maschio (L1), da RNA di impianti dopo 1 settimana (L2), 1 mese (L3), 2 mesi (L4) e 3 mesi (L5) dall'intervento. La corsia 6 rappresenta il controllo negativo e la corsia M è stata caricata con un marker per il peso molecolare da 100 bp

### H. Analisi immunoistochimica comparata all'analisi molecolare

Per verificare l'espressione, come proteina e mRNA, di marker muscolari e neuronali, al momento dell'espianto i *patch* sono stati divisi in due parti: una parte è stata inclusa in paraffina per la colorazione immunoistochimica e l'altra è stata conservata azoto liquido per effettuare successivamente l'estrazione dell'RNA e l'analisi molecolare mediante RT-PCR. La reazione di PCR è stata effettuata su campioni di RNA estratti dagli impianti prelevati dopo 1 settimana (L2), 1 mese (L3), 2 mesi (L4) e 3 mesi (L5) dall'intervento chirurgico. Come controllo positivo è stato utilizzato l'RNA ottenuto da una biopsia del muscolo addominale di un ratto Lewis femmina (L1), mentre come controllo negativo è stata utilizzata l'acqua (L6).

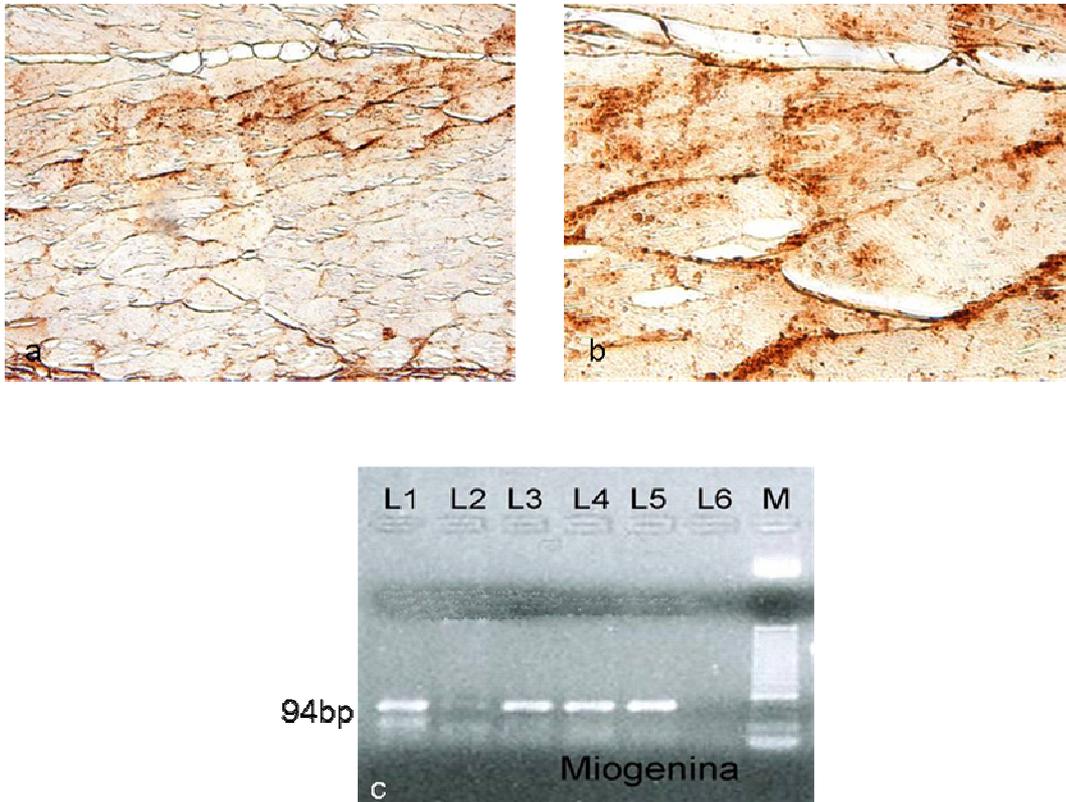
**MyoD.** Tramite l'analisi immunohistochimica è stato evidenziato che il MyoD veniva espresso, come proteina, ai bordi delle miofibre, nelle quali infatti i nuclei erano in periferia. Questo accadeva dal primo mese dopo l'intervento (fig. 12b-d) mentre nella prima settimana (fig. 12a) il MyoD non veniva rilevato. Lo stesso profilo di espressione evidenziato nell'analisi immunohistochimica è stato evidenziato per l'mRNA (fig. 12e).



**Figura 12:** Immunohistochimica con anticorpo anti-MyoD di sezioni trasversali (5  $\mu$ m) degli impianti dopo 1 settimana (a x100), 1 mese (b x100-c x400), 2 mesi (d x400) dall'intervento e relativo gel di agarosio al 2% con etidio bromuro (e). cDNA amplificati con primer specifico per MyoD ottenuti da RNA da muscolo addominale di ratto femmina (L1), da RNA di impianti dopo 1 settimana (L2), 1 mese (L3), 2 mesi (L4) e 3 mesi (L5) dall'intervento. La corsia 6 rappresenta il controllo negativo e la corsia M è stata caricata con un marker per il peso molecolare da 100 bp

---

**Miogenina.** Anche la miogenina veniva espressa, sia come proteina (fig. 13a-b) sia come mRNA (fig. 13c), a partire da 1 mese dall'intervento, mentre era assente dopo 1 settimana.

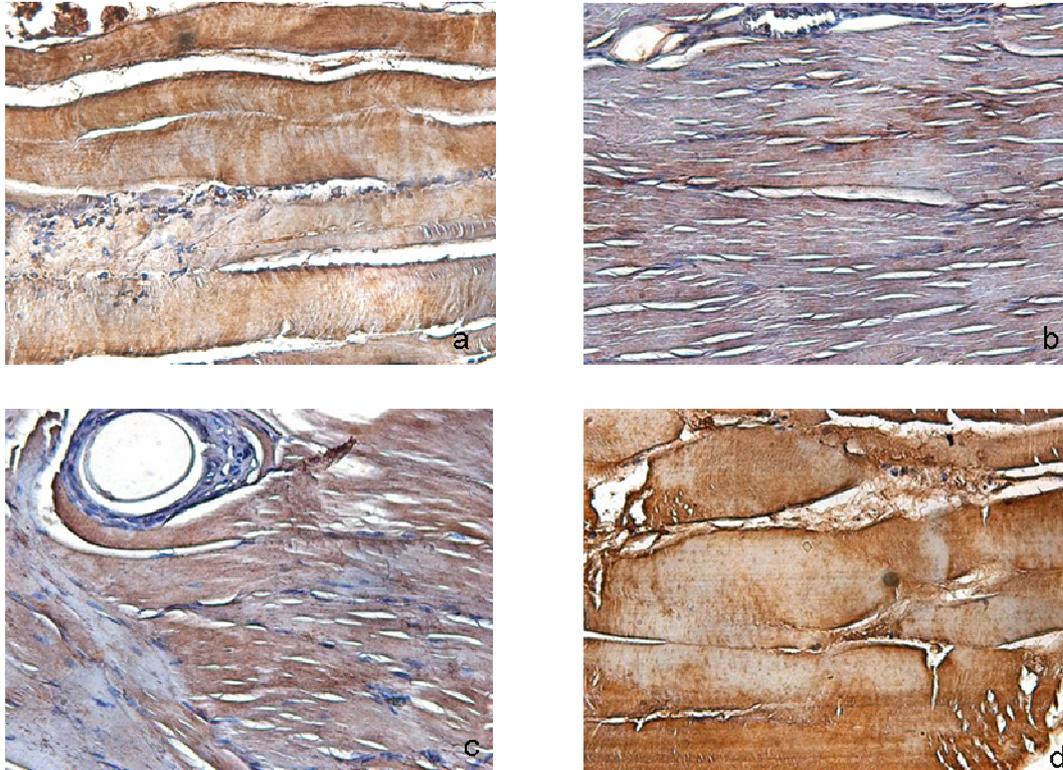


**Figura 13:** Immunohistochimica con anticorpo anti-miogenina di sezioni trasversali (5  $\mu$ m) degli impianti dopo 1 mese dall'intervento (a x100; b x400) e relativo gel di agarosio al 2% con etidio bromuro (c). cDNA amplificati con primer specifico per la miogenina ottenuti da RNA da muscolo addominale di ratto femmina (L1), da RNA di impianti dopo 1 settimana (L2), 1 mese (L3), 2 mesi (L4) e 3 mesi (L5) dall'intervento. La corsia 6 rappresenta il controllo negativo e la corsia M è stata caricata con un marker per il peso molecolare da 25 bp

---

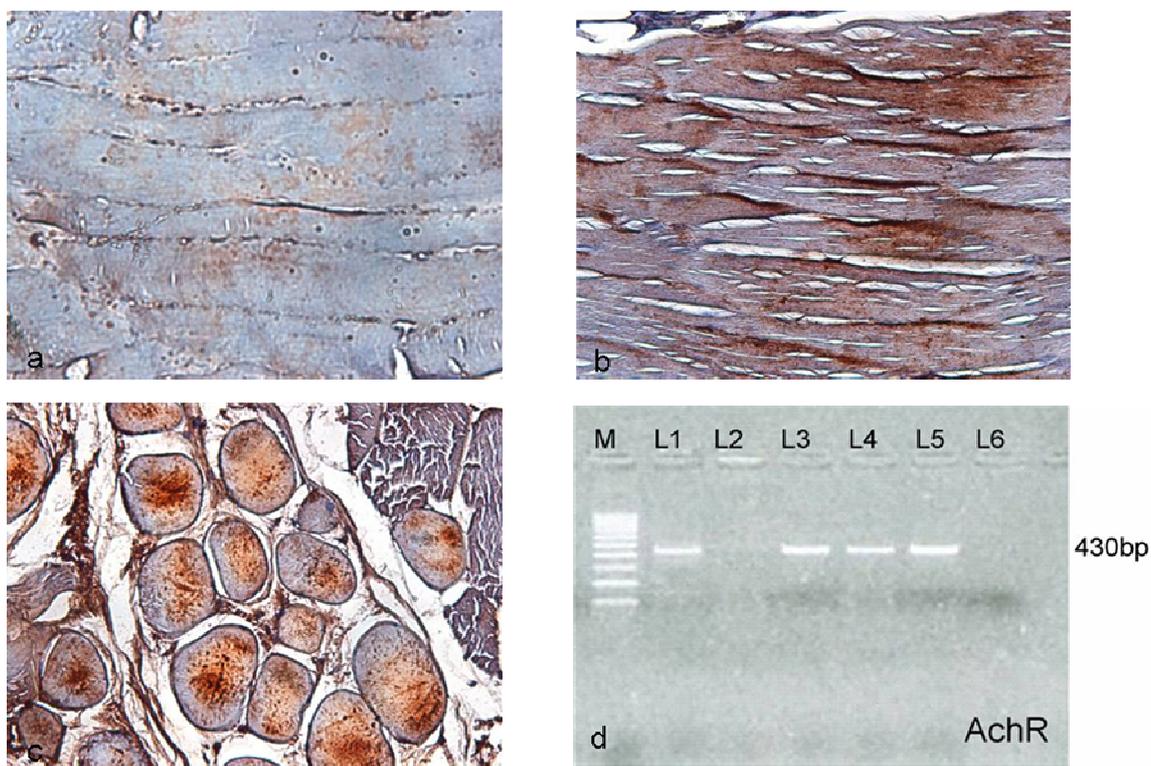
***Tropomiosina sarcomerica.***

Come evidenziato nella figura 14, questa proteina era espressa nei campioni prelevati a partire da 1 settimana dall'intervento.



**Figura 14:** Immunoistochimica con anticorpo anti-tropomiosina sarcomerica con successiva colorazione di contrasto con ematossilina di sezioni trasversali (5  $\mu$ m) degli impianti dopo 1 settimana (a x200), 1 mese (b x200) e 2 mesi (c x200) dall'intervento e della sola matrice acellulare (d x 400)

**Recettore dell'acetilcolina (AChRε).** L'analisi immunohistochimica per AChRε ha evidenziato che questo veniva espresso sulla superficie delle fibre muscolari a partire dal primo mese (fig. 15a-b) successivo all'intervento chirurgico, permanendo fino al terzo mese (fig. 15c). Analogo andamento è stato rilevato anche per quanto riguarda l'espressione di mRNA relativa a tale proteina (fig. 15d).



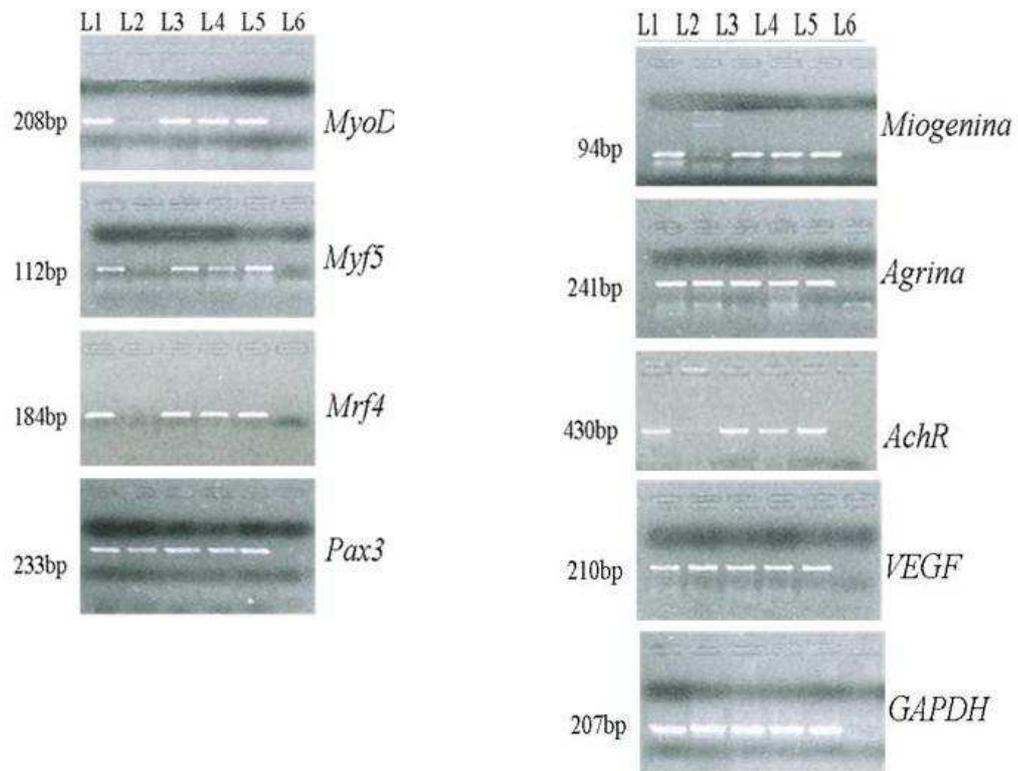
**Figura 15:** Immunohistochimica con anticorpo anti-AChRε di sezioni trasversali (5 μm) degli impianti dopo 1 settimana (a x200), 1 mese (b x200) e 3 mesi (c x400) dall'intervento e relativo gel di agarosio al 2% con etidio bromuro (d). cDNA amplificati con primer specifico per AChRε ottenuti da RNA da muscolo addominale di ratto femmina (L1), da RNA di impianti dopo 1 settimana (L2), 1 mese (L3), 2 mesi (L4) e 3 mesi (L5) dall'intervento. La corsia 6 rappresenta il controllo negativo e la corsia M è stata caricata con un marker per il peso molecolare da 100 bp

Infine con la tecnica di RT-PCR si è verificata l'espressione di altri geni coinvolti nel processo di differenziazione-maturazione muscolare e nervoso (tab. 3), utilizzando come controllo negativo l'acqua per verificare che non fosse presente alcuna contaminazione e come controllo positivo la gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) e la β-actina. Questi ultimi sono geni housekeeping, ovvero costitutivamente espressi ad alti livelli in quasi tutti i tessuti.

**Tabella 3:** Espressione come mRNA di geni coinvolti nel processo di differenziazione-maturazione negli impianti prelevati a 1 settimana, 1, 2 e 3 mesi dall' l'intervento chirurgico

|                  | <b>1 settimana</b> | <b>1 mese</b> | <b>2 mesi</b> | <b>3 mesi</b> |
|------------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>GAPDH</b>     | +                  | +             | +             | +             |
| <b>β-ACTINA</b>  | +                  | +             | +             | +             |
| <b>MyOD</b>      | -                  | +             | +             | +             |
| <b>Mrf4</b>      | -                  | +             | +             | +             |
| <b>MIOGENINA</b> | -                  | +             | +             | +             |
| <b>Myf5</b>      | -                  | +             | +             | +             |
| <b>PAX3</b>      | -                  | +             | +             | +             |
| <b>AGRINA</b>    | +                  | +             | +             | +             |
| <b>AchRε</b>     | -                  | +             | +             | +             |
| <b>VEGF</b>      | +                  | +             | +             | +             |

Oltre ai più importanti marker dal punto di vista della differenziazione muscolare, quali il MyoD e la miogenina, con la tecnica di RT-PCR è stata verificata la presenza di altri fattori coinvolti nel processo di miogenesi (fig. 16). Analogamente a quanto osservato per il MyoD, anche Myf5, Pax3 e Mrf4. venivano espressi a partire da 1 mese dall'intervento chirurgico. Invece agrina e VEGF erano presenti già dopo una settimana.



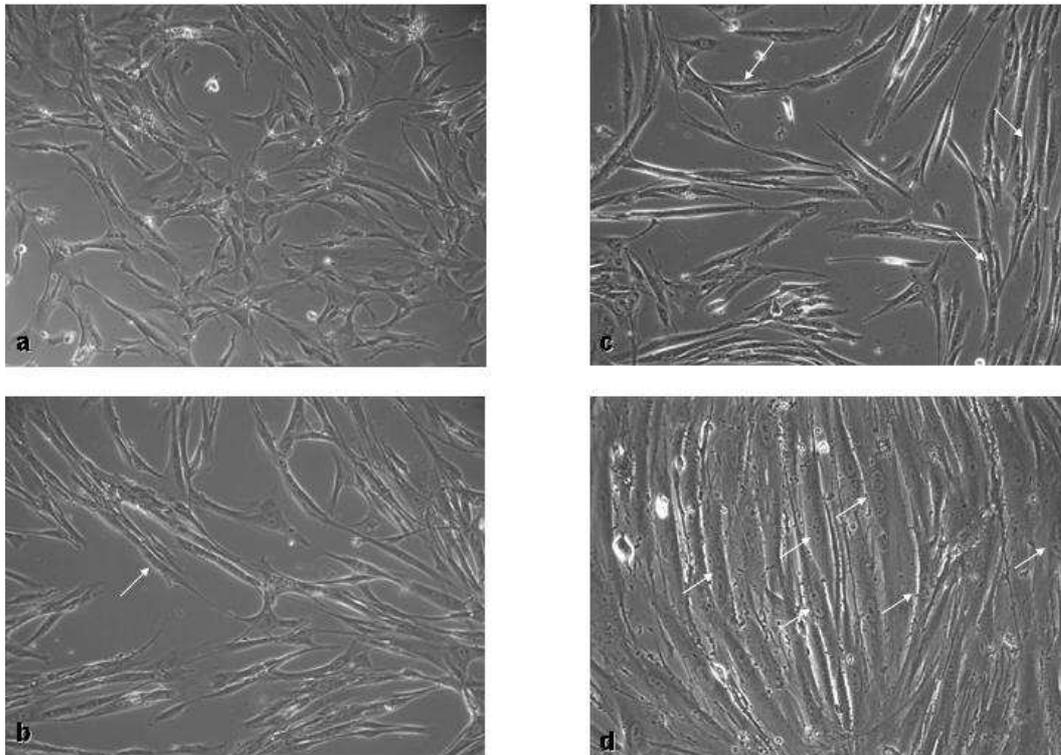
**Figura 16:** gel di agarosio al 2% con etidio bromuro. cDNA, amplificati con primer specifico per MyoD, Myf5, Mrf4, Agrina, VEGF, Miogenina, Pax3, AchR e GAPDH, ottenuti da RNA da muscolo addominale di ratto femmina (L1), da RNA di impianti dopo 1 settimana (L2), 1 mese (L3), 2 mesi (L4) e 3 mesi (L5) dall'intervento. La corsia 6 rappresenta il controllo negativo

## 2. CELLULE MESENCHIMALI DA SANGUE CORDONALE

---

## A. Differenziamento miogenico *in vitro* di MSC

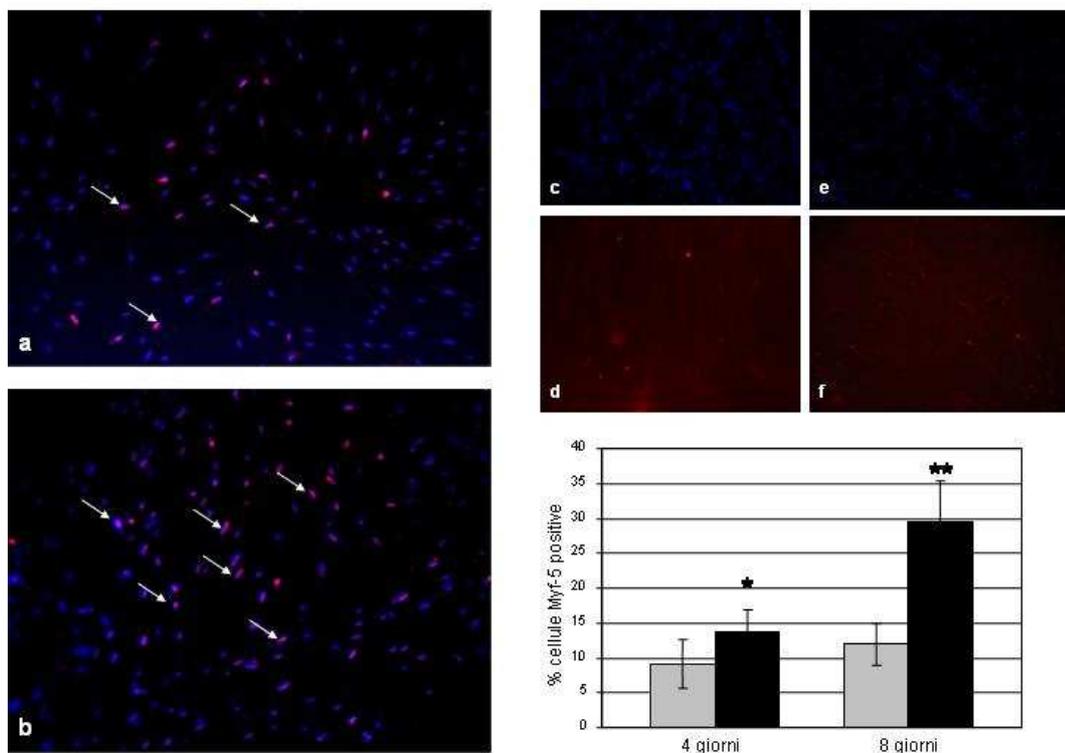
Quando coltivate con terreno proliferativo composto da DMEM-low glucose e 10% di FBS, le MSC derivanti da sangue cordonale [Markov V. et al., 2007] mantenevano una morfologia fibroblastoide (fig. 17a). In presenza di terreno miogenico composto da DMEM-low glucose, 2%HS, 1% AF e 1% CEE, si osservavano, dopo 8 giorni dall'induzione, solo alcune cellule in via di fusione (fig. 17b). Utilizzando, invece, piastre di coltura condizionate con Matrigel, le cellule tendevano a disporsi parallelamente le une alle altre ed era evidente un aumento degli eventi di fusione, segno di un più efficace processo di differenziamento, qui fotografato dopo 4 (fig. 17c) e dopo 8 giorni fig. 17d) di esposizione al terreno miogenico.



**Figura 17: MSC e differenziamento miogenico** (a-d: x 100). MSC sono state coltivate con terreno di differenziamento miogenico su piastre condizionate o meno con Matrigel, per 4 e 8 giorni. (a) controllo con 10% FBS a 8 giorni; (b) terreno miogenico su piastre non condizionate a 8 giorni; (c, d) terreno miogenico su piastre condizionate con Matrigel a 4 e 8 giorni, rispettivamente.

Per confermare l'avvenuto differenziamento, sono state effettuate in parallelo colorazioni immunofluorescenti, utilizzando marker della linea miogenica. A 4 ed a 8 giorni (fig. 18a, 18b), nelle colture coltivate su piastre condizionate con Matrigel

in presenza di terreno differenziativo, aumentava l'espressione di Myf-5, fattore di regolazione miogenica precoce, rispetto a quanto osservato nelle colture mantenute in terreno di proliferazione (fig. 18c, 18d), e in quelle fissate subito dopo la semina (fig. 18e, 18f). Utilizzando il terreno miogenico, la percentuale di MSC (media su dodici campi fotografici) esprimenti il Myf-5 era pari al 9% a 4 giorni, e saliva al 12% a 8 giorni nelle colture mantenute su piastre normali (barre chiare), mentre il condizionamento con Matrigel portava tale percentuale al 14% e al 30%, dopo 4 ed 8 giorni, rispettivamente (barre scure).

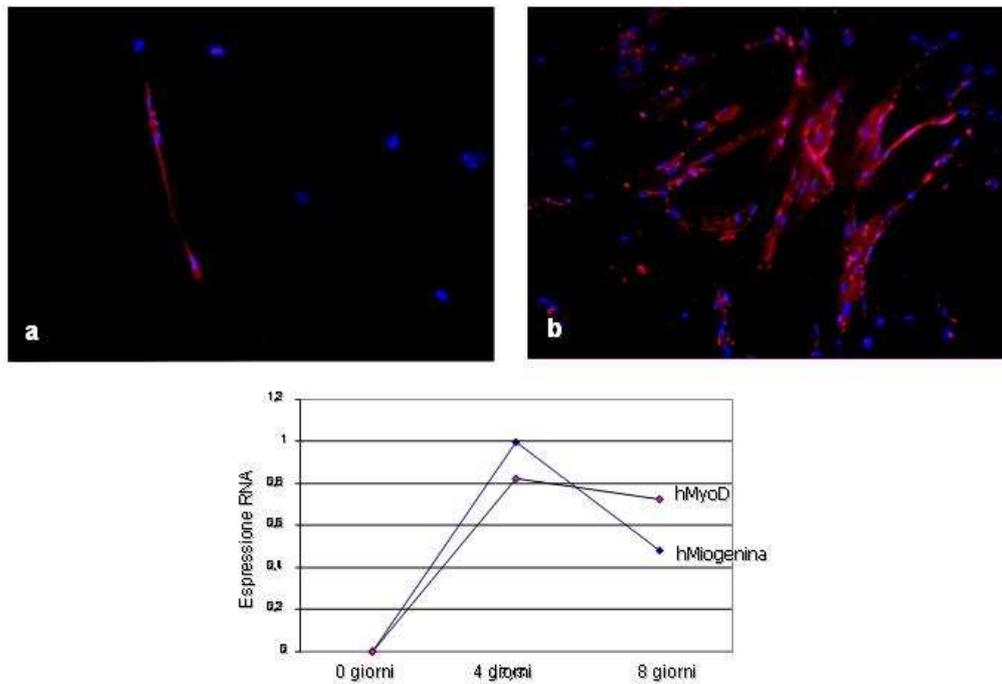


**Figura 18: Espressione del fattore di regolazione miogenica Myf-5 (x 100).** (a, b): differenziamento con terreno miogenico su piastre condizionate con Matrigel dopo 4 e 8 giorni; (c, d): cellule coltivate in terreno proliferativo dopo 8 giorni e (e, f): subito dopo la semina (blu: DAPI, rosso: Myf-5).

Il differenziamento *in vitro* è stato ulteriormente confermato verificando l'espressione di desmina, come proteina (fig. 19a, 4 giorni e 19b, 8 giorni), ed eseguendo un'analisi real time PCR (grafico di fig. 19), utilizzando primer per due sequenze RNA, specifici per specie umana: human-Miogenina e human-MyoD,

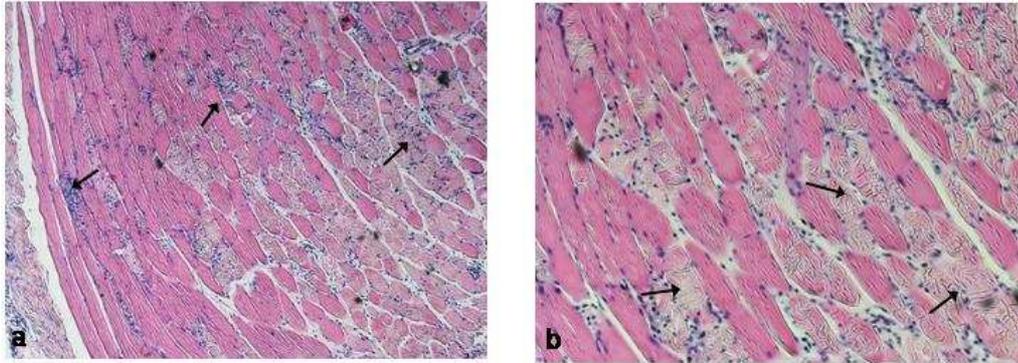
---

normalizzando a 1 il valore più alto ottenuto di espressione genica (calcolata per via indiretta rispetto al gene house-keeping GAPDH). Sin dal 4° giorno l'espressione di marker "human specific" era elevata, per poi diminuire ad 8 giorni.



**Figura 19: Immunofluorescenza per desmina** dopo 4 (a, x200) ed 8 giorni di induzione miogenica (b, x100). **Grafico:** real time PCR per espressione genica di human-MyoD e human-Miogenina.

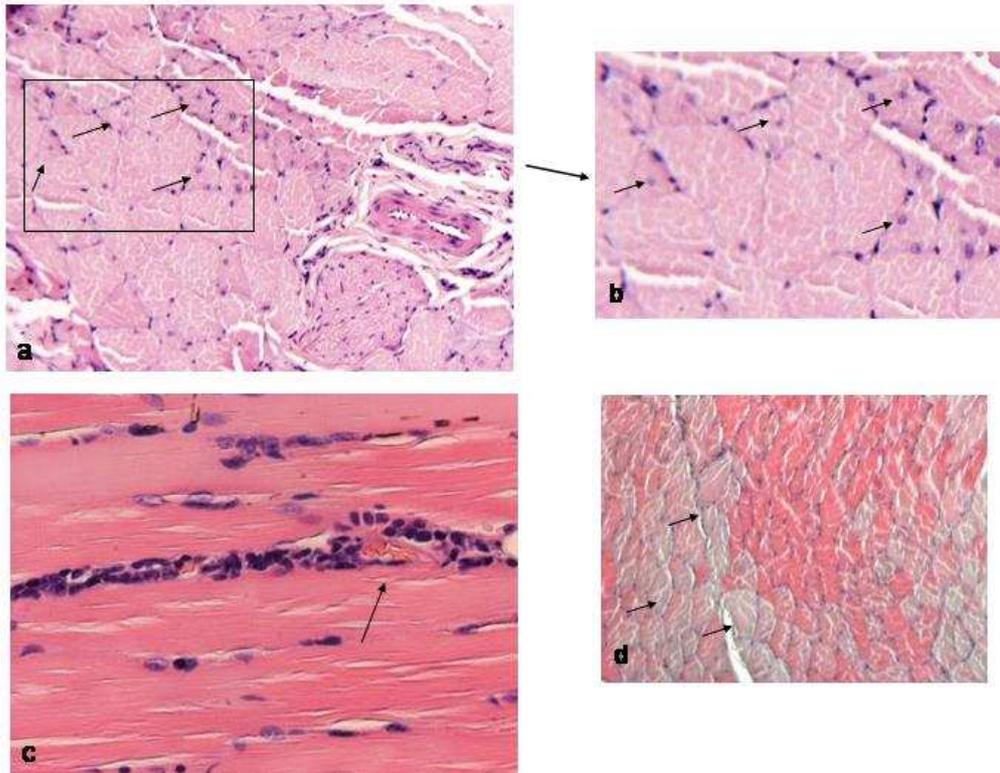
## **B. Valutazione *in vivo* del potenziale differenziativo delle MSC.**



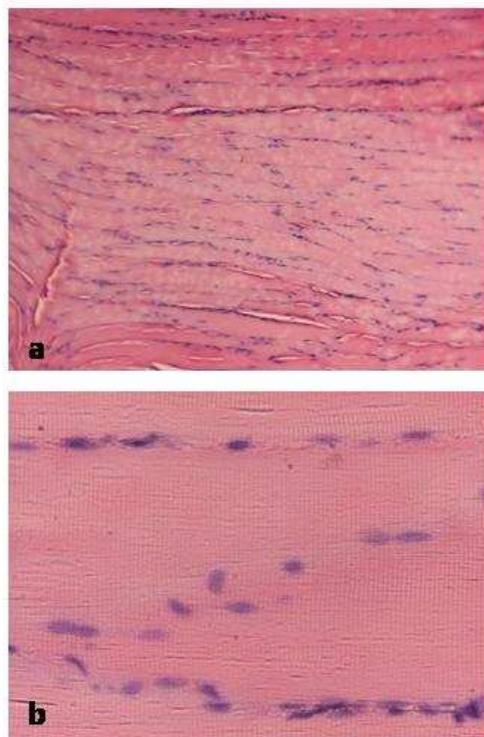
**Figura 20: Necrosi del muscolo tibialis anterior indotta da bupivacaina cloridrato a 48h dall'iniezione.** (a, x50; b, x100)

Dopo 48 ore dall'iniezione di bupivacaina cloridrato, il muscolo tibialis anterior presentava segni di processi degenerativi in atto. Era presente una forte infiltrazione di macrofagi (fig. 20a) ed erano visibili aree di necrosi (fig. 20b).

Dopo 7 giorni dall'iniezione di  $10^6$  MSC intramuscolo, le sezioni istologiche non presentavano segni severi di risposta immunitaria o rigetto, benché ai ratti non fosse stata associata alcuna terapia immunosoppressiva. Si notavano molte fibre muscolari con nuclei in posizione centrale (fig. 21a; sezione trasversale) che indicavano chiaramente uno stato di rigenerazione/riparazione del muscolo danneggiato (fig. 21b). Era presente una lieve risposta infiammatoria, con infiltrazione di macrofagi, prevalentemente in zone perivascolari (fig. 21c). Negli animali di controllo, in cui era stato indotto il danno muscolare con bupivacaina ma che avevano ricevuto una iniezione di sola soluzione fisiologica, permanevano relativamente ampie zone di degenerazione muscolare (fig. 21d).



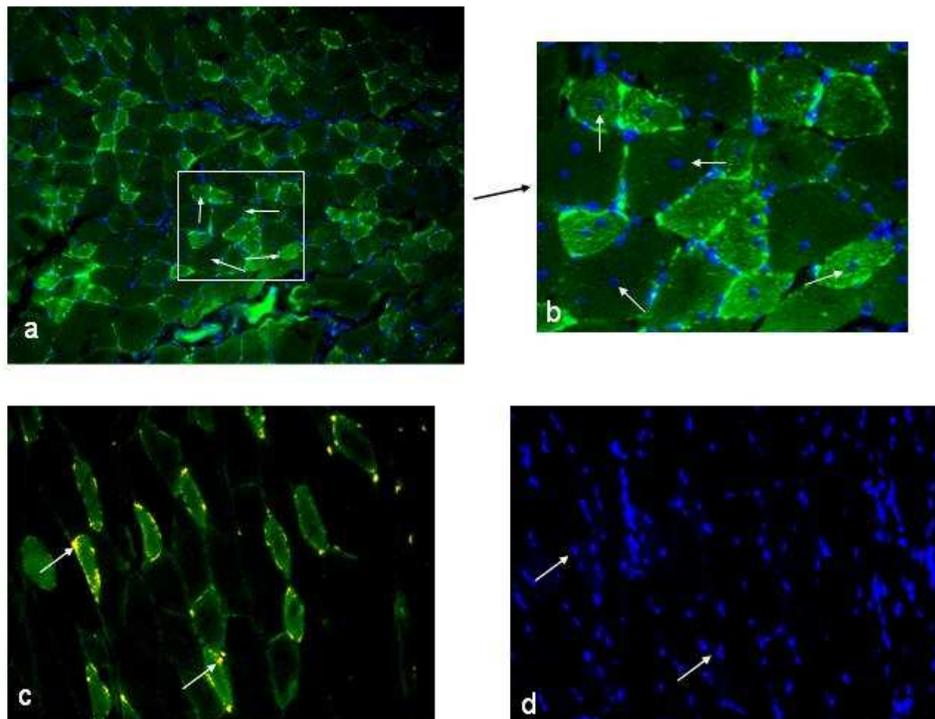
**Figura 21:** Sezioni degli impianti (5  $\mu$ m) a 7 giorni dall'iniezione di MSC (a x100; b part.; c x200) o di soluzione fisiologica (d x50)



**Figura 22:** Sezioni longitudinali degli impianti (5  $\mu$ m) a 14 dall'iniezione di MSC (a x50; b x400).

---

Dopo 14 dall'iniezione di MSC nel muscolo tibialis anterior precedentemente reso necrotico, non si evidenziavano più segni di risposta immunitaria e solo alcune rare zone con lieve risposta infiammatoria. Le sezioni longitudinali degli impianti, mettevano in luce la disposizione longitudinale delle fibre muscolari, con i nuclei in posizione periferica, indicando una chiara rigenerazione muscolare (fig. 22a, 22b).

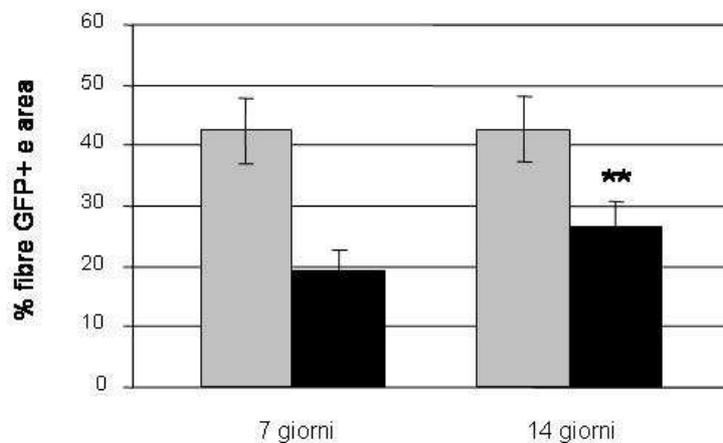


**Figura 23: Sezioni trasversali di muscolo tibialis anterior a 7 giorni dal trapianto di MSC (a, x100; b, particolare). Sezioni trasversali ed analisi immunohistochimica con anticorpo anti-human Nuclei a 14 giorni (c, d x200).**

Analizzando le sezioni trasversali di tibialis anterior, erano visibili numerose fibre muscolari GFP-positive, indicando perciò la presenza al loro interno di cellule MSC umane (GFP-positive) precedentemente iniettate intramuscolo. Tali cellule quindi si erano integrate nel muscolo scheletrico, partecipando alla rigenerazione muscolare, come evidenziato dalla presenza di fibre GFP-positive con nuclei in posizione centrale a 7 giorni dall'iniezione (fig. 23a, 23b). Per confermare con certezza che le fibre muscolari colorate in verde per la presenza di GFP,

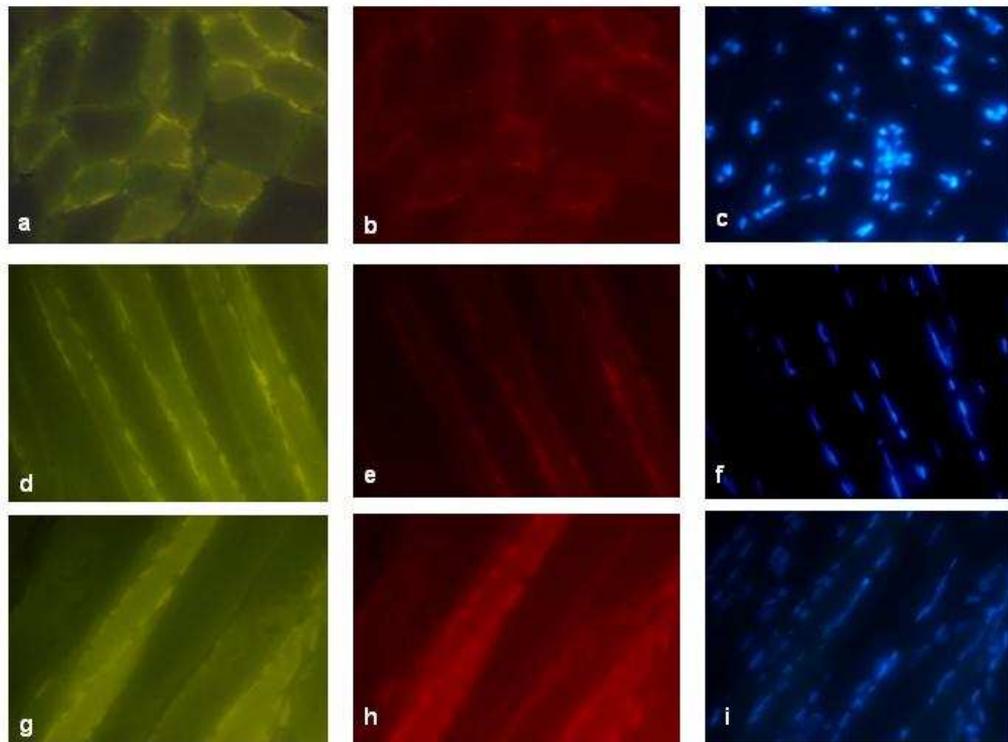
---

contenessero cellule umane, si è eseguita una analisi di immunofluorescenza utilizzando un anticorpo che evidenzia in modo specifico i nuclei di origine umana, l'anti-human Nuclei (Chemicon). Si è riscontrata una corrispondenza tra le fibre contenenti cellule GFP-positive e nuclei anch'essi positivi per l'anticorpo anti-human Nuclei (fig 23c, 23d).



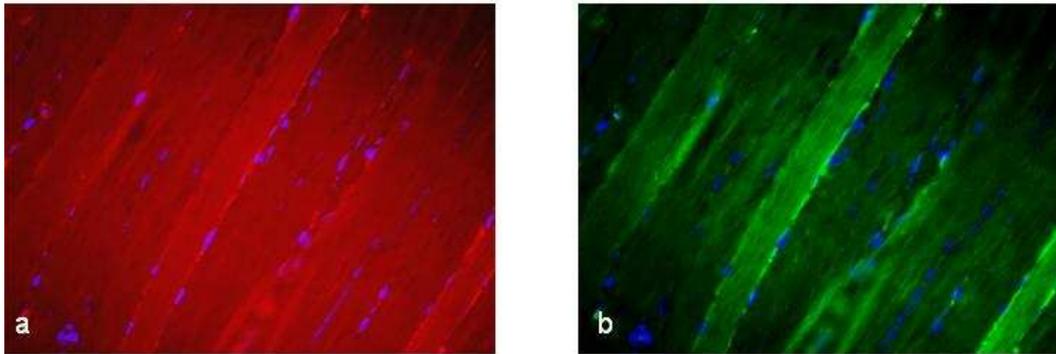
**Figura 24:** valutazione quantitativa (numero ed area) delle fibre muscolari contenenti cellule umane GFP-positive

E' stata poi eseguita una valutazione quantitativa (fig. 24) delle fibre muscolari GFP-positive contenenti cellule di origine umana: sia a 7 che a 14 giorni la percentuale di fibre contenenti MSC era attorno al 40%, mentre l'area totale data dalla somma delle sezioni trasversali di tali fibre era di 20% sul totale dopo 7 giorni, e saliva al 26% dopo 14giorni, indicando un accrescimento delle fibre muscolari in questo arco di tempo.

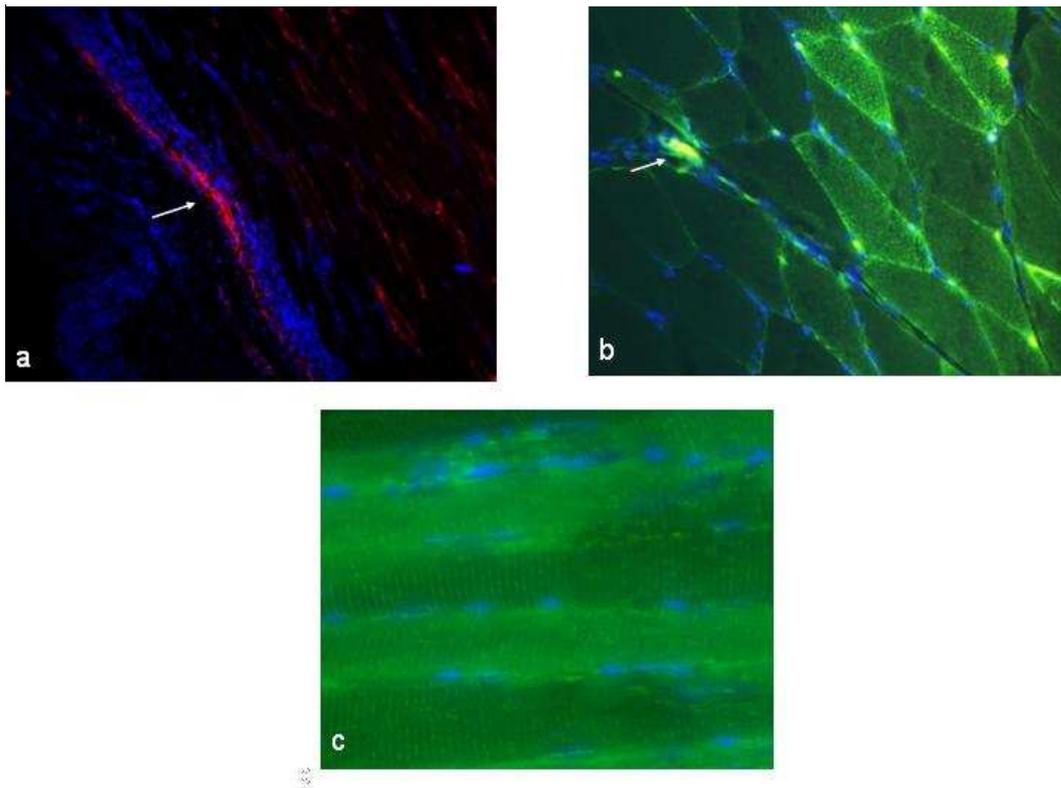


**Figura 25: Immunofluorescenza:** anticorpo anti Myf-5 (a-c) e anti MyoD (d-f) di sezioni trasversali (5  $\mu\text{m}$ ) del tibialis anterior dopo 7 giorni (a,d GFP; b,e anticorpo; c,f DAPI; x400). Anticorpo anti tropomiosina sarcomerica (g-i) dopo 14 giorni (g, GFP; h, anticorpo; i, DAPI; x400).

Sulle sezioni di tibialis anterior sono state inoltre effettuate ulteriori analisi per valutare un eventuale differenziamento *in vivo* delle MSC. A 7 giorni, cellule GFP-positive erano anche positive per i fattori di regolazione miogenica Myf-5 e MyoD (fig. 25a-c, ed 25d-f, rispettivamente) e a 14 giorni risultavano anche positive per la tropomiosina sarcomerica, proteina implicata nel controllo della contrazione muscolare (fig. 25g-i) e per la miosina (fig. 26a, 26b). Infine, sempre a due settimane si notavano (fig. 27c) delle striature, zone chiare e scure, all'interno di fibre muscolari GFP-positive.



**Figura 26: Immunofluorescenza:** anticorpo anti-miosina MF20 (a, con DAPI), GFP-positive (b, con DAPI) di sezioni longitudinali (5  $\mu\text{m}$ ) del tibialis anterior dopo 14 giorni (x400).



**Figura 27: : Immunofluorescenza:** anticorpo anti-human Nuclei (a x100, b x400) in sezioni trasversali (5  $\mu\text{m}$ ) del tibialis anterior a 7 (a) e 14 (b) giorni. Particolare di sezione longitudinale di alcune fibre GFP-positive a 14 giorni.

---

In alcune sezioni sono stati anche riscontrati nuclei di cellule umane (fig. 27a, 27b), che non si erano integrate con le fibre muscolari dell'animale, ma erano localizzate a livello interstiziale (fig. 27b), oppure erano ammassate in grande numero in zone periferiche della sezione, in aree caratterizzate da un consistente infiltrato infiammatorio (fig. 27a).

---

## DISCUSSIONE

Numerose patologie e/o difetti fisici sono caratterizzati dalla perdita di cellule specializzate all'interno di organi o di tessuti e conducono a disfunzioni di vario tipo. I danni tessutali si traducono in alti costi, in termini di assistenza medica, mancata produttività, diminuzione della qualità di vita e morte prematura. Appare quindi di fondamentale importanza progettare e realizzare nuovi trattamenti allo scopo non solo di prevenire e curare la patologia responsabile, ma anche di ripristinare la struttura e la funzionalità dei tessuti o degli organi danneggiati.

L'ingegneria tessutale del muscolo scheletrico trova numerose applicazioni nel campo delle patologie congenite o acquisite. Un esempio è rappresentato dal trattamento dell'onfalocele e della gastroschisi. Questi sono stati patologici originatisi durante la vita uterina e caratterizzati da perdita muscolare, che può condurre non solo ad un deficit funzionale, ma anche a deformazioni strutturali. La perdita di tessuto muscolare può avvenire anche in seguito ad altre situazioni cliniche comuni come miopatie, lesioni di tipo traumatico ed asportazioni per tumore che richiedono, quindi, una successiva ricostruzione chirurgica.

Nella costruzione *in vitro* di un tessuto ingegnerizzato, due sono le componenti di fondamentale importanza: le cellule ed il supporto. Negli ultimi anni, nella terapia di patologie muscoloscheletriche, l'utilizzo di cellule staminali muscolari in trapianti o per il trasferimento genico si è rivelato un campo di ricerca interessante e promettente [Wu *et al.*, 2003]. L'uso di cellule staminali potrebbe risolvere il problema connesso alla massiva morte cellulare associata al trapianto, in quanto molte evidenze [Stocum, 2001; Report NHI, 2001] indicano che tali cellule sono multipotenti e altamente proliferative.

Il riparo di estesi difetti muscolari richiede però sostituti tessutali di notevole dimensione. A questo proposito risulta essere essenziale per la costruzione *in vitro* di un tessuto ingegnerizzato, l'identificazione del supporto ottimale che abbia caratteristiche simili a quelle dell'ambiente esistente *in vivo*. Il supporto infatti deve avere una certa porosità in modo da consentire la crescita cellulare ed il trasporto delle sostanze nutrienti, deve inoltre essere biocompatibile,

---

biodegradabile e quindi non solo fornire una struttura tridimensionale, ma garantire anche l'adesione e la crescita cellulare.

La ricerca attualmente si è orientata verso la messa a punto di materiali protesici derivati da matrice extracellulare bioingegnerizzata che possa funzionare come una guida per la crescita ed il rimodellamento tessutale anche a lungo termine. Infatti, la matrice extracellulare gioca un ruolo attivo e complesso nella regolazione del comportamento cellulare, influenzando l'adesione, la forma, la migrazione, la proliferazione ed il metabolismo delle cellule [Badylak, 2007].

In un precedente lavoro [De Coppi et al., 2006] si è dimostrato, in ratti Lewis singenici, che sostituti muscolari costituiti da mioblasti e matrice muscolare acellulare possono fungere da valido approccio per il trattamento a lungo termine dei difetti della parete addominale (gastroschisi). Tali sostituti divengono *in vivo* strutture dotate di innervazione, contengono fibre muscolari scheletriche e mantengono nell'ospite la loro integrità strutturale per lungo tempo, senza andare incontro ad atrofia né ad altri segni di degenerazione.

Partendo da questi risultati incoraggianti, in questa tesi si è cercato di caratterizzare il processo rigenerativo che avviene *in vivo*, anche a tempi brevi, nel sostituto muscolare. A tal fine sono stati ottenuti sostituti muscolari costituiti da matrice acellulare omologa, ricavata da ratti Lewis femmine, su cui sono stati seminati mioblasti prelevati da ratto Lewis di sesso maschile. Successivamente, questi *patch* protesici sono stati utilizzati per riparare difetti di circa  $2,5 \times 2,5$  cm, creati chirurgicamente a livello della muscolatura della parete addominale anteriore di ratti Lewis di sesso femminile, sfruttando il fatto che in tale modello animale è possibile trapiantare cellule da un animale all'altro senza alcun problema di rigetto. L'isolamento di singole fibre muscolari, tramite digestione enzimatica, ha permesso di ottenere colture derivate da cellule satellite contenenti solo mioblasti in grado di proliferare, differenziarsi e dare origine a miotubi. Le cellule infatti erano caratterizzate da un'elevata capacità proliferativa, permettendo di ottenere il numero ideale di mioblasti (circa  $10^6$  cell/cm<sup>2</sup>) per la costruzione del sostituto muscolare dopo solamente una settimana dall'estrazione. L'elevata purezza delle colture ha permesso di accorciare il tempo di coltivazione *in vitro* e di mantenere di conseguenza il potenziale miogenico delle cellule. E' noto infatti che aumentando

---

il tempo di coltura e il numero di passaggi, le cellule tendono a perdere le caratteristiche del tessuto di origine [Sudo et al., 1983].

Per ottenere un supporto che presentasse caratteristiche morfologiche e meccaniche simili a quelle del tessuto nativo, è stata usata matrice muscolare acellulare omologa. Il metodo detergente-enzimatico, utilizzato per ottenere la matrice acellulare, la rende priva di elementi cellulari, ma non ne altera la struttura o il complesso della membrana basale [Livesey et al., 1995]. Questo dovrebbe impedire la degradazione della matrice, dal momento che matrici danneggiate vengono velocemente distrutte da risposte infiammatorie acute, quando impiantate *in vivo* [Burge e Dawber, 1990]. Nel tessuto trattato non si rilevava infatti la presenza di nuclei ed il tessuto acellulare presentava una struttura meno compatta rispetto a quella originale. Le matrici acellulari sono attualmente utilizzate anche in xenotrapianti [Roeder et al., 1999], in quanto non inducono fenomeni di rigetto. Infatti, Allman et al. (2001) hanno riportato che le risposte immunitarie a tali impianti non coinvolgono la fissazione del complemento o il rigetto dell'impianto, ma piuttosto inducono tolleranza.

In un recente lavoro [De Coppi et al., 2006] l'analisi immunohistochimica ha rivelato che la matrice acellulare muscolare, al pari del tessuto nativo, contiene due noti fattori angiogenici, il b-FGF (fattore basico di crescita dei fibroblasti) e il TGF- $\beta$ 1. Il b-FGF è una molecola segnale extracellulare, di natura polipeptidica, secreta dai fibroblasti, che legandosi a recettori tirosin-chinasici, presenti sulla membrana cellulare, stimola la crescita cellulare e l'angiogenesi [Takehara, 2000; Badylak, 2007]. Anche il TGF- $\beta$ 1 è un fattore di crescita polipeptidico, che regola la proliferazione, la migrazione, la differenziazione cellulare e lo sviluppo embrionale [Piek et al., 1999]. E' altresì coinvolto nello sviluppo del sistema vascolare: esso induce la differenziazione di precursori in periciti e cellule muscolari lisce, inibisce la proliferazione delle cellule endoteliali e stimola la deposizione di matrice extracellulare, controllando in tal modo le fasi finali dell'angiogenesi [Goumans et al., 2003]. La presenza di questi due fattori all'interno della matrice muscolare acellulare rappresenta una caratteristica vantaggiosa, in quanto potrebbe favorire *in vivo* una rapida formazione di neo-vasi, necessaria per la sopravvivenza delle cellule seminate sul supporto. Inoltre, entrambi i fattori, b-FGF e TGF- $\beta$ 1, sono mitogenici per le cellule progenitrici

---

delle fibre muscolari: in particolare il TGF- $\beta$ 1 promuove anche la chemotassi delle cellule satellite muscolari [Bischoff *et al.*, 1997]. Queste proprietà potrebbero favorire *in vivo* il reclutamento di elementi cellulari dal muscolo dell'organismo ricevente. Le evidenze raccolte con i saggi sulla CAM, indicano che la matrice acellulare è in grado di evocare *in vivo* forti risposte angiogeniche, suggerendo che anche l'attività delle due citochine viene mantenuta all'interno della matrice.

L'osservazione al microscopio ottico a scansione (SEM), effettuata su colture di mioblasti su matrice acellulare, ha dimostrato che quest'ultima permette la miogenesi scheletrica. Dopo alcuni giorni di coltura, le cellule aderivano, proliferavano e si differenziavano in miotubi. Lo studio *in vitro* ha confermato che la matrice acellulare muscolare è in grado di favorire l'adesione e la differenziazione cellulare, come già dimostrato da Marzaro *et al.* (2002).

Gli impianti sono stati caratterizzati tramite analisi macroscopica e istologica, valutando l'espressione dei geni coinvolti nella rigenerazione del muscolo scheletrico e delle fibre nervose mediante procedure immunohistochimiche e di analisi molecolare.

Al momento dell'espanto, è stato osservato che tutti gli impianti risultavano conservati rispetto alle dimensioni originali, integrati nel tessuto del ricevente e vascolarizzati.

L'analisi degli impianti, effettuata tramite colorazione istochimica, ha evidenziato un progressivo rimodellamento degli impianti nell'intervallo di tempo considerato. Già a partire dal primo mese apparivano ripopolati da alcuni elementi plurinucleati che a 3 mesi si organizzavano in fibre muscolari organizzate con un andamento reciprocamente parallelo. All'interno del sostituto muscolare si osservava inoltre, a partire dal primo mese, una fitta rete capillare essenziale per l'integrazione e la sopravvivenza delle cellule impiantate. La risposta infiammatoria era di modesta entità e confinata ai bordi dell'impianto ad una settimana dall'intervento chirurgico e regrediva completamente dopo 3 mesi.

I mioblasti impiantati probabilmente partecipavano al processo di rimodellamento del tessuto, in quanto come evidenziato dalla RT-PCR per il gene *Sry*, permanevano all'interno dell'impianto fino a 3 mesi dall'intervento chirurgico. Da sottolineare, inoltre, che, a partire da un mese, era evidente, nella parte centrale dell'impianto, una migrazione di cellule dai vasi all'interno dell'impianto stesso.

---

Escludendo l'ipotesi che tali cellule fossero appartenenti alla serie bianca del sangue, in quanto, come sottolineato precedentemente, la risposta infiammatoria era quasi completamente regredita, questa osservazione suggerisce che al processo rigenerativo possano partecipare anche precursori, probabilmente di origine midollare, richiamati nel sito della lesione.

Tramite l'analisi immunohistochimica e molecolare è stato evidenziato che nel costrutto rimodellato *in vivo*, erano presenti fibre muscolari scheletriche ed innervazione.

In particolare, è stata evidenziata la presenza contemporanea, a partire da un mese, di marcatori muscolari caratteristici sia delle prime fasi differenziative che di quelle successive, indicando l'esistenza di progenitori attivati indirizzati verso la linea miogenica e di elementi cellulari a stadio di maturazione avanzato. Queste evidenze suggeriscono che all'interno degli impianti il progressivo rimodellamento della componente muscolare non appare totalmente concluso a 3 mesi dall'intervento.

*MyoD*, *Myf5* e *Pax3* venivano espressi a partire da 1 mese dall'intervento chirurgico. Essendo dei marker precoci di differenziamento miogenico e venendo espressi dai mioblasti in coltura, si suppone che la loro assenza alla prima settimana sia ascrivibile alla sensibilità dei metodi utilizzati, probabilmente insufficienti a rilevare questi marcatori in un numero di mioblasti esogeni limitato.

Il fattore nucleare di trascrizione miogenica *MyoD* è una fosfoproteina nucleare, i cui livelli fluttuano durante il ciclo cellulare, in quanto risulta espressa prevalentemente nelle cellule satellite attivate [Yablonka-Reuveni *et al.*, 1994]. I livelli più alti si riscontrano quando le cellule stanno iniziando a differenziarsi, confermando la capacità di questo fattore di indurre la differenziazione miogenica attraverso l'espressione di geni muscolo-specifici come la miogenina, la catena pesante della miosina (MyHC) ed alcune subunità del recettore dell'acetilcolina. L'espressione di *MyoD* dal 1° al 3° mese successivo all'intervento suggerisce che, in questo intervallo di tempo, il processo differenziativo-rigenerativo all'interno del materiale protesico continui con attivazione di cellule mononucleate verso la linea miogenica.

*Myf-5* è il fattore di trascrizione muscolo-specifico noto da più tempo, la cui espressione determina la differenziazione delle cellule satelliti nella linea mioblastica. Esso, inoltre, scompare rapidamente dopo che le cellule hanno iniziato

---

il processo differenziativo, andando incontro ad una degradazione della propria forma fosforilata, in sincronia con il ciclo mitotico [Lindon *et al.*, 1998]. Questo marker muscolare è quindi coinvolto, come il *MyoD*, nel determinare il fato della cellula miogenica, oltre che nella formazione di mioblasti durante l'embriogenesi.

*Pax 3* è un gene regolatore trascrizionale "paired box", appartenente ad una famiglia di geni che giocano un ruolo fondamentale nella formazione dei tessuti, in particolare quello muscolare, durante lo sviluppo embrionale. Inoltre risulta essere importante per mantenere le normali funzioni di determinate cellule anche dopo la nascita. Questi geni vengono definiti regolatori trascrizionali grazie al fatto che portano alla produzione di proteine che si attaccano a specifiche aree di DNA, controllando l'attività di particolari geni. L'alterazione nell'attività del gene che codifica per *Pax 3*, per esempio, è stata correlata con alcuni casi di cancro al tessuto muscolare (rhabdomyosarcoma) che colpisce soprattutto adolescenti e giovani adulti [Linardic *et al.*, 2007].

L'espressione di *Mrf4*, *miogenina* e *tropomiosina sarcomerica*, a partire da un mese dall'intervento, concorda con le osservazioni istologiche relative a questo time point e che evidenziavano la formazione di elementi plurinucleati.

*Mrf4* sembra coinvolto, infatti, nel differenziamento muscolare [Smith *et al.*, 1993], in particolare nello sviluppo dei miotubi durante la fase di fusione [Hawke & Garry, 2001]. Analogamente a *Myf5*, *Mrf4* appartiene alla famiglia delle proteine "basic helix-loop-helix (bHLH)", ovvero fattori di regolazione miogenica (MRF) che sono in grado di guidare il processo di differenziazione miogenica. Questi infatti agiscono formando complessi tetramericici che comprendono altre proteine appartenenti alla famiglia bHLH, in grado di legare il DNA a livello di una determinata sequenza. In questo modo viene promossa la trascrizione di geni che codificano per marker tipici che segnalano il differenziamento della linea muscolare scheletrica [Lassar *et al.*, 1991]. La *miogenina*, come il *MyoD*, *Mrf4* e *Myf5*, è un fattore di trascrizione muscolo-specifico che appartiene alla famiglia delle proteine "basic helix-loop-helix (bHLH)", conosciute come MRF, in quanto sono in grado di guidare il processo di differenziazione miogenica quando sono espresse in differenti tipi cellulari. In particolare, la *miogenina* è coinvolta nel differenziamento muscolare [Smith *et al.*, 1993] ed è proprio per questo motivo che viene espressa in un secondo momento, durante la fase di fusione dei mioblasti

---

[Hawke & Garry, 2001]. La *tropomiosina sarcomerica* è una proteina filamentosa (70.000 Da), composta da 2 subunità ripiegate ad  $\alpha$ -elica, costituente i microfilamenti nelle cellule non-muscolari e i filamenti sottili in quelle muscolari. E' implicata infatti nel controllo della contrazione muscolare prevenendo, in combinazione con il complesso della troponina, il legame dell'actina con la miosina e quindi la contrazione [Pasqualino e Panattoni, 2002]. Sebbene questo marker citoplasmatico sia caratteristico di uno stadio avanzato di maturazione cellulare, era espresso anche nei campioni prelevati dopo 1 settimana dall'intervento, in quanto la proteina permaneva nella matrice acellulare in seguito al trattamento detergente-enzimatico.

All'interno degli impianti avveniva anche una rigenerazione della componente nervosa, in quanto venivano espressi marker neuronali, quali agrina e AchR $\epsilon$ , recettore nicotinico dell'acetilcolina. A partire dalla prima settimana era presente l'agrina, proteoglicano eparansolfato di 400 KDa che viene espresso dai motoneuroni e concentrato a livello della lamina basale sinaptica. Ha un ruolo critico nell'indurre la differenziazione postsinaptica essendo il principale fattore trofico chimico anterogrado coinvolto nella sinaptogenesi neuromuscolare. Tramite l'agrina i motoneuroni determinano l'accumulo subsinaptico di recettori per l'acetilcolina (AChR) sia attraverso l'aggregazione di recettori preesistenti, che nuova sintesi [Bach *et al.*, 2003]. Successivamente, a partire da 1 mese dall'intervento chirurgico, veniva espresso anche AchR $\epsilon$ , canale ionico a controllo di trasmettitore, permeabile agli ioni sodio, potassio, cloro e che media la trasmissione sinaptica a livello della giunzione neuromuscolare. Il legame dell'acetilcolina con il recettore specifico, presente sulla membrana postsinaptica, determina l'apertura di canali di membrana, cosicché gli ioni sodio sono in grado di permeare nella cellula muscolare, determinandone la contrazione. Durante la formazione della placca neuromuscolare il recettore dell'acetilcolina viene accumulato nel sito di contatto nervo-muscolo. Con la differenziazione della membrana postsinaptica, il tipo di recettore fetale viene sostituito dal tipo adulto che contiene la subunità  $\epsilon$  al posto della  $\gamma$  e che possiede differenti proprietà funzionali [Bach *et al.*, 2003].

---

Da sottolineare, infine, l'espressione del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), che riveste un ruolo fondamentale nella regolazione dell'angiogenesi fisiologica e patologica. Esistono diverse isoforme di VEGF ma la specie molecolare predominante é il VEGF165 che si presenta come una glicoproteina omodimerica basica che si lega all'eparina. *In vitro* il VEGF stimola la degradazione, la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali [Fong *et al.*, 1995]; *in vivo* regola la permeabilità vascolare, importante per l'inizio dell'angiogenesi. Esso viene chiaramente espresso dalla prima settimana probabilmente dalle cellule endoteliali dei vasi neo-formati, ma, probabilmente, anche dai mioblasti impiantati e da cellule dell'infiltrato infiammatorio. La sua presenza è comunque fondamentale per la formazione di una rete vascolare, in grado non solo di fornire un adeguato supporto nutrizionale, ma di rappresentare anche una fonte di cellule satellite [Chargè e Rudnicki, 2004] e di cellule staminali muscolari endogene [Meeson *et al.*, 2004].

I risultati raccolti confermano, quindi, che il modello sperimentale di ricostruzione della parete addominale, basato sull'utilizzo di un sostituto muscolare formato da matrice acellulare e mioblasti, rappresenta un promettente approccio per il trattamento di patologie caratterizzate da mancanza congenita o perdita di ampie zone di tessuto muscolare scheletrico. In questo lavoro è stato condotto uno studio preliminare del processo di rigenerazione che avviene *in vivo* all'interno del materiale protesico esaminando alcuni marcatori della componente muscolare e nervosa del tessuto per un periodo non superiore ai 3 mesi. Le evidenze sperimentali ottenute, anche se non in grado di fornire un quadro completo, hanno indicato che:

- esiste all'interno dei patch un progressivo rimodellamento della componente muscolare che a 3 mesi dall'intervento non appare totalmente concluso. Infatti, la presenza contemporanea, a partire da un mese, di marcatori caratteristici sia delle prime fasi differenziative che di quelle successive, indica l'esistenza di progenitori attivati indirizzati verso la linea miogenica e di elementi cellulari a stadio di maturazione avanzato;
- il coinvolgimento di precursori circolanti, probabilmente di origine midollare, nel processo rigenerativo viene suggerito dalle seguenti osservazioni: i) persistenza di cellule scarsamente differenziate a 3 mesi

---

dall'intervento, ii) importante migrazione cellulare dai vasi non associata a fenomeni infiammatori, e iii) i mioblasti impiantati, essendo cellule già indirizzate verso un preciso destino differenziativo, presumibilmente formano, analogamente a quanto succede *in vitro*, elementi plurinucleati in tempi relativamente brevi;

- si ha una rapida comparsa sia della rete vascolare che della componente nervosa

In prospettiva, sarà necessario monitorare ulteriormente il processo differenziativo-maturativo fino a 9 mesi dall'intervento, ottenendo anche dati quantitativi con la real time PCR e valutando altre proteine strutturali e fattori di trascrizione specifici del muscolo scheletrico (c-met, miostatina, miosine adulte, embrionali e neonatali), del terminale presinaptico (sinaptofisina, colina acetiltransferasi e neuregulina), della membrana postsinaptica (alfa/beta-distroglicano) e delle cellule endoteliali (VE-cadherin, von Willebrand factor). Infine, sarà interessante chiarire il ruolo svolto dai mioblasti impiantati, dalle cellule satellite dell'ospite e dai precursori circolanti delle cellule muscolari scheletriche nella formazione di nuove fibre muscolari.

Benchè i risultati ottenuti siano molto promettenti, in vista di possibili future applicazioni mediche, emerge un problema quando le cellule satelliti del muscolo abbiano una funzionalità compromessa o il loro numero sia esiguo all'interno delle fibre muscolari. Per superare questo problema, abbiamo rivolto parte del nostro studio all'identificazione di cellule con caratteristiche mesenchimali all'interno del sangue cordonale e alla verifica della loro capacità *in vitro* e *in vivo* di differenziarsi in cellule muscolari scheletriche. I risultati ottenuti sono frutto di una collaborazione con il gruppo del professor Biagio Saitta del Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ (USA).

Le MSC sono cellule self-renewal, inizialmente identificate nel midollo osseo e, più recentemente, in molti altri tessuti fetali e adulti, compreso il tessuto osseo, il liquido sinoviale, tessuto muscolare, il tessuto adiposo e il sangue cordonale [Erices et al., 2000; Baksh et al., 2004; Barry et al., 2003]. Sono presenti in numero limitato nel midollo osseo [Murohara, 2001], e ancora meno nel sangue cordonale

---

(all'incirca  $1:10^8$ ) e stime sul loro numero indicano che vi sia un decremento di tre ordini di grandezza tra un neonato e un adulto di 80 anni [Sarugaser et al, 2005; Caplan, 2007]. Hanno caratteristiche di cellule pluripotenti, ovvero possiedono la capacità di differenziarsi in molteplici linee cellulari come cellule del tessuto osseo, cartilagineo, connettivo o muscolare.

Il gruppo del prof. Saitta ha isolato dal sangue cordonale due distinte popolazioni cellulari, con morfologia fibroblastoide: le UCB1-MSC più piccole ed allungate e le UCB2-MSC più larghe e tozze. Inoltre, le UCB1-MSC presentavano valori più elevati di population doubling. Tuttavia, entrambe, in opportune condizioni di coltura, si differenziavano in osteoblasti, condrociti e adipociti. L'analisi del profilo genico delle UCB1-MSC ha evidenziato una presenza maggiore di geni legati allo sviluppo e al differenziamento rispetto a quanto osservato per le UCB2-MSC. Questa caratteristica, unita a una maggiore capacità proliferativa e, di conseguenza, alla possibilità di espansione per un più alto numero di passaggi, ha portato a ritenere le UCB1-MSC più "primitive" e più adatte ad un possibile e futuro utilizzo in terapia [Markov, 2007]. Inoltre, le cellule UCB1-MSC (di seguito indicate semplicemente come MSC), utilizzate in questo lavoro, rispondevano ai criteri minimi definiti dalla *International Society for Cellular Therapy* e richiesti per definire una popolazione di cellule come "multipotenti e mesenchimali": i) capacità di aderire a piastre di coltura in condizioni standard; ii) fenotipo positivo (>95%+) per marker CD105, CD73, CD90 e negativo (<2%+) per marker CD45, CD34, CD 14 o CD11b, CD 79 $\alpha$  o CD19, HLA-DR; iii) capacità di differenziarsi *in vitro* in osteoblasti, adipociti e condrociti [Dominici et al., 2006].

Le MSC seminate in piastre condizionate con Matrigel e coltivate con terreno induttivo, differenziavano verso la linea miogenica, iniziando ad esprimere marker miogenici precoci, come il Myf-5, sin dal 4° giorno dall'inizio dell'induzione. La percentuale di cellule in coltura che esprimevano Myf-5 passava dal 14% al 30% all'8° giorno. Anche la loro morfologia cambiava, e tendevano a disporsi parallelamente le une alle altre, con un progressivo e parallelo aumento degli eventi di fusione. L'analisi real time PCR eseguita utilizzando primer per due sequenze RNA, specifici per specie umana: human-MyoD e human-Miogenina, confermava il differenziamento in atto. E' interessante notare che questo risultato è stato

---

ottenuto senza l'utilizzo di fattori specifici che agiscono da stimolo chimico induttivo come, ad esempio, la 5-Azacidina, il desametasone o la Galectin-1 [Gang et al., 2004; Chan et al., 2006]. I risultati ottenuti hanno confermato l'importanza del Matrigel nell'indurre il differenziamento miogenico. Il Matrigel è una membrana solubile composta da collagene IV, laminina, proteoglicani e altre sostanze, che la rende un ambiente simile all'endomysio dove sono localizzate le cellule satelliti [Godfrey and Gradall, 1998]. Condizionando la superficie di coltura con Matrigel e utilizzando terreno miogenico, il differenziamento interessava il 30% della popolazione cellulare totale, mentre in sola presenza di terreno induttivo solo il 12% delle cellule entrava nel programma differenziativo. Questi risultati concordano con quelli ottenuti da Langen et al. (2003) che avevano evidenziato come il Matrigel sia in grado di accelerare il differenziamento miogenico di cellule C2C12.

Le MSC da sangue cordonale sono, inoltre, in grado *in vivo* di integrarsi nel muscolo scheletrico, nel quale era stato indotto un danno chimico, di differenziarsi in cellule muscolari scheletriche e di partecipare al processo rigenerativo.

In seguito ad una lesione sia di tipo chimico che di tipo fisico, ad una prima fase caratterizzata da degenerazione delle fibre muscolari e infiammazione, segue un processo di rigenerazione, nel quale vengono attivati in modo sequenziale numerosi fattori endogeni [Huard et al., 2002], che rappresentano un stimolo differenziativo e chemoattrattivo per precursori muscolari. In questo lavoro è stata indotta una necrosi alle fibre muscolari del muscolo *tibialis anterior* utilizzando una soluzione di bupivacaina cloridrato [Hill et al., 2003]. Dopo due giorni, durante il picco infiammatorio, sono state iniettate le MSC, e si è osservata la rigenerazione a distanza di 7 e 14 giorni dal trapianto cellulare.

Le sezioni istologiche non presentavano segni di risposta immunitaria severa o di rigetto, benché ai ratti non fosse stata associata alcuna terapia immunosoppressiva. Le MSC infatti presentano un fenotipo superficiale negativo per il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC-II) e leggermente positivo per MHC-I, conferendo loro una natura ipo-immunogenica [Ryan et al., 2005; Uccelli et al., 2006; Caplan, 2007]. Inoltre si ritiene che le MSC abbiano un ruolo immunoregolatorio, inibendo le cellule T, favoriscano l'angiogenesi, inibiscano l'apoptosi e la formazione di tessuto fibroso, secernendo una molteplicità di fattori

---

(PGE2, VEGF, IL6 e IL8) [Caplan, 2007]. Già a 7 giorni dall'iniezione delle MSC infatti, si notava una sostanziale differenza istologica tra i muscoli trattati, dove la necrosi era di fatto regredita, e i controlli, dove le fibre presentavano ancora segni necrotici. A 14 giorni le fibre muscolari presentavano una struttura normale con lievi segni di infiammazione.

Le cellule trapiantate permanevano in buona quantità nel muscolo fino a 14 giorni, come evidenziato dalla presenza di fibre GFP-positive, la cui percentuale era attorno al 40% dopo una settimana. Pèault et al. (2007) riportano che il 75% dei mioblasti impiantati via intramuscolo muore entro i primi 3 giorni dal trapianto, e quindi un maggior numero di cellule dovrebbe essere somministrato per superare questo limite. Anche altri Autori, iniettando quantità maggiori di cellule, hanno notato un aumento del numero di fibre contenenti le cellule impiantate. Il protocollo da noi utilizzato prevedeva inoltre non una singola iniezione di MSC, ma tre iniezioni su tutta la lunghezza così da permettere una maggiore diffusione all'interno del muscolo [Skuk et al., 1999]. Anche dopo 2 settimane dalla somministrazione, la percentuale di fibre GFP-positive si manteneva attorno al 40% delle fibre totali. Tuttavia, l'area occupata da tali fibre era del 20% sul totale dopo 7 giorni, e saliva al 26% dopo 14 giorni. Questo risultato indica chiaramente che è necessario un intervallo di tempo per l'integrazione delle MSC nel tessuto, come già evidenziato per altri tipi cellulari [Pèault et al., 2007; Fan et al., 1996]. Il fatto che il numero di fibre GFP-positive rimanga sostanzialmente invariato nell'arco delle due settimane ma che l'area, e quindi le loro dimensioni crescano, indica che le MSC hanno preso parte alla rigenerazione muscolare, e che nel tempo contribuiscono all'accrescimento delle fibre stesse. La presenza di nuclei in posizione centrale [Chargè et al., 2003] all'interno delle fibre GFP-positive rappresenta, inoltre, un'ulteriore evidenza a favore della partecipazione delle MSC al processo rigenerativo. L'utilizzo di un anticorpo specifico anti-human Nuclei, ha inoltre confermato la presenza di cellule umane in fibre muscolari GFP-positive. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per valutare di che natura siano queste fibre: se siano fibre composte da sole cellule di derivazione umana oppure siano fibre miste, dove cellule umane e di ratto si siano fuse a dare il sincizio plurinucleato tipico della fibra muscolare. Brimah et al. (2004) hanno mostrato, isolando singole fibre muscolari da muscolo criodanneggiato di topo e sottoposto a trapianto di

---

precursori muscolari umani (MPC), come alcune fibre fossero di tipo misto e nessuna fosse composta da sole cellule umane.

Inoltre, le cellule GFP-positive presenti all'interno dei muscoli trattati, erano positive per i marker muscolari Myf-5, MyoD, tropomiosina sarcomerica e miosina MF20, indicando la capacità di tali cellule di differenziarsi in cellule muscolari non solo *in vitro* ma anche *in vivo*. Si notavano infine anche zone di fibre GFP-positive contenenti bande chiare e scure alternate, che suggerivano l'inizio di una architettura ordinata all'interno delle fibre stesse.

I risultati ottenuti evidenziano, quindi, che le MSC da sangue cordonale sono in grado di differenziarsi in cellule della linea miogenica, sia *in vitro* che *in vivo*, e che, qualora impiantate, si integrano con grande efficienza nel muscolo dell'ospite, senza dare segni di rigetto, e partecipando, almeno in parte, alla rigenerazione muscolare.

Nel futuro, si dovranno studiare in maniera più approfondita il ruolo *in vivo* di tali cellule sia dal punto di vista del loro differenziamento, sia per la loro capacità di immunoregolazione e/o richiamo di cellule dell'ospite mediante rilascio di fattori e citochine. Di grande interesse sarà inoltre osservare se vi siano differenze nei muscoli sottoposti a trapianto di cellule indifferenziate, come nel lavoro eseguito, o di cellule mesenchimali precedentemente differenziate in mioblasti. Sarà inoltre importante capire se le fibre neoformate siano di sola derivazione di cellule dell'ospite, umana, o vi sia una compartecipazione di entrambi i tipi cellulari nella rigenerazione del muscolo danneggiato.

---

## BIBLIOGRAFIA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Watson JD (1995): *Biologia molecolare della cellula*. Terza Edizione Zanichelli.

Allman AJ, McPherson TB, Badylak SF, Merrill LC, Kallakury B, Sheehan C, Raeder RH, Metzger DW (2001): Xenogenic extracellular matrix grafts elicit a Th2-restricted immune response. *Transplantation* 71: 1631-1640.

Appel HJ, Forsberg S, Hollmann W (1988): Satellite cell activation in human skeletal muscle after training: evidence for muscle fiber neof ormation. *Int J Sports Med* 9: 297-299.

Asakura A, Komaki M, Rudnicki M (2001): Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 68(4-5): 245-53.

Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J (1974) Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev Biol* 38(2): 237-48

Bach AD, Beier JP, Stark GB (2003): Expression of Trisk 51, agrin and nicotinic-acetylcholine receptor  $\epsilon$ -subunit during muscle development in a novel three-dimensional muscle-neuronal co-culture system. *Cell Tissue Res* 314: 263-274.

Badylak SF (2007): The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* 28 (25): 3587-93.

Baird PA, MacDonald EC (1981): An epidemiological study of congenital malformations of the anterior abdominal wall in more than half a million consecutive live births. *Am J Hum Genet* 33: 470-478.

Baksh D, Song L, Tuan RS (2004): Adult Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Application in Cell and Gene Therapy. *J Cell Mol Med* 8:301-16.

Barry FP (2003): Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69:250-256.

Barbarisi A, Rosso F (2002): *Ingegneria tissutale ed organi artificiali: la medicina ricostruttiva*. 104° Congresso naz. Società Italiana di Chirurgia, Vol I pp. 3-16.

---

Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS (2000): Expression of CD-34 and Myf-5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle cells. *The Journal of Cell Biology* 151: 1221-1233.

Beier J, Kneser U, Stern-Strater J, Stark GB, Bach AD (2004): Y chromosome detection of three-dimensional tissue-engineering skeletal muscle constructs in a syngenic rat animal model. *Cell Transplantation* 13(1): 45-53.

Bhatnagar V, Das K, Agarwala S, Mitra DK (2001): Silo construction from a sterile adhesive film and polypropylene mesh in the repair of gastroschisis and omphalocele. *Pediatr Surg Int* 17: 356-358.

Bischoff R (1997): Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Developmental Dynamics* 208: 505-515.

Blaveri K, Heslop L, Yu DS, Rosenblatt JD, Gross JG, Partridge TA, Morgan JE (1999): Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: Studies on isolated fibers. *Developmental Dynamics* 216: 244-256.

Brimah K, Ehrhardt J, Mouly V, Butler-Browne GS, Partridge TA, Morgan JE (2004): Human Gene Therap 15:1109-1124

Buinewicz B, Rosen B (2004): Acellular cadaveric dermis (AlloDerm): a new alternative for abdominal hernia repair. *Ann Plast Surg* 52: 188-194.

Burge SM, Dawber RPR (1990): Hair follicle destruction and regeneration in guinea pig skin after cutaneous freeze injury. *Cryobiology* 27: 153-163.

Calzolari E, Bianchi F, Dolk H, Milan m (1995): Omphalocele and gastroschisis in Europe: a survey of 3 million births 1980-1990. EUROCAT Working Group. *Am J Med Genet* 58(2): 187, 194.

Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, Cummins J, Epperly M, Qu-Petersen Z, Huard J (2003): Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol* 5(7): 640-646.

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

---

Caplan AI (2007): Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213(2): 341-7.

Cataliotti F, Cascio S (1998): *Manuale di Chirurgia Pediatrica* 16: 158-163. Piccin.

Chao NJ, Emerson SG, Weinberg KI (2004): Stem cell transplantation (cord blood transplants). *Hematology. (Am.Soc.Hematol.Educ.Program.)*354-371.

Charge SB, Rudnicki MA (2004): Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *“Physiol Rev”* 84(1): 209-238.

Charge SB, Rudnicki MA (2004): Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 84: 209–238

Chan J, O’Donoghue K, Gavina M, Torrente Y, Kennea N, Watt DJ, Morgen JE, Fisk NM (2006): Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. *Stem cells* 24(8): 1879-91

Chen G, Quinn LS (1992): Partial characterization of skeletal myoblast mitogens in mouse crushed muscle extract. *J Cell Physiol* 153: 563-574.

Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J (2000): Generalized potential of adult neural stem cell. *Science* 288: 1660-1663.

Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Patridge TA, Morgan JE (2005): Stem cell function, self-renewal, and behavioural heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122: 289-301.

Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA (2003): Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302: 1575-1577.

Conconi MT, de Coppi PD, Bellini S, Zara G, Sabatti M, Marzaro M, Franco Zanon G, Gamba PG, Parnigotto PP, Nussdorfer GG (2005): Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. *Biomaterials* 26(15): 2567-74.

Conconi MT, Rocco F, Spiazzi R, Tommasini M, Valfre C, Busetto R, Polesel E, Albertin G, Dei Tos A, Iacopetti I, Cecchetto A, Zussa C, Grigioni M, Parnigotto PP, Nussdorfer GG (2004): Biological fate of tissue-engineered porcine valvular conduits xenotransplanted in the sheep thoracic aorta. *“Int J Mol Med”* 14(6): 1043-1048.

---

Conconi MT, Bellini S, Teoli D, DeCoppi P, Ribatti D, Nico B, Simonato E, Gamba PG, Nussdorfer GG, Parnigotto PP, Morpurgo M: In vitro and in vivo evaluation of acellular diaphragmatic matrices seeded with muscle precursor cells and coated with VEGF silica gels to repair muscle defect of the diaphragm. Accepted, in press.

Curry CJ, Honore L, Boyde E (1993): The ventral wall of the trunk. In Human Malformation and Related Anomalies VII. Oxford University Press.

De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C, Cossu G (1999): Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 147: 869-878.

De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP (2003): Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 160:909-918.

Decary S, Mouly V, Hamida CB, Sautet A, Barbelet JP, Butler-Browne GS (1997): Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: Implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Human Gene Therapy* 8: 1429-38.

DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, Yancopoulos GD (1996): The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85: 501-512.

De Coppi P, Bartsch G jr, Minhaj Siddiqui M, Xu T, Santos C, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A (2007): Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology* 25(1): 100-106.

De Coppi P, Bellini S, Conconi MT, Sabatti M, Simonato E, Gamba PG, Nussdorfer GG, Parnigotto PP (2006): Myoblasts acellular skeletal muscle matrix constructs guarantee a long term repair of experimental full-thickness abdominal defects. *Tissue Engineering* 12(7): 1929-1936.

Delgado I, Huang X, Jones S, Zhang L, Hatcher R, Gao B, Zhang P (2003): Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro. *Genomics* 82: 109-121.

De Vries PA (1980): The pathogenesis of gastroschisis and omphalocele. *J Pediatr Surg* 15(3): 245-251.

---

Devine SM, Hoffman R (2000): Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 7:358-363.

Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y (2005): Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science* 309:314- 317.

Domini R, Lima M (2003): *Lezioni di chirurgia pediatrica.* Clueb.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ and Horwitz EM (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-17.

Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000): Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 109:235-242.

Fan, Y, Maley, M, Beilharz, M and Grounds, M (1996). Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve* 19: 853–860.

Fauza DO, Marler JJ, Koka R, Forse RA, Mayer JE, Vacanti JP (2001): Fetal tissue engineering: diaphragmatic replacement. “*Journal of Pediatric Surgery*” 36(1): 146-151.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998): Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530.

Fischer JD, Chun K, Moores DC, Andrews HG (2000): Gastroschisis: a simple technique for staged silo closure. *J Pediatr Surg.* 30(8): 1169-1171.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995): Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376(6535): 66-70.

Fontane M, Schloo B, Jenkins R, Uyama S, Hansen L, Vacanti JP (1995): Human hepatocyte isolation and transplantation into an athymic rat, using prevascularized cell polymer constructs. *J Pediatr Surg* 30: 50, 60.

Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, Smith A, Lesage S, Beaujean F, Thierry D, Gourmelon P, Najman A, Gorin NC (2003): Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 17:474-476.

---

Galli R, Borello A, Gritti A (2000): Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 3: 986-991.

Gamba PG, Conconi MT, Lo Piccolo R, Zara G, Spinazzi R, Parnigotto PP (2002): Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. *Pediatr Surg Int* 18: 327-331.

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

Gibson MC, Schultz E (1982): The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat Rec* 202: 329-337.

Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF (2006): Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 27 (19):3675-83.

Godfrey EW, Gradall KS (1998): Basal lamina molecules are concentrated in myogenic regions of the mouse limb bud. *Anat Embryol (Berl)*. 198(6): 481-6.

Goldring K, Jones GE, Sewry CA, Watt DJ (2002): The muscle-specific marker desmin is expressed in a proportion of human dermal fibroblasts after their exposure to galectin-1. *Neuromuscul Disord* 12(2): 183-186.

Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, Black KS, O'Brien MF (2000): Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. *Ann Thorac Surg* 70: 1962-1969.

Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K (2004): Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol* 190:239-245.

Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G (2003): Controlling the Angiogenic Switch. *Trends Cardiovasc Med* 13: 301-307.

Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringden O, Sylven C, Le Blanc K (2004): Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127:1293-1300.

---

Gross JG, Morgan JE (1999): Muscle precursor cells injected into irradiated mdx mouse muscle persist after serial injury. *Muscle & Nerve* 22: 174-185.

Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA (2002): The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. "The Journal of Histochemistry and Cytochemistry" 50(5): 589-610.

Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano F, Johnson RS (2000): Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature. *Mol Cell Biol* 20(19): 7282-7291.

Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC (1999): Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390-394.

Halevy O, Piestun Y, Allouh MZ, Rosser B W, Rinkevich Y, Reshef R, Rozenboim I, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z (2004): Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev. Dyn.* 231: 489-502.

Harjai MM, Bhargava P, Sharma A, Saxena A, Singh Y (2000): Repair of a giant omphalocele by a modified technique. *Pediatr Surg Int* 16: 519-521.

Hawke TJ, Garry DJ (2001): Myogenic satellite cells: Physiology to molecular biology. *J Appl Phys* 91: 534-551.

Hench LL, Polak JM (2002): "Third-generation biomedical materials". *Science* 295: 1014-1017.

Herva R, Karkinen-Jaaskelainen M (1984): Amniotic adhesion malformation syndrome: fetal and placental pathology. *Teratology* 29: 544-549.

Heslop HE, Rooney CM, Rill DR, Krance RA, Brenner MK (1996): Use of gene marking in bone marrow transplantation. *Cancer Detect. Prev* 20(2): 108-113.

Hill M, Goldspink G (2003): Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J Physiol* 594.2: 409-18.

---

Hong Y, Winkler C, Scharl M (1998): Efficiency of cell culture derivation from blastula embryos and of chimera formation in the medaka (*Oryzias latipes*) depends on donor genotype and passage number. *Dev Genes Evol* 208(10): 595-602.

Huard J (2002): Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 84-A(5): 822-32.

Jeejeebhoy KN (2002): Short bowel syndrome: a nutritional and medical approach. *CMAJ* 166(10): 1297-1302.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002): Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418(6893): 41-49.

Jyn-Yao Lai, Pei-Yeh Chang, Jer-Nan Iin (2003): Body wall repair using Small Intestinal Submucosa seeded with cells. *J Pediatr Surg* 38: 1752-1755.

Kamelger FS, Marksteiner R, Margreiter E, Klima G, Wechselberger G, Hering S, Piza H (2004): A comparative study of three different biomaterials in the engineering of skeletal muscle using a rat animal model. *Biomaterials* 25: 1649-1655.

Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland RW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE (2001): Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 7: 1035-1040.

Kidd JN, Levy MS, CW Wagner (2001): Staged reduction of gastroschisis: a simple method. *Pediatr Surg Int* 17: 242-244.

Kim SW, Han H, Chae GT, Lee SH, Bo S, Yoon JH, Lee YS, Lee KS, Park HK, Kang KS (2006): Successful Stem Cell Therapy Using Umbilical Cord Blood-derived Multi-potent Stem Cells for Buerger's Disease and Ischemic Limb Disease Animal Model. *Stem Cells.* 24(6):1620-6.

Komuro H, Mori M, Hayashi Y, Fukagawa M, Makino S, Takahara K, Greenspan DS, Momoi MY (2001): Mutational analysis of the BMP-1 gene in patients with gastroschisis. *J Pediatr Surg* 36(6): 885-887.

---

Krause DS, Ito t, Fackler MJ, Smith Om, Collector MI, Sharkis SJ, May WS (1994): Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 84: 691–701.

Kunisaki SM, Fuchs J, Kaviani A, Oh JT, LaVan D, Vacanti JP, Wilson JM, Fauza DO (2006): Diaphragmatic repair through foetal tissue engineering: a comparison between mesenchymal amniocyte- and myoblast- based constructs. “*Journal of Pediatric Surgery*” 41: 34-39.

Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocci G, Carrier C, Stevens CE, Rubinstein P (1996): Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med.* 335:157-166.

Langen RC, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM (2003): Enhanced myogenic differentiation by extracellular matrix is regulated at the early stages of myogenesis. In *Vitro Cell Dev Biol Anim* 39(3-4): 163-9.

Langer JC (1996): Gastroschisis and omphalocele. *Semin Pediatr Surg* 5(2): 124-128.

Langer R, Vacanti JP (1993): Tissue engineering. *Science* 260(5110): 920-926.

Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D, Weintraub H (1991): Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66: 305-315.

Levenberg S, Rouwkema J, MacDonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, Marini R, van Blitterswijk CA, Mulligan RC, D’Amore PA, Langer R (2005): Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 23(7): 879-884.

Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW (2000): Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6:1282-1286.

Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP (2000): Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest* 105(1): 71-77.

Linardic CM, Naini S, Herndon JE 2nd, Kesslerwan C, Qualman SJ, Counter CM (2007): The PAX3-FKHR fusion gene of rhabdomyosarcoma cooperates with loss of p16INK4A to promote bypass of cellular senescence. *Cancer Res* 67(14): 6691-6699.

---

Lindon C, Montarras D, Pinset C (1998): Cell cycle regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. "J Cell Biol" 140(1): 111-118.

Liu JH, Bijlenga P, Fischer-Lougheed J, Occhiodoro T, Kaelin A, Bader CR, Bernheim L (1998): Role of an inward rectifier K<sup>+</sup> current and of hyperpolarization in human myoblast fusion. J Physiol 510: 467-76.

Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, Atkinson YH, Nag A (1995): Transplanted acellular allograft dermal matrix. Transplantation 60: 1-9.

Lu L, Shen RN, Broxmeyer HE (1996): Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application. Crit Rev Oncol Hematol. 22:61-78.

Luijendijk RW, Hop WC, van den Tol MP, De Lange DC, Braaksma MM, Ijzermans JN, Boelhouwer RU, De Vries BC, Salu MK, Wereldsma JC, Bruijninx CM, Jeekel J (2000): A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia. N Engl J Med 343(6): 392-398.

MacLeod TM, Sarathchandra P, Williams G, Sanders R, Green CJ (2004): Evaluation of a porcine origin acellular dermal matrix and small intestinal submucosa as dermal replacements in preventing secondary skin graft contraction. Burns 30(5): 431-437.

Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD (2003): Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. J Biomed Sci 10:228-241.

Mansilla E, Marin GH, Sturla F, Drago HE, Gil MA, Salas E, Gardiner MC, Piccinelli G, Bossi S, Salas E, Petrelli L, Iorio G, Ramos CA, Soratti C (2005): Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. Transplant Proc 37:292-294.

Markov V, Kusumi K, Tadesse MG, William DA, Hall DM, Lounev V, Carlton A, Leonard J, Cohen RI, Rappaport EF, Saitta B (2007): Identification of Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cell Populations with Distinct Growth Kinetics, Differentiation Potentials, and Gene Expression Profiles. *Stem Cells Dev* 16: 53-74.

Marzaro M, Conconi MT, Perin L, Giuliani S, Gamba PG, De Coppi P, Perrino GP, Parnigotto PP and Nussdorfer GG (2002): Autologous satellite cell seeding improves in vivo biocompatibility of homologous muscle acellular matrix implants. Int J Mol Med 10: 177-182.

- 
- Mauro (1961): Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493-495.
- McCroskery S, Thomas M, Maxwell AX L, Sharma M, Kambadur R (2003): Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162: 1135-1147.
- McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA (2002): Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(3): 1341-1346.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ (1997): Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* 387: 83.
- Meeson AP, Hawke TJ, Graham S, Jiang N, Elterman J, Hutcheson K, Dimaio JM, Gallardo TD, Garry DJ (2004): Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. "Stem Cells" 22(7): 1305-1320.
- Mertelsmann R (2000): Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *J Hematother Stem Cell Res*. 9:957-960.
- Miller ME, Graham JM, Higginbottom MC, Smith DW (1981): Compression-related defects from early amnionrupture: Evidence of mechanical teratogenesis. *J Pediatr* 98: 292-297.
- Minkes RK, Langer JC, Mazziotti MV, Skinner MA, Foglia RP (2000): Routine insertion of a Silastic spring-loaded silo for infants with gastroschisis. *J Pediatr Surg* 35: 843-846.
- Miranda ME, Tatuó ES, Guimaraes JT, Paixao RM, Lanna JC (1999): Use of a plastic hemoderivative bag in the treatment of gastroschisis. *Pediatr Surg Int* 15: 442-444.
- Morgan JE, Partridge TA (2002): A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218: 115-124.
- Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ (2005): Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *PNAS USA* 102:18171-18176.
- Müller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, Laird PW, Kedes L (2002): Survival and Development of Neonatal Rat Cardiomyocytes Transplanted into Adult Myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 34: 107-116.

---

Murohara T (2001): Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors. *Trends Cardiovasc Med* 11:303-307.

Nomi M, Atala A, De Coppi P, Soker S (2002): Principles of neovascularization for tissue engineering. *Mol Asp Med* 23: 463-483.

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 (2001): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410(6829): 701-705.

Pagon RA, Stephens TD, McGillivray BC, Sieber JR, Wright VJ, Hsu LL, Poland BJ, Emmanuel I, Hall JG (1979): Body wall defects with reduction limb anomalies: A report of fifteen cases. *B.D. OAS XV (5A)* 171-185.

Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Samarut J, Etches RJ (1996): Long-term in vitro culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenic potentialities. *Development* 122(8): 2339-48.

Palminteri E, Testa G, Di Fiore F, Ponte D, Domizi S, Maffucci A, Barbagli A G (2006): Uretroplastica con Small Intestine Submucosa (SIS): risultati preliminari. "Chirurgia Uretrale" 9(11): 101-105.

Parnigotto PP, Conconi MT, Bonali A, Sartore S, Mazzoleni F (1997): Matrice acellulare omologa come sostituto dermico. *Atti del 46° Congresso Nazionale della Società Italiana di Chirurgia Plastica Ricostruttiva ed Estetica* 241-247.

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

Pasqualino A, Panattoni GL (2002): *Anatomia umana*. Utet.

Pèault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J (2007): Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance and therapy. *Mol Ther* 15(5): 867-77.

Peng H, Huard J (2004): Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transplant Immunology* 12: 311-319.

---

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP (1999): Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284(5417): 1168-1170.

Piek E, Heldin CH, ten Dike P (1999): Specificity, diversity, and regulation in TGF- $\beta$  superfamily signaling. *FASEB J* 13: 2105-2124.

Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR (2000): Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol* 251: 3-11

Polesskaya A, Seale P, Rudnicki MA (2003): Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cell during muscle regeneration. *Cell* 113(7): 841-852.

Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulosom R, Wright NA (2003): The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol*; 56(2): 86-96.

Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL (2003): One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *PNAS USA* 100 Suppl 1:11917-11923.

Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J (2002): Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 157(5): 851-864 Epub.

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

Ribatti D, Nico B, Vacca A, Presta M (2006): The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. *Nat Protoc* 1(1): 85-91.

Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP (2005): Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)* 2:8-19.

Robey PG (2000): Stem cells near the century mark. *J. Clin. Invest* 105(11): 1489-1491.

Rocco F, Ius P, Mirone S, Paolin A, Gatto C, Bredariol S, Tamari W, Valfre C (2004): Ten-year experience with cryopreserved aortic allografts in the surgical treatment of aortic valve pathologies. *Ital Heart J* 5(7): 541-547.

---

Roeder R, Wolfe J, Lianakis N, Hinson T, Geddes LA, Obermiller J (1999): Compliance, elastic modulus, and burst pressure of small-intestine submucosa (SIS), small-diameter vascular grafts. *J Biomed Mater Res* 47: 65-70.

Santucci RA e Barber TD (2005): Resorbable extracellular matrix grafts in urologic reconstruction. *Int Braz J Urol* 31(3): 192-203.

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE (2005) Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells* 23: 220-229

Saxena AK, Marler J, Benvenuto M, Willital GH, Vacanti JP (1999): Skeletal muscle tissue engineering using isolated myoblasts on synthetic biodegradable polymers: preliminary studies. *Tissue Eng* 5: 525-532.

Schlatter M, Norris K, Uitvlugt N, DeCou J, Connors R (2003): Improved outcomes in the treatment of gastroschisis using a preformed silo and delayed repair approach. *J Pediatr Surg* 38: 459-464.

Schmalbruch H, al-Amood WS, Lewis DM (1991): Morphology of long-term denervated rat soleus muscle and the effect of chronic electrical stimulation. *J Physiol* 441: 233-241.

Schmalbruch H, Hellhammer U (1977): The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *Anat Rec* 189: 169-175.

Schmitz N, Barrett J (2002): Optimizing engraftment--source and dose of stem cells. *Semin Hematol.* 39:3-14.

Schultheiss D, Bloom DA, Wefer J, Jonas U. Tissue Engineering from Adam to the zygote: historical reflections. *World J Urol.* 2000 Feb;18(1): 84-90.

Schultz E, Jaryszak DL, Valliere CR (1985): Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve* 8: 217-222.

Schultz E, McCormick KM (1994): Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 123: 213-257.

Schultz E (1996): Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* 175: 84-94.

---

Schuster SR (1967): A new method for the staged repair of large omphaloceles. *Surg Gynecol Obstet* 125: 837.

Schwartz M, Tyson K, Milliorn K, Lobe T (1983): Staged reduction using a silastic sac is the treatment of choice for large congenital abdominal wall defect. *J Pediatr Surg* 18: 713-719.

Seale P, Rudnicki MA (2000): A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218: 115-124.

Shablott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998): Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *PNAS USA* 95(23): 13726-13731.

Skuk, D, Roy, B, Goulet, M and Tremblay, JP (1999). Successful myoblast transplantation in primates depends on appropriate cell delivery and induction of regeneration in the host muscle. *Exp Neurol* 155: 22–30.

Sievers HH, Stierle U, Schmidtke C, Bechtel M (2003): Decellularized pulmonary homograft (SynerGraft) for reconstruction of the right ventricular outflow tract: first clinical experience. *Z Kardiol* 92(1): 53-59.

Slack JM (2000): Stem cells in epithelial tissue. *Science* 287: 1431-1433.

Smith A (2001): *Stem cell biology book* (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 205-230.

Smith TH, Block NE, Rhodes SJ, Konieczny SF, Miller JB (1993): A unique pattern of expression of the four muscle regulatory factor proteins distinguishes somatic from embryonic, fetal and newborn mouse myogenic cells. *Development* 117: 1125-1133.

Stocum DL (2001): Stem cell in regenerative biology and medicine. *Wound Rep.* 9(6): 429-442.

Stoll C, Alembiki Y, Dott B, Roth MP (2001): Risk factors in congenital abdominal wall (omphalocele and gastroschisis): a study in a series of 265858 consecutive births. *Annales de Genetique* 44: 201-208.

Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S (1983): In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96(1): 191-198.

---

Sutherland RS, Baskin LS, Hayward SW, Cunha GR (1996): Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. *J Urol* 156: 571-577.

Takami Y, Matsuda T, Yoshitake M, Hanumadass M, Walter RJ (1996): Dispase/detergent treated dermal matrix as a dermal substitute. *Burns* 22: 182-190.

Takehara K (2000): Growth regulation of skin fibroblasts. *Journal of Dermatological Science* 24(1): 70-77.

Tamaki T, Okada Y, Uchiyama Y, Tono K, Masuda M, Wada M, Hoshi A, Ishikawa, Akatsuka A (2007): Clonal multipotency of skeletal muscle-derived stem cells between mesodermal and ectodermal lineage. *Stem Cells* 25(9): 2283-2290.

Tarnowski M, Sieron L (2006): Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit* 12(8): RA154-163.

Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE (1998): HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and it is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* 194: 114-28.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391): 1145-1447.

Torfs CP, Velie EM, Oechsli FW, Bateson TF, Curry CJ (1994): A population-based study of gastroschisis: demographic, pregnancy, and lifestyle risk factors. *Teratology* 50(1): 44-53.

Torfs CP, Lam PK, Schaffer DM, Brand RJ (1998): Association between mothers' nutrient intake and their offspring's risk of gastroschisis. *Teratology* 58(6): 241-250.

Tosh D, Slack JM (2002): How cells change their phenotype. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* 3(3): 187-194. Review.

Triffitt JT (2002): Stem cells and the philosopher's stone. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 38: 13-19.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2006): Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 36(10): 2566-73.

Wada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N (2002): Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development* 129(12): 2987-2995.

---

Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 2000; 287(5457): 1442-1446.

Werkmeister JA, Edwards GA, Casagrande F, White JF, Ramshaw JA (1998): Evaluation of collagen-based biosynthetic material for the repair of abdominal wall defects. *J Biomed Mater Res* 39: 429-436.

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2004): Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364:141-148.

Wu D, Razzano P, Grande DA (2003): Gene therapy and tissue engineering in repair of the musculoskeletal system. *J Cell Biochem* 88(3): 467-481.

Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ (1994): Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* 164: 588-603.

Yang P, Beaty TH, Khoury MJ, Chee E, Stewart W, Gordis L (1992): Genetic-epidemiologic study of omphalocele and gastroschisis: Evidence for heterogeneity. *Am J Med Genet* 44: 668-675.

Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A (1998): Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology* 51: 221-225.

Young HE, Steele TA, Bray rA, Hudson j, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC (2001): Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat. Rec.* 264: 51-62.

Zammit PS, Beauchamp JR (2001): The skeletal muscle satellite cells: Stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 68: 193-204.

Zammit PS, Heslop L, Hudon V, Rosenblatt JD, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Beauchamp JR Partridge TA (2002): Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp. Cell Res.* 281: 39-49.

Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, Beauchamp JR (2006): Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* 119(9): 1824-1832.